

P. 105

ii opr. z elem

cz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

A-23

TOM 23

1985

ZESZYT 3

WROCLAW · WARSZAWA · KRAKOW · GDAŃSK · LÓDŹ
ZAKŁAD NARODOWY IM. OSSOLIŃSKICH
WYDAWNICTWO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 23

1985

ZESZYT 3

KOMITET REDAKCYJNY

Jan Albrecht, Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąbmska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kałuża, Adam Kunicki, Mirosław J. Mossakowski, Wiesław Papier, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina Zelman
Sekretarz Redakcji: Anna Zaręba-Kowalska

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-54-20

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1985.
Nakład: 570 egz. Objętość: ark. wyd. 13,50, ark. druk. 11,38, ark. A₁ - 15. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania 1985.06.11. Podpisano do druku 1985.11.07. Druk ukończono w listopadzie 1985. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3261/85.

Cena zł 125.—

<http://rcin.org.pl>

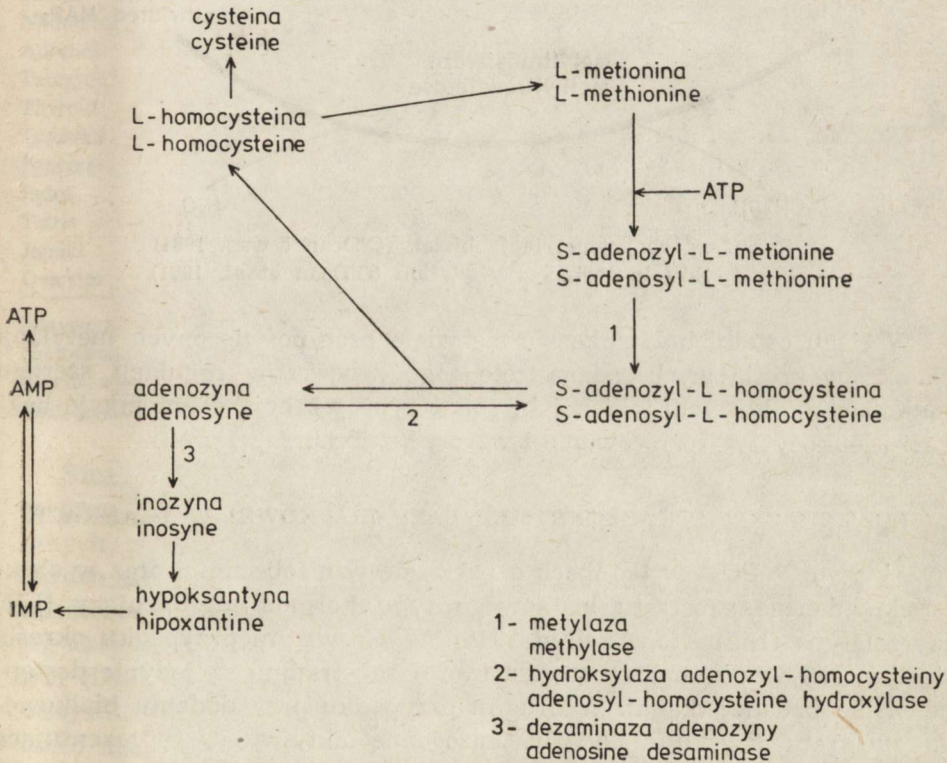


URSZULA RAFAŁOWSKA, ANNA PASTUSZKO

KARBOKSYMETYLACJA BIAŁEK I JEJ ROLA
 W REGULACJI PROCESÓW NEUROSEKRECJI

Zespół Neurochemii Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
 PAN, Warszawa

Podstawowym dawcą grup metylowych w biologicznych metylacjach jest S-adenosylo-L-metionina (AdoMet) (Usdin 1979). Grupy metylowe przenoszone są na lipidy, białka, węglowodany, DNA, RNA przy udziałzie



Ryc. 1. Metabolizm S-adenosyl-L-metioniny
 Fig. 1. Metabolism S-adenosyl-L-methionine

łek, które mogły być substratami białkowej karboksymetylasy. Aktywność PCM jest obecna we wszystkich tkankach. Jest ona najwyższa w układzie nerwowym i w narządach wydzielania wewnętrznego (tabela 1).

Tabela 1. Aktywność białkowej karboksymetylasy w tkankach wydzielniczych według Diliberto, Axelrod (1976)

Table 1. Protein carboxymethylase activity in endocrine tissues (Diliberto, Axelrod 1976).

Gruczoł wydzielniczy Endocrine tissue	Aktywność specyficzna Specific activity		Stosunek specyficznej aktywności egzogennej do endogennej Specific activity ratio exogenous to endogenous
	egzogenna exogenous	endogenna endogenous	
Przysadka mózgowa Pituitary gland	8,85±0,07	4,73±0,04	1,9
Tylny płat Posterior lobe	11,44±0,46	5,39±0,22	2,1
Przedni płat Anterior lobe	6,37±0,18	3,02±0,15	2,1
Szyszynka Pineal	1,82±0,11		
Nadnercze Adrenol	4,43±0,06	0,32±0,01	13,8
Tarczycza Thyroid	3,66±0,31	0,89±0,11	4,1
Trzustka Pancreas	3,43±0,04	0,14±0,04	24,5
Jądra Testis	12,32±0,25	0,35±0,01	35,2
Jajniki Ovarries	3,25±0,07	0,22±0,02	14,8

Aktywność białkowej karboksymetylasy była oznaczana w obecności (egzogenna) i nieobecności (endogenna) hormonu luteinizującego (LH).

Specific activity of protein carboxymethylase was examined in the presence (exogenous) or absence (endogenous) of protein substrates (LH).

Stosunek specyficznych aktywności egzo- i endogennej jest najniższy w przysadce mózgowej, co wskazuje na najwyższą, w porównaniu do innych badanych gruczołów, zawartość hormonów polipeptydowych — bardzo efektywnych substratów dla PCM (Diliberto, Axelrod 1974). Rozmieszczenie białkowej karboksymetylasy w mózgu oznaczano mierząc jej aktywność w różnych strukturalno-czynnościowych układach mózgowia (Diliberto, Axelrod 1976; Kim i wsp. 1975). Była ona podobna we wszystkich strukturach z wyjątkiem mózdzku, w którym wykazywała nieco niższe wartości (tabela 2).

W porównaniu z mózgiem aktywność PCM w nerwie kulszowym i zwoju szyjnym górnym jest znacznie niższa. Zarówno w mózgu, jak

Tabela 2. Aktywność białkowej karboksymetylasy w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym według Diliberto, Axelrod (1976).

Table 2. Protein carboxymethylase activity in the central and peripheral nervous system (Diliberto, Axelrod 1976).

Struktura Structure	Aktywność specyficzna Specific activity	
	egzogenna exogenous	endogenna endogenous
Podwzgórze Hypothalamus	15,33±0,31	1,60±0,06
Prążkowie Striatum	16,87±0,20	1,66±0,02
Śródmózgowie Midbrain	14,38±0,22	1,43±0,05
Hipokamp Hippocampus	15,44±0,23	1,83±0,05
Móżdżek Cerebellum	11,58±0,28	1,22
Pień mózgu Brain stem	13,81±0,20	1,31±0,08
Kora Cortex	15,03±0,51	2,25
Nerw kulszowy Sciatic nerve	2,62±0,08	0,23±0,01
Górny zwój szyjny Superior cervical ganglion	5,09±0,24	

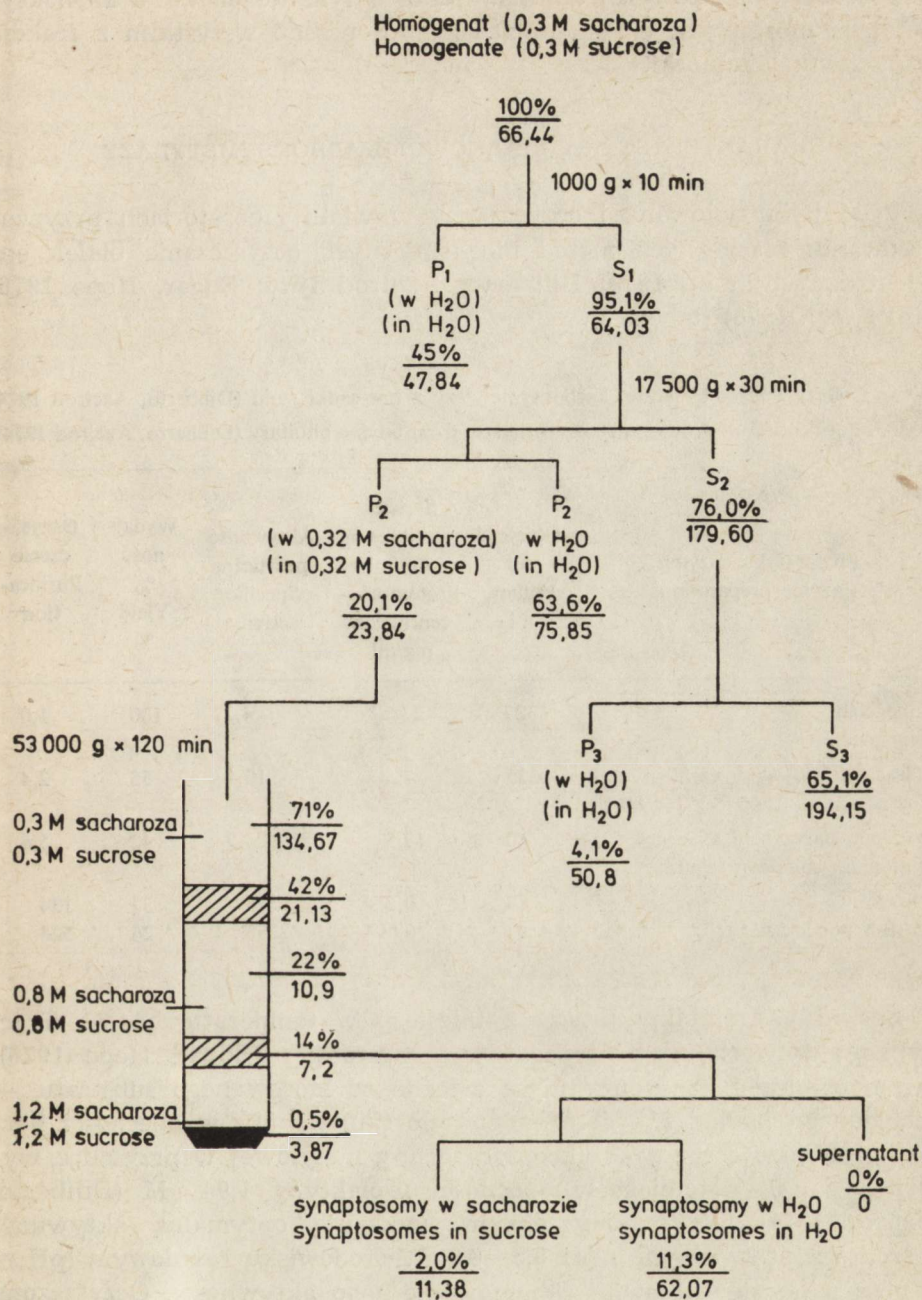
Aktywność białkowej karboksymetylasy była oznaczana w obecności (egzogenna) i nieobecności (endogenna) LH.

Specific activity was examined in presence (exogenous) or absence (endogenous) of LH.

W nerwach obwodowych endogenna aktywność PCM jest bardzo niska, co świadczy o stosunkowo niskim poziomie substratów białkowych dla enzymatycznej metylacji. W obecności LH większość struktur mózgu wykazuje dwukrotnie wyższą w porównaniu z innymi tkankami specyficzną aktywność karboksymetylasy białkowej.

SUBKOMÓRKOWE ROZMIESZCZENIE BIAŁKOWEJ KARBOKSYMETYLAZY W MÓZGU

Zgodnie z danymi Diliberto i Axelroda (1976) 95% aktywności PCM mózgu występuje we frakcji S₁ otrzymanej po usunięciu z homogenatu frakcji jądrowej. Najwyższa aktywność PCM występuje w cytosolu (S₃) komórek nerwowych i glejowych. We frakcji P₂ (nieoczyszczona frakcja mitochondrialna) i frakcji synaptosomalnej aktywności PCM wzrasta kilkakrotnie po rozbiciu struktur tych frakcji. We frakcji mikrosomalnej P₃ i frakcji oczyszczonych mitochondriów aktywność białkowej karboksymetylasy jest bardzo niska (ryc. 3).



Ryc. 3. Subkomórkowa lokalizacja karboksymetylasy białkowej w mózgu szczura (Diliberto, Axelrod 1976). Górna liczba — procent aktywności homogenatu, dolna liczba — aktywność specyficzną

Fig. 3. Subcellular distribution of protein carboxymethylase in rat brain (Diliberto, Axelrod 1976). Bold number — percent of homogenate activity, ital number — specific activity

Przedstawione powyżej dane świadczą o tym, że białkowa karboksylometylaza mózgu jest enzymem związanym przede wszystkim z frakcją rozpuszczalną komórki.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKOWEJ KARBOKSYMETYLAZY

PCM była izolowana i oczyszczana w wielu laboratoriach przy zastosowaniu klasycznych metod biochemicznych oczyszczania białek enzymatycznych (Kim 1973; Diliberto, Axelrod 1976; Edgar, Hope 1976; Kim i wsp. 1978) (tabela 3).

Tabela 3. Oczyszczanie białkowej karboksylometylasy z przysadki wołu (Diliberto, Axelrod 1974)
Table 3. Purification of protein carboxymethylase from bovine pituitary (Diliberto, Axelrod 1974).

Preparatyka enzymu Enzyme preparation	Objętość ml Volume ml	Stężenie białka mg/ml Protein con- centration mg/ml	Aktywność specyficzna Specific activity	Wydaj- ność % Yield %	Oczysz- czenie Purifica- tion
Homogenat Homogenate	327	23	4,27	100	1,0
Nadsącz 80 000×g przez 80 min Supernatant at 80 000×g for 80 min	225	7,5	10,4	55	2,4
Wysalanie siarczanem amonu Ammonium sulfate precipitate	40	13,5	23,9	42	5,6
Sephadex G-100	80	0,256	574	37	134
DEAE-Sephadex A-50	40	0,094	2255	26	528

Enzym jest stabilny przez 12 miesięcy w temperaturze 4°C. Traci szybko aktywność, gdy preparat jest zamrożony (Edgar, Hope 1976). Parametry kinetyczne enzymu są zależne od stosowanego substratu — egzogennego białka. K_m dla S-adenosylo-L-metioniny w obecności hormonu luteinizującego jako akceptora grupy metylowej w przysadce wynosi 1,47 μM , natomiast w obecności prolaktyny 1,94 μM (Diliberto, Axelrod 1974). Oczyszczony enzym wykazuje optymalną aktywność w środowisku kwaśnym o pH 5,5—6,0. W środowisku zasadowym (pH = 9) obserwuje się całkowite zahamowanie jego aktywności. Oczyszczona PCM z przysadki mózgowej podczas rozdzielania w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu daje jedno pasmo o ciężarze cząsteczkowym 25 000 (Edgar, Hope 1976). Odpowiada to ciężarowi cząsteczkowemu białkowej karboksylometylasy otrzymanej z erytrocytów (Kim 1974; Polastro i wsp. 1978).

SWOISTOŚĆ SUBSTRATOWA BIAŁKOWEJ KARBOKSYLAZY

Białka, które są akceptorami grup metylowych (MAP) w reakcji karboksymetylacji występują przede wszystkim we frakcji błonowej, chociaż są również obecne we frakcji rozpuszczalnej (Kim i wsp. 1975; Diliberto, Axelrod 1976; Diliberto i wsp. 1976; Gagnon i wsp. 1978; Galleti i wsp. 1978; O'Dea i wsp. 1978).

Swoistość substratowa PCM ssaków wykazuje bardzo znaczną heterogenność (tabela 4). Białka ulegające metylacji różnią się ciężarem cząsteczkowym. Bardzo dobrymi substratami PCM są peptydowe hormony o ciężarze cząsteczkowym mniejszym niż 25 000, takie jak hormon luteinizujący, hormon adrenokortykotropowy, hormon wzrostowy, prolaktyna, neurofizyna (Diliberto, Axelrod 1974; Edgar, Hope 1974, 1976; Brownstein, Gainer 1977; Gagnon i wsp. 1978). Znacznie mniejszą swoistość substratową dla PCM mają wazopresyna i oksytocyna.

Tabela 4. Specyficzność substratu dla białkowej karboksymetylasy w przysadce wołu (Diliberto, Axelrod 1974).

Table 4. Substrate specificity of protein carboxymethylase (Diliberto, Axelrod 1974)

Substrat białkowy Substrate protein	Aktywność specyficzna Specific activity
Hormon luteinizujący (LH) Luteinizing hormone (LH)	2032
Hormon adrenokortykotropowy Adrenocorticotrop hormone	1702
Hormon wzrostowy Growth hormone	1644
Prolaktyna Prolactin	1457
Ovalbumina Ovalbumin	967
Albumina Bovine-serum albumin	125
Wazopresyna Vasopressin	120
Oksytocyna Oxytocin	94

Kalmodulina, która spełnia rolę regulatora takich procesów, jak degradacja cyklicznych nukleotydów, aktywność wapniowo zależnej ATP-azy, fosforylacja miozyny (Means, Dedman 1980), jest bardzo dobrym substratem dla białkowej karboksymetylasy, znacznie lepszym niż szeregu hormonów przysadki (Cox i wsp. 1979; Gagnon i wsp. 1980). K_m dla kalmoduliny, jako substratu metylowego, wynosi $7 \times 10^{-5} M$. Jest to wartość zbliżona do stężenia kalmoduliny w mózgu i w jądrach (Wolff i wsp. 1977).

ROLA KARBOKSYMETYLACJI W SEKRECJI I NEUROSEKRECJI

Wysoka aktywność białkowej karboksymetylasy w tkankach wydzielniczych i w tkance nerwowej sugerowała jej rolę w procesie sekrecji i neurosekrecji. Wykazano, że w gruczole śliniankowym szczura, po wstrzyknięciu zwierzętom izoproterenolu (agonisty receptorów β -adrenergicznych), obserwuje się wzrost wydzielania amylazy z jednoczesnym wzrostem aktywności białkowej karboksymetylasy i wzrostem ilości dostępnych akceptorów białkowych dla metylacji (tzw. pojemność MAP) (tabela 5).

Tabela 5. Wpływ izoproterenolu na wydzielanie amylazy, aktywność PCM i pojemność MAP w śliniance szczura (Gagnon i wsp. 1979)

Table 5. Effects of isoproterenol injection on amylase secretion, PCM activity and MAP activity in rat parotid gland (Gagnon et al. 1979)

Czas po wstrzyknięciu izoproterenolu min Time after injection min	Poziom amylazy % kontroli Amylase content % of control	Aktywność PCM % kontroli PCM activity % of control	Pojemność MAP % kontroli MAP capacity % of control
0	100±2	100± 1	100± 4
5	80±7	121± 5	127± 5
10	—	140± 1	146±11
15	64±8	148± 9	164±13
30	18±4	159±10	162±12
60	2±1	128±14	114±11
120	10±3	120± 7	121± 7

Wykazano przy tym, że wzrost akceptorów białkowych dla metylacji po podaniu izoproterenolu wiąże się ze wzrostem tylko dwu białek o ciężarze cząsteczkowym niższym od 25 000, w przeciwieństwie do warunków kontrolnych, w których metylacji ulega wiele białek (Gagnon i wsp. 1979). Podanie zwierzętom D-izomeru izoproterenolu nieaktywnego fizjologicznie nie powoduje żadnych zmian w karboksymetylacji białek. Podobnie jak w przypadku gruczołu śliniankowego wzmożenie wydzielania z nadnerczy oraz przysadki wiąże się również ze wzrostem karboksymetylacji białek (Diliberto, Axelrod 1974; Naccacha i wsp. 1979). Przyjmuje się obecnie, że karboksymetylacja białek w gruczolach wydzielniczych jest ważnym czynnikiem regulującym sekrecję.

Wiele danych doświadczalnych przemawia również za udziałem karboksymetylacji białek w regulacji neurosekrecji (Viveros 1975; Diliberto i wsp. 1976; O'Dea i wsp. 1981). Materiałem doświadczalnym w badaniach dotyczących tego zagadnienia były komórki PC 12 (*Pheochromocytoma*) uwalniające noradrenalinę w następstwie depolaryzacji o me-

chanizmie podobnym, jeśli nie identycznym, do zachodzącego w synapsach *in vivo* (Greene, Rein 1977 a, 1977 b) oraz frakcja synaptosomalna. Dobrze oczyszczona frakcja synaptosomalna uzyskana metodą flotacyjną według Booth'a i Clarka zachowuje niezmienną w stosunku do *in vivo* aktywność energetyczną oraz metaboliczną i jest prawidłowym i bardzo wygodnym modelem do badań transmisji synaptycznej (Deutsch, Rafałowska 1979; Rafałowska i wsp. 1980; Deutsch i wsp. 1981; Pastuszko i wsp. 1981 a, 1981 b).

W komórkach PC 12 metylacja ma duży wpływ na neurosekrecję noradrenaliny. Zastosowanie 3-deazaadenozyny (DZA) inhibitora metylacji w środowisku wysokopotasowym powoduje zwiększenie wypływu noradrenaliny z komórek (Chiang, Contani 1979; Im i wsp. 1979; Schiffmann i wsp. 1979; Zimerman i wsp. 1979; Rabe i wsp. 1980).

W badaniach na frakcji synaptosomalnej zaobserwowano zależność między depolaryzacją błony synaptosomalnej a zdolnością karboksymetylacji. Weratrydyna, która depolaryzuje błonę synaptosomalną, hamuje równocześnie proces metylacji (Eiden i wsp. 1979). W wyniku częściowego zahamowania aktywności synaptosomalnej karboksymetylasy białkowej przez S-adenosyno-L-homocysteinę (SAH) obserwuje się zmniejszenie pobierania przez synaptosomy GABA oraz wzrost pobierania dopaminy. Ten różny wpływ inhibicji karboksymetylacji na pobieranie GABA i dopaminy może się wiązać z różną wewnątrzsynaptosomalną lokalizacją obu substancji neuroprzekaznikowych (Rafałowska, Pastuszko 1982; Pastuszko, Rafałowska 1984). Prawdopodobnie zmiany w transporcie neurotransmiterów wywołane zmianami w karboksymetylacji białek wiążą się z procesem egzocytozy pęcherzyków synaptycznych. Podczas egzocytozy błony pęcherzyków „stapiają się” z błoną presynaptyczną, a ich zawartość uwalnia się do przestrzeni synaptycznej (De Robertis, Vaz Ferreira 1957; Kirshner, Viveros 1972; Viveros 1975). Błony pęcherzyków i błony plazmatyczne zakończeń nerwowych mają ładunek ujemny (Meres 1965; Mathews i wsp. 1972; Dean 1975). Aby mógł zatem nastąpić kontakt tych dwóch rodzajów błon w procesie egzocytozy, musi dojść do obniżenia istniejącej między nimi bariery elektrostatycznej (Mathews i wsp. 1972; Dean 1975). Wielu autorów sugeruje, że karboksymetylacja białek odgrywa decydującą rolę w tym procesie. Również bardzo istotna wydaje się szybka, spontaniczna, nieenzymatyczna demetylacja, której przypisuje się rolę przywrócenia początkowego ładunku ujemnego na powierzchniach błon i „oderwanie” pęcherzyków od błony zakończeń nerwowych (Diliberto, Axelrod 1976).

Zgromadzone dotychczas dane doświadczalne pozwalają na wysunięcie ogólnej hipotezy wskazującej, że karboksymetylacja białek może prowadzić do modyfikacji ładunku białek błonowych, co z kolei może wywołać zmiany konformacyjne, a w konsekwencji zmieniać własności kanałów błonowych i białek transportujących.

КАРБОКСИМЕТИЛАЦИЯ БЕЛКОВ И ЕЕ РОЛЬ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ НЕЙРОСЕКРЕЦИИ

Резюме

В статье представлены обзор исследований относящихся к метилации белков и ее роль в процессе секреции и нейросекреции. Обсуждены механизм метилации и роль карбоксиметилазы белков в этом процессе. Представлено размещение энзима в разных тканях и субклеточных структурах, охарактеризовано его свойства, обращая внимание на род и уровень белковых субстратов подвергающихся метилации.

Согласно литературным данным указано на регулировочную роль метилации белков в секреции желез и ее участие в процессе экзоцитоза синаптических пузырьков нервных окончаний ведущим к освобождению нейротрансмиттеров в синаптическую щель.

CARBOXYMETHYLATION OF PROTEINS AND THEIR ROLE IN THE REGULATION OF NEUROSECRETION

Summary

The paper reviews recent investigations on the methylation of proteins in the secretion and neurosecretion. The distribution of the enzyme in different tissues and subcellular fractions, and the nature and level of its substrates are characterized. Particular attention is paid to the role of protein methylation in hormone secretion and in the exocytosis of synaptic vesicles in the nerve endings underlying the release of neurotransmitters into the synaptic cleft.

PIŚMIENNICTWO

1. Axelrod J., Daly J.: Pituitary gland: Enzymic formation of methanol from S-adenosyl methionine. *Science*, 1965, 150, 892—893.
2. Brownstein M. J., Gainer H.: Neurophysin biosynthesis in normal rats and in rats with hereditary diabetes insipidus. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 4046—4049.
3. Chiang P. K., Richards H. H., Cantoni G. L.: S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors. *Molec. Pharmac.*, 1977, 13, 939—945.
4. Chiang P. K., Cantoni G. L.: Perturbation of biochemical transmethylation by 3-deazaadenosine *in vivo*. *Biochem. Pharmac.*, 1979, 28, 1897—1903.
5. Cox D. W., O'Dea R. F., Hurwitz M. Y., Edstrom R. P.: Identification of calcium dependent regulator protein as a substrate for protein O-methyl transferase. *Fed. Proc.*, 1979, 38, 717—721.
6. Dean P. M.: Exocytosis modelling: an electrostatic function for calcium in stimulus for calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Theor. Biol.*, 1975, 54, 289—308.
7. Deutsch C., Rafałowska U.: Transmembranes electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Letters*, 1979, 108, 274—278.
8. Deutsch C., Drown C., Rafałowska U., Silver I. A.: Synaptosomes from rat brain: morphology, compartmentation and transmembrane pH and electrical gradients. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 6, 2063—2070.
9. De Robertis S., Vaz Ferreira O.: Electron microscope study of the excretion

- of catechol-containing droplets in the adrenal medulla. *Exp. Cell. Res.*, 1957, 12, 568—574.
10. Diliberto E. J., Axelrod J.: Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1701—1704.
 11. Diliberto E. J., Axelrod J.: Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1159—1165.
 12. Diliberto E. J., Viveros O. H., Axelrod J.: Subcellular distribution of protein carboxymethylase and its endogenous substrates in the adrenal medulla. Possible role in excitation-secretion coupling. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 4050—4054.
 13. Edgar D. H., Hope D. B.: Neurophysin methylation in extracts of bovine posterior pituitary gland: hormone binding ability. *FEBS Letters*, 1974, 49, 145—148.
 14. Edgar D. H., Hope D. B.: Protein-carboxyl methyltransferase of the bovine posterior pituitary gland. Neurophysin as a potential endogenous substrate. *J. Neurochem.*, 1976, 27, 949—955.
 15. Eiden L. E., Borchardt R. T., Rutledge Ch. O.: [W:] Transmethylation. Red.: E. Usdin, R. T. Borchardt, C. R. Creveling. Elsevier North Holland, New York 1979, 539—546.
 16. Gagnon J., Axelrod J., Brownstein M.: Protein carboxymethylation effects of 2% sodium chloride administration on protein carboxymethylase and its endogenous substrates in rat posterior pituitary. *Life Sci.*, 1978, 22, 2155—2164.
 17. Gagnon G., Viveros O. H., Diliberto E. J., Axelrod J.: Enzymatic methylation of carboxyl groups of chromaffin granule membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 3778—3781.
 18. Gagnon C., Bardin C. W., Strittmatter W., Axelrod J.: [W:] Transmethylation. Red.: E. Usdin, T. R. Borchardt, C. R. Creveling. Elsevier North Holland, New York 1979, 521—528.
 19. Gagnon C., Kelly S., Manganiello V., Vanghan M., Strittmatter W., Hoffman A., Hirata F., Axelrod J.: Protein carboxymethylase modifies calmodulin activity. *Fed. Proc.*, 1980, 39, 6, p. 289.
 20. Galleti P., Paik W. K., Kim S.: Selective methyl esterification of erythrocyte membrane proteins by protein-methylase II. *Biochemistry*, 1978, 17, 4272—4277.
 21. Greene L., Rein G.: Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal celline of nerve growth factor. *Brain Res.*, 1977 a, 129, 247—263.
 22. Greene L., Rein G.: Release of ³H norepinephrine from a clonal line of Pheochromocytoma cells (PC₁₂). Nicotine cholinergic stimulation. *Brain Res.*, 1977 b, 138, 521—528.
 23. Im Y. S., Cantoni G. L., Chiang P. K.: A radioactive assay for guanidoacetate methyltransferase. *Analyt. Biochem.*, 1979, 35, 87—93.
 24. Kim S.: Purification and properties of protein methylase II. *Archs. Biochem. Biophys.*, 1973, 157, 476—484.
 25. Kim S.: S-adenosylmethionine; Protein-carboxyl methyl-transferase from erythrocyte. *Archs. Biochem. Biophys.*, 1974, 161, 652—657.
 26. Kim S., Wasserman L., Lew B., Paik W. K.: Studies on the neutral substrate for protein methylase II in mammalian brain and blood. *J. Neurochem.*, 1975, 24, 625—629.
 27. Kim S., Noehunson S., Chiu W., Paik W. K.: A rapid method for the puri-

- fication of S-adenosyl-methionine: Protein-carboxyl-methyltransferase, by affinity chromatography. *Analyt. Biochem.*, 1978, 84, 415—422.
28. Kirshner N., Viveros O. H.: The secretory cycle in the adrenol medulla. *Pharmacol. Rev.*, 1972, 24, 285.
 29. Leonard E. J., Skeet A., Chiang P. K., Cantoni G. L.: The action of the adenosyl-homocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 84, 102—107.
 30. Mathews E. K., Evans R. J., Dean P. M.: The ionogenic nature of the secretory. Granule membrane electrokinetic properties of isolated chromaffin granules. *Biochem. J.*, 1972, 130, 825—832.
 31. Means A. R., Dedman J. R.: Calmodulin an intracellular calcium receptor. *Nature*, 1980, 285, 73—77.
 32. Meres H.: Experiments on internally perfused squid gland exous. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965, 137, 807—817.
 33. Morin A. M., Liss M.: Evidence for a methylated protein intermediate in pituitary methanol formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 52, 373—378.
 34. Naccacha P. H., Volpi M., Strowell H., Beeker E. L., Shalafi R. I.: Chemotactic factor-induced release of membrane calcium in rabbit neutrophils. *Science*, 1979, 203, 461—464.
 35. O'Dea R. F., Viveros O. H., Acheson A., Gorman C., Axelrod J.: Protein carboxymethylase and methyl-acceptor proteins in human platelets and erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1978, 27, 679—684.
 36. O'Dea R. F., Viveros O. H., Diliberto E. J.: Protein carboxymethylation: role in the regulation of cell functions. *Biochem. Pharmacology*, 1981, 30, 11, 1163—1168.
 37. Palastro E. T., Deconinch M. M., Devogel M. R., Mailier E. L., Looza V. B., Schneck A. G., Leonis J.: Purification and some molecular properties of protein methylase II from quine erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 81, 920—925.
 38. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M.: New uptake of GABA by a high-affinity system of rat brain synaptosomes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 1981 a, 78, 1242—1244.
 39. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M., Silver I. A.: Effects of in vitro hypoxia and lowered pH on potassium fluxes and energy metabolism in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 1981 b, 36, 116—123.
 40. Pastuszko A., Rafałowska U.: Protein O-methyltransferase in brain synaptosomal fraction under normal, ischemic and hypoxic conditions. Possible role in neuronal function. *Acta Neurol. Scand.*, 1984, 69, 277—284.
 41. Rabe C. S., Williams T. P., McGee R.: Enhancement of depolarization dependent release of norepinephrine by an inhibitor of S-adenosylmethionine dependent transmethylation. *Life Sciences*, 1980, 27, 19, 1753—1759.
 42. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F.: Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembotal anesthetized and nonanesthetized animals. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1380—1386.
 43. Rafałowska U., Pastuszko A.: Protein carboxymethylation in brain synaptosomal fraction. Possible role in neuronal function. [W:] *Basic and clinical aspects of molecular neurobiology*. Red.: S. Giuffrida i wsp., 1982, p. 320.
 44. Schiffman E., O'Dea R. F., Chiang P. K., Venkatasubramanian K., Corcoran B., Hirata F., Axelrod J.: Symposium on covalent and non-covalent modulation of protein function. Red. P. Atkinson, Acad. Press, New York 1979.
 45. Usdin E., Borchardt R. T., Creveling C. R.: [W:] *Transmethylation*. Red.:

- E. Usdin, R. T. Borchardt, C. R. Creveling, Elsevier North Holland, New York 1979, 421—422.
46. Viveros O. H.: Handbook of physiology section on endocrinology. Red.: A. Blaschko, A. D. Smith, Ann. Physiol. Soc., Washington D. C. 1975, 389—426.
 47. Wolff D. J., Poisier P. G., Brostrom Ch. O., Brostrom M. A.: Divalent cation binding. Properties of bovine brain Ca^{2+} dependent regulator protein. J. Biol. Chem., 1977, 252, 12, 4108—4117.
 48. Zimmerman T. P., Wolberg G., Duncan G. S.: Inhibition of lymphocyte — mediated cytolysis by 3-deazaadenosine: evidence for a methylation reaction essential to cytolysis. Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 6220—6224.
 49. Zimmerman T. P., Wolberg G., Stopford C. R., Duncan G. S.: [W:] Transmethylation. Red.: E. Usdin, R. T. Borchardt, C. R. Creveling, Elsevier North Holland, New York 1979, 187—194.

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

JERZY DYMECKI, OLGIERD PUCIŁOWSKI, WANDA DYR,
DANUTA MARKIEWICZ, MACIEJ PÓLTORAK, WOJCIECH KOSTOWSKI,
MIROSLAWA HAUPTMANN, BARBARA LIPIŃSKA

EFFECTS OF INTRACEREBRAL TRANSPLANTATION
OF IMMATURE SUBSTANTIA NIGRA IN RATS WITH
EXPERIMENTALLY INDUCED PARKINSON'S DISEASE *

III. RESULTS OF BEHAVIOURAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS

Department of Neuropathology, Department of Pharmacology and Physiology and
Department of Biochemistry, Psychoneurological Institute, Warsaw

The effects of intracerebral transplantation of immature dopamine producing neurons in rats with experimentally induced Parkinson's disease could be investigated intravitaly by rotational behaviour examination (Björklund et al. 1980). Another test of the efficacy of transplantation is biochemical determination of the dopamine (DA) level in the striatum of animals after unilateral lesion of the substantia nigra (SN) and after transplantation (Freed et al. 1980).

When SN is destroyed on one side in the rat (nucleus A₉ according to Dahlström and Fuxe, 1964) a considerable decrease of DA content is observed in the striatum on the lesioned side together with typical changes in behaviour, described in detail by Ungerstedt (1971) consisting of both spontaneous and dopaminergic drug-evoked asymmetry in posture and rotating movements around the body axis (Gumulka et al. 1970; Von Voigtlander, Moore 1973; Freed 1983). When SN embryonal cells are transplanted into the striatum of such a rat it can be expected, that the asymmetry of movements will be compensated. Also the decreased DA level in the ipsilateral striatum should be corrected because of the reinnervation of DA-containing axons of the caudatus-pallidum complex. All these features depend on the survival of the transplant and taking over the function of the destroyed nigro-striatal system.

* Study supported by grant of the Polish Academy of Sciences within programme No 10.4.2.05.2.4.

In order to establish these possibilities a series of experiments were performed with transplantation of immature mesencephalon cells (dopaminergic nuclei A_9 and A_{10}) into the dorsal region of the striatum in rats with unilaterally stereotaxically damaged nigro-striatal system. The changes in the rotational behaviour induced by apomorphine — agonist of DA receptors (Ungerstedt 1971) and the DA content in the striatum after transplantation were evaluated.

MATERIAL AND METHODS

For the investigations 45 male rats of an inbred Wistar strain weighing 180—200 g were used. The transplantation material was taken from newborn animals of the same strain. The rats were kept in plastic cages under natural light conditions at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and 60—65% humidity. The animals received standard food (Murigran, Bacutil) and water *ad libitum*. Behavioural tests were always performed in the morning hours (10—12 a.m.). The whole experiment lasted from April to September.

Chemical lesions of the SN

The surgical procedure of the chemical SN lesions was described in detail in the first part of this study (Dymecki et al. 1985). Rats were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.), and chemical lesions with 6-hydroxydopamine were made stereotaxically according to $A = 2.4$ mm, $L = 1.8$ mm, $V = 2.3$ mm the coordinates of the König and Klippel atlas (1963). In order to protect the noradrenergic neurons all animals were pretreated with desipramine HCl (Pertofran, Ciba-Geigy), 25 mg/kg i.p., 45 minutes before toxin injection. Then the rats were injected intracerebrally with freshly prepared 6-OHDA (Calbiochem-Behring) solution (8 μg in 4 μl) in ice-cold saline containing 0.2 mg/ml of ascorbic acid, on the right side with 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. rate.

The transplantation material containing cells from the ventral region of the mesencephalon (DA nuclei A_9 and A_{10}) was taken from brains of newborn rats. This tissue was then injected in a Stoelting stereotaxic apparatus close to the dorsal part of the striatum near the right lateral ventricle by means of a modified puncture needle. The control group consisted of rats to which a fragment of rat sciatic nerve was transplanted into the striatum.

Study of rotational behaviour

All the rats were tested twice for rotational behaviour: two weeks after destruction of the SN and two weeks after transplantation. Moreover, a certain number of animals were examined preliminarily (before lesioning) and additionally, four weeks after transplantation.

Rotational behaviour was induced by subcutaneous injection of apomorphine (Polfa) in a 2 mg/kg dose. This drug evoked in animals with destroyed substantia nigra rotations in direction contrary to the location of the lesion (contralateral) (Ungerstedt 1971, Iwamoto et al. 1976). After injection the animals were placed singly in wire cages of $21 \times 21 \times 21$ cm dimensions and after a lapse of 20 min., observations were started. The number of rotations by 360° around the body axis was counted and their direction noted during 5 min. observation. It resulted from analysis of the distribution of results that a relatively small number of animals exhibited less than 10 rotations in the observation period. It was considered that in these animals the lesion must have been done incorrectly (did not reach the target point) and these rats were not taken into account in analysis of results.

Biochemical study

Biochemical evaluations of dopamine content were performed separately in isolated right and left striatum from 25 rats with unilateral stereotaxic SN damage. The DA was extracted and its content determined according to the method of Haubrich and Denzer (1973) and Chang (1964). The material was divided into two groups: 16 animals received transplantation of neonatal SN neurons. In 9 animals sham transplantation was performed by introduction of a needle and injection of Ringer's solution instead of the graft. This kind of control seems to be more suitable for biochemical study than sciatic nerve transplantations which were used in behavioural investigation, because it allows to avoid the undesirable influence of disintegrating nervous tissue on biochemical assay.

Statistical elaboration. In the analysis of rotational behaviour for intergroup comparison the Mann-Whitney U-test and for intragroup comparison (after lesion and transplantation) Wilcoxon's test for matched pairs (Meddis 1975) were applied. For biochemical studies t-Student's test was used.

RESULTS

Behavioural studies performed in a random group of 10 rats before SN lesion did not demonstrate any significant preference as regards the direction of rotation under the influence of apomorphine (mean right side rotation count = 0 ± 1.5). During tests of rotational movement, two weeks after chemical damage of the DA neurons in the right SN, a distinct asymmetry in the movements of the animals was observed (Fig. 1). Rotation prevailed in left (contralateral) direction, by a mean of 42 ± 8 revolutions (Table 1).

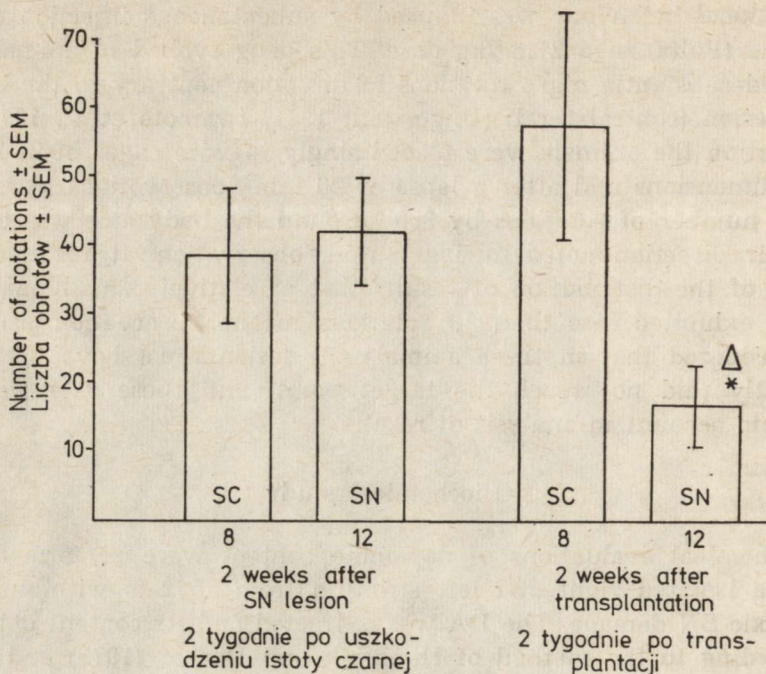


Fig. 1. Apomorphine-induced rotational behaviour after chemical SN lesion and after transplantation of immature SN cells or sciatic nerve (SC). SC — sciatic nerve transplantation, SN — immature SN transplantation. Data are expressed as mean \pm SEM and indicate the number of contralateral rotations per 5 min. Number of animals in each group given below the columns. $\Delta = p < 0.025$ vs SC group, 2 weeks after transplantation, $*$ = $p < 0.002$ vs SN group 2 weeks after lesion

Ryc. 1. Zachowanie rotacyjne, wywołane przez apomorfinę, po uszkodzeniu chemicznym istoty czarnej oraz po transplantacji niedojrzałych komórek istoty czarnej nerwu kulszowego (SC). SC — transplantacja nerwu kulszowego, SN — transplantacja niedojrzałej istoty czarnej. Wyniki przedstawione jako średnie \pm SEM wskazują liczbę przeciwstronnych obrotów w ciągu 5 min. Liczbę zwierząt w każdej grupie podano pod odpowiednią kolumną. $\Delta = p < 0,025$ w stosunku do grupy po transplantacji nerwu kulszowego (2 tygodnie po transplantacji), $*$ = $p < 0,002$ w stosunku do grupy po transplantacji istoty czarnej (2 tygodnie po uszkodzeniu SN)

The same animals examined again two weeks after receiving transplants showed a significant decrease in the number of rotations in contralateral direction (the mean difference in the number of rotations to the left was 16 ± 6 , a statistically significant difference at $p < 0.002$, Wilcoxon's test. Further improvement of the state of the rats, expressed by a decrease in preferential lateralization of the revolutions, was observed in five of the examined animals also after two successive weeks (preference of rotation to the left 4 ± 9 , number too small for statistical elaboration and not shown in the figure). When the numerical data are expressed as percentile diminution of the number of rotations (Delta %), it is seen that two weeks after immature SN trans-

Table 1. Results of rotational behaviour induced by apomorphine after SN lesion and transplantation of immature SN neurons

Tabela 1. Ocena rotacyjnego zachowania się, wywołanego przez apomorfine, po uszkodzeniu istoty czarnej i po transplantacji niedojrzałych neuronów istoty czarnej

Group of animals Grupa zwierząt	Number of animals Liczba zwierząt	Mean number of rotation \pm SEM Średnia liczba obrotów \pm SEM	Decrease in mean number of rotation Spadek średniej liczby obrotów
2 weeks after SN lesion 2 tyg. po uszkodzeniu istoty czarnej	12	42 \pm 8*	100%
2 weeks after transplantation 2 tyg. po transplantacji	12	16 \pm 6*	30%
4 weeks after transplantation 4 tyg. po transplantacji	5	4 \pm 9	10%

* — $p < 0.002$ (two-tailed Wilcoxon test)

* — $p < 0,002$ (dwuczynnikowy test Wilcoxon)

Table 2. Dopamine content of left and right striatum of rat brains after unilateral right SN lesion and ipsilateral transplantation of immature SN neurons

Tabela 2. Zawartość dopaminy w lewym i prawym prążkowie szczura po prawostronnym uszkodzeniu istoty czarnej i wszczepieniu niedojrzałych neuronów istoty czarnej po tej samej stronie

Group of animals Grupa zwierząt	Number of animals Liczba zwierząt	DA of wet tissue (nmoles/g \pm SD) DA w świeżej tkance (nmoles/g \pm SD)		Mean differences between left and right striatum Średnia różnica między lewym i prawym prążkowie
		left striatum (nonlesioned) prążkowie lewe (nieuszkodzone)	right striatum (lesioned) prążkowie prawe (uszkodzone)	
SN lesion Uszkodzenie istoty czarnej	9	35.7 \pm 14.1 ^a	13.3 \pm 7.1 ^a	22.3 \pm 12.9
SN transplantations Transplantacja istoty czarnej	16	44.2 \pm 14.0 ^b	18.6 \pm 15.2 ^{bd}	25.7 \pm 21.6
Sham transplantations Transplantacja rzekoma	9	31.5 \pm 9.3 ^c	6.3 \pm 4.9 ^{ed}	25.2 \pm 12.6

The data ($\bar{x} \pm SD$) were evaluated statistically by Student's t test.

Dane ($\bar{x} \pm SD$) opracowano statystycznie przy użyciu testu t Studenta.

a — $p < 0.001$

c — $p < 0.001$

b — $p < 0.001$

d — $p < 0.001$

Letters indicate the pairs of values subjected to statistical evaluation. The values not described with letters showed no significant differences.

Litery oznaczają pary wartości, poddanych ocenie statystycznej. Wartości nie oznakowane literami nie wykazują różnic statystycznie istotnych.

plantation the animals exhibit an improvement of the order of 70 percent, and after four weeks of more than 90 percent.

The control group showed two weeks after implantation of a fragment of the sciatic nerve enhanced contralateral rotations. The increasing lateralization seems to indicate progressing disturbances of the functions of the lesioned nigro-striatal system. The differences between the control group and that with transplanted mesencephalon cells reached a significance level at $p < 0.025$.

Biochemical studies showed that dopamine content in the right striatum (ipsilateral to SN lesion) in the group with sham transplantation is significantly lower than that of the left striatum (Table 2). After transplantation of SN neurons the DA content in the right striatum increased. It is very interesting that after transplantation, the DA content increased in the left striatum (on unlesioned side).

DISCUSSION

It was demonstrated in the present study that transplantation of immature dopaminergic cells into the striatum in rats with unilaterally destroyed SN leads to a gradual normalization of movements, expressed as a diminution of the number of apomorphine-induced contralateral rotations. The contralateral direction of the rotations, can be explained by an enhanced influence of the drug on DA receptors in the striatum of the lesioned side, since, owing to denervation, these receptors become hypersensitive (Gomulka et al. 1970; Ungerstedt 1971; Iwamoto et al. 1976). The recovery from asymmetry of movements after transplantation may be evidence that the cells of the transplant take over the function of the destroyed DA neurons of the nigro-striatal system. Transplantation of neutral nerve tissue, that is not containing dopaminergic cells (sciatic nerve) did not have any effect on the rotational behaviour. The presently obtained results do not allow to answer the question whether this effect is connected with DA release in the synapses of the newly formed neuronal junctions between the grafted SN cells and the striatum. The literature gives descriptions of reinnervation of the basal nuclei by a dense network of processes derived from DA-containing cells of the transplant (Björklund et al. 1980). It, therefore, seems probable that immature DA cells transplanted into the striatum of rats with destroyed SN are capable of taking over the function of the no more existing neurons of the nigro-striatal system.

Behavioural results are strongly supported by biochemical studies which demonstrate that reduction of the DA level after unilateral SN lesion can be improved by SN cells transplantation. This feature seems to confirm that immature dopaminergic cells implanted into the striatum can produce DA and compensate in some degree disturbances in DA metabolism.

At present it is difficult to foresee the practical implications of these investigations for Parkinson's disease therapy. Presentation of the pathogenesis of this condition as a dysfunction of the dopaminergic nigro-striatal system exclusively is a far going simplification. The nature of the relations between various neurotransmitter (and neuromodulator) systems within the basal nuclei is very complex. In the regulation of motor activity in the extrapyramidal system, beside dopaminergic neurons also cholinergic, GABA-ergic, enkephalinergic ones and those containing substance P participate and so do probably noradrenergic and serotonergic ones (Larsen, Calne 1982). It can, therefore, hardly be imagined that transplantation of only one kind of dopaminergic neurons (technically possible in view of the existence of anatomical structures, relatively large and homogeneous like the dopaminergic nuclei A_9 and A_{10}) could reverse the whole symptomatology of the disease. Nevertheless, it seems that in most cases disturbances in the function of the nigro-striatal pathway are the primary cause of the basic pathological symptoms — hypokinesia and tremor (Hornykiewicz 1975; Lloyd et al. 1975; Larsen, Calne 1982). Substitution of the function of the destroyed neurons of the SN by cells of the transplant seems to promise the introduction in the future of neuronal transplants producing dopamine as a method of treatment in the neurological clinic with the hope of better therapeutic results than those, recorded to date.

Acknowledgements: We wish to thank Ciba-Geigy A. G., Dept. Pharm., Warsaw, Lektykarska str. 9, for supplying us with Pertofran (Desipramine HCl).

WYNIKI DOMÓZGOWYCH TRANSPLANTACJI NIEDOJRZĄLEJ ISTOTY CZARNEJ U SZCZURÓW Z DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANĄ CHOROBA PARKINSONA

III. Badanie zachowania rotacyjnego zwierząt oraz badania biochemiczne

Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań wpływu domózgowych przeszczepów niedojrzałych komórek istoty czarnej (SN) u szczurów z jednostronnym uszkodzeniem układu nigro-striatalnego przy użyciu 6-hydroksydopaminy na zachowanie zwierząt oraz poziom dopaminy w prądkowiu. Kontralateralne ruchy rotacyjne, charakterystyczne dla szczurów z jednostronnie zniszczoną SN, były aktywowane przez podskórne podanie apomorfiny w dawce 2 mg/kg. W dwa tygodnie po uszkodzeniu SN implantowano zwierzętom w okolicę prądkowia (po stronie zniszczonej SN) fragment brzuszno-bocznej części śródmózgowia obejmujący rejon istoty czarnej, pobranego z mózgu noworodków szczurzych tego samego szczepu.

W dwa tygodnie po zabiegu liczba kontralateralnych ruchów rotacyjnych była znacznie niższa w porównaniu do grupy szczurów, którym przeszczepiono jako kontrolę fragment nerwu kulszowego.

Biochemiczne badania zawartości dopaminy w izolowanym prądkowiu wykazały wyraźny spadek po stronie uszkodzonej SN. Przeszczepy niedojrzałych ko-

mórek SN do prążkowania po stronie uszkodzenia powodowały wzrost poziomu dopaminy w porównaniu z przeszczepami rzekomymi (wprowadzenie igły bez przeszczepu).

Wydaje się, że spadek ruchów rotacyjnych po przeszczepie komórek SN jak również wzrost poziomu dopaminy po stronie transplantacji może być dowodem przyjęcia się i rozwoju niedojrzałych komórek dopaminergicznych wszczepionych do prążkowania oraz podjęcia przez nie produkcji dopaminy.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНУТРИМОЗГОВЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ НЕЗРЕЛОГО ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

III. Исследование ротационного поведения животных и биохимические исследования

Резюме

Представлены результаты исследований влияния внутримозговых трансплантатов незрелых клеток черного вещества (SN) у крыс с односторонним повреждением nigro-стриатальной системы с применением 6-гидроксидофамина на поведение животных и на уровень дофамина в неостриатуме. Контралатеральные ротационные движения, характерные у крыс с односторонне уничтоженным SN, были активированы путем подкожного введения апоморфина в дозе 2 мг/кг. Спустя две недели после повреждения SN имплантировано животным в область неостриатума (по стороне уничтоженного SN) фрагмент брюшно-боковой части среднего мозга, охватывающий участок SN, взятого из мозга крысиных новорожденных этого самого рода. Спустя две недели после процедуры число контралатеральных ротационных движений было статистически достоверно ниже в сопоставлении с группой крыс, которым трансплантировано как контроль фрагмент седалищного нерва.

Биохимические исследования уровня дофамина в изолированном неостриатуме показали отчетливый спад его по стороне поврежденного SN. Трансплантаты незрелых клеток SN в неостриатум по стороне повреждения вызывали рост уровня дофамина в сопоставлении с ложными трансплантатами (введение иглы без трансплантата).

Кажется, что спад ротационных движений после трансплантата клеток SN, а также рост уровня дофамина по стороне трансплантации может быть доказательством привития и развития незрелых дофаминергических клеток трансплантированных в неостриатум и начала ими производства дофамина.

REFERENCES

1. Björklund A., Dunnett S. B., Stenevi U., Lewis M. E., Iversen S. D.: Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.*, 1980, 199, 307—333.
2. Dahlström A., Fuxe K.: Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in cell-bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 1964, 62, Suppl. 232, 1—55.
3. Chang C. C.: A sensitive method for spectrofluorimetric assay of catecholamines. *Int. J. Neuropharmacol.*, 1964, 3, 643—649.
4. Dymecki J., Markiewicz D., Pótorak M., Puciłowski O., Kostowski W.: Effects of intracerebral transplantations of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. I. Comparative evaluation of two

- models of Parkinson's disease obtained by unilateral stereotaxic lesion of the substantia nigra by electrocoagulation and 6-hydroxydopamine. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 167—179.
5. Freed W. J., Perlow M. J., Karoum F., Seiger A., Olson L., Hoffer B. J., Wyatt R. J.: Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioral, biochemical and histological studies. *Ann. Neurol.*, 1980, 8, 510—519.
 6. Freed W. J.: Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion-induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts. *Biol. Psych.*, 1983, 18, 1205—1267.
 7. Gomulka W., Ramirez del Angel A., Samanin R., Wazlelli L.: Lesion of substantia nigra: biochemical and behavioral effects in rats. *Europ. J. Pharmacol.*, 1970, 10, 79—82.
 8. Haubrich D. R., Denzer J. G.: Simultaneous extraction and fluorimetric measurement of brain serotonin, catecholamines, 5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid. *Anal. Biochem.*, 1973, 55, 306—318.
 9. Hornykiewicz O.: Parkinsonism induced by dopaminergic antagonists. [In:] *Advances in Neurology*, v. 9. Eds: D. B. Calne, T. N. Chase, A. Barbeau. Raven Press, New York 1975, 155—164.
 10. Iwamoto E. T., Loh H. H., Way E. L.: Circiling behavior in rats with 6-hydroxydopamine or electrolytic nigral lesions. *Europ. J. Pharmacol.*, 1976, 37, 339—356.
 11. König J. F., Klippel R. A.: *The rat brain: A stereotaxic Atlas of the Forebrain and the Lower Part of the Brain Stem*. Williams and Wilkins, Baltimore 1963.
 12. Larsen T. A., Calne D. B.: Recent advances in the study of Parkinson's disease. *Trend Neurosci.*, 1982, 5, 10—12.
 13. Lloyd K. G., Davidson L., Hornykiewicz O.: The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-DOPA therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 195, 435—464.
 14. Meddis R.: *Statistical Handbook for Non-Statisticians*. McGraw-Hill, Maidenhead 1975.
 15. Ungerstedt U.: Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.*, 1971, Suppl. 367, 69—93.
 16. Von Voigtlander P. F., Moore K. E.: Turning behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: effects of apomorphine, L-DOPA, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. *Neuropharmacol.*, 1973, 12, 451—462.

Authors' address: Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, 1/9, Sobieskiego Str. 02-957 Warsaw, Poland

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ CYKLAZY ADENYLOWEJ
I FOSFATAZY ZASADOWEJ W NACZYNIACH MÓZGU SZCZURA
W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU CHLORKIEM MANGANAWYM

Zespół Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Badania patomorfologiczne doświadczalnej encefalopatii manganowej sugerują, że przynajmniej część nieprawidłowości strukturalnych może być uwarunkowana upośledzeniem mechanizmów bariery krew-mózg (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1983 a, b; Dydyk, Mossakowski 1984). Należą do nich przede wszystkim wykładniki naczyńopochodnego obrzęku mózgu, stwierdzane zarówno w badaniach histopatologicznych, jak i w mikroskopowo-elektronowych bezpośrednio po zatruciu i utrzymujące się około 1 tygodnia. Znamioną cechą naczyńopochodnego obrzęku mózgu jest upośledzenie mechanizmów bariery krew-mózg, związane z uszkodzeniem elementów strukturalnych złącza naczyniowo-tkankowego (Klatzo 1967). Znajdują one zazwyczaj wykładniki morfologiczne w obrazie mikroskopowo-elektronowym ścian naczyń włosowatych, bądź czynnościowe wyrażające się przechodzeniem znacznikowych substancji „barierowych” z naczyń do tkanek mózgu (Klatzo 1967; Reese, Karnowsky 1967) lub zmianami aktywności enzymów zlokalizowanych w elementach złącza naczyniowo-tkankowego (Torack, Barrnett 1964; Ostenda i wsp. 1978; Vorbrodt i wsp. 1983).

Badania mikroskopowo-elektronowe dotyczące zarówno wczesnej, jak i późnej fazy encefalopatii manganowej wykazały minimalne zmiany w ultrastrukturze naczyń mózgu (Mossakowski i wsp. 1983 a, b; Dydyk, Mossakowski 1984). Wyrażały się one nieznacznym obrzmieniem komórek śródbłonna i zwiększoną ilością pęcherzyków mikropinocytarnych w ich cytoplazmie. Obkurczenie drobnych tętniczek obserwowano jedynie we wczesnych stadiach zatrucia. W tej sytuacji wydawało się celowe przeprowadzenie badań histochemicznych, pozwalających na dokładniejszą charakterystykę stanu naczyń mózgu w warunkach zastosowanego uprzednio modelu doświadczalnego. Wobec przyjętego obecnie poglądu o zasadniczej roli śródbłonna naczyń w utrzymaniu mechanizmów

bariery krew-mózg (Reese, Karnowsky 1967; Bodenheimer, Brightman 1968; Joó 1971) postanowiono ocenić aktywność cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej, enzymów zlokalizowanych w śródbłonku i uczestniczących w procesach transportowych. Pierwszy z nich spełnia istotną funkcję w regulacji makromolekularnego transportu (Joó 1979; Joó i wsp. 1983), a drugi uczestniczy w procesach transportu czynnego poprzez defosforylację licznych metabolitów przechodzących do ośrodkowego układu nerwowego (Samorajski, McCloud 1961; Vorbrodtt i wsp. 1981 a, 1983).

MATERIAŁ I METODY

Encefalopatię manganową wywoływano w taki sam sposób jak w poprzednich badaniach (Mossakowski i wsp. 1983). Szczury białe szczepu Wistar, samce o masie ciała około 120—150 g otrzymywały w okresie 4 tygodni 7 dożylnych iniekcji chlorku manganawego ($MnCl_2$) w fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Pełna podana dawka środka toksycznego w przeliczeniu na Mn^{++} wynosiła 250 mg/kg masy ciała. Dwie pierwsze iniekcje w dawce po 20 mg Mn^{++} /kg masy ciała podano w odstępach trzydniowych, trzy dalsze po 40 mg Mn^{++} /kg masy ciała w dwudniowych odstępach, a dwie następne (40 mg Mn^{++} /kg masy ciała) w odstępach jednodniowych. Szczury kontrolne otrzymywały w tym samym czasie dożylnie iniekcje fizjologicznego roztworu chlorku sodu. Zachowanie zwierząt doświadczalnych w okresie zatruwania i ich śmiertelność nie różniły się od uprzednio opisanych (Śmiałek, Mossakowski 1981). Z ogólnej liczby 38 zwierząt, poddanych zatruciu, 17 padło. Padły przeważnie w czasie podawania środka toksycznego albo bezpośrednio po iniekcji. Przez cały okres doświadczenia szczury nie wykazywały objawów neurologicznych, stawały się jednak mniej ruchliwe i traciły łaknienie.

Badania histochemiczne obejmowały ocenę aktywności cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Badanie przeprowadzono bezpośrednio po podaniu ostatniej dawki $MnCl_2$, po upływie 24 godzin i po 7 dniach. Każda grupa czasowa obejmowała 4 zwierzęta (3 doświadczalne i 1 kontrolne).

Szczury przeznaczone do badań aktywności cyklazy adenylowej (AC) uśmiercano przez dekapitację. Mózgi natychmiast wyjmowano z jamy czaszki, oziębiano na lodzie i dzielono na dwie półkule. Z półkuli prawej, przeznaczonej do badań w mikroskopie świetlnym, pobierano bloki tkankowe, które po zatopieniu w „Tissue-tekk” zamrażano w suchym lodzie i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 20 μm . Z półkuli lewej, przeznaczonej do badań w mikroskopie elektronowym, pobierano bloki tkanki o wymiarach 1 mm^3 z okolicy jąder podstawy i spoidła wielkiego. W celu uwidocznienia aktywności cyklazy adenylowej zarówno skrawki kriostatowe, jak i nieutrwalone bloki tkankowe podda-

wano trzem kolejnym etapom preparatyki histochemicznej, obejmującej proces utrwalania, aktywacji enzymu i właściwej inkubacji według metody opisanej uprzednio przez Szumańską i wsp. (1984) oraz Vorbrodta i wsp. (1984).

Utrwalanie przeprowadzano w świeżo przygotowanym płynie utrwalającym zawierającym cukrozę (0,2 M), 5% dwumetylo-sulfoxid (DMSO), kwas askorbinowy (0,1 mM), 1% paraformaldehyd w buforze kakodylowym, pH 7,4 oraz aktywatory reakcji: 1-izoproterenol (0,1 mM) i sól sodową guanylylimidodwufosforanu GMP (PNP) (0,1 mM). Utrwalanie przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

Płyn aktywujący zawierał wyżej wymienione aktywatory rozpuszczone w buforze kakodylowym, pH 7,4. Aktywację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Płyn inkubacyjny zawierał sól sodową 5'-adenylyl-imido-dwufosforanu (AMP-PNP), wyżej wymienione aktywatory, inhibitor fosfo-dwuesterazy oraz chlorek strontu (SrCl_2), przekształczany następnie pod wpływem octanu ołowiu, w widoczny w mikroskopie elektronowym fosforan ołowiu, rozpuszczone w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH 9,0. Końcowe pH płynu inkubacyjnego wynosiło 8,5—8,7. Inkubację przeprowadzano w temperaturze pokojowej w ciągu 1—3 godzin.

Po inkubacji skrawki kriostatowe wywoływano w roztworze wielosiarczku amonu, płukano w 0,2 M cukrozie i zamykano w glicerożelatynie. Bloki tkanki przeznaczone do badań w mikroskopie elektronowym płukano w 0,2 M cukrozie, utrwalano dodatkowo w 1% czterotlenku osmu w buforze kakodylowym, pH 7,2 barwiono en bloc w 0,5% octanie uranylu przez 1 godzinę, odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w żywicy „Spurr”. Kontrolę swoistości odczynu histochemicznego wykonywano inkubując materiał bez substratu i bez aktywatorów oraz z zastosowaniem wybiórczych inhibitorów

Zwierzęta przeznaczone do badań aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) zabijano za pomocą przezsercowej perfuzji płynem składającym się z 2% paraformaldehydu i 1% aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylowym, pH 7,3. Czas perfuzji wynosił około 20 minut. Po perfuzji mózgi wyjmowano z jamy czaszki, przeznacząc jedną półkulę do badań w mikroskopie świetlnym, a drugą do mikroskopii elektronicznej.

Bloki tkanki przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym skrawano na mikrotomie zamrożeniowym na wolnopływające skrawki o grubości około 20 μm . Błoczki tkanki o wymiarach około 1 mm^3 przeznaczone do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano w okolicy jądra ogoniastego i spoidła wielkiego. Wolno pływające skrawki i błoczki tkankowe utrwalano następnie w płynie perfuzyjnym, bacząc aby łączny okres perfuzji i utrwalania immersyjnego nie przekraczał 1,5 godziny.

Reakcję histochemiczną służącą ujawnieniu aktywności fosfatazy zasadowej przeprowadzano według metody Mayahara i wsp. (1967) w mo-

dyfikacji Vorbrodta i wsp. (1981 a). Płyn inkubacyjny zawierał: 0,01 M α -glicerofosforan sodu, 0,1 M Tris-malleinian, 0,005 M chlorek magnezu ($MgCl_2$) oraz 0,002 M cytrynian ołowiu. Końcowe pH roztworu inkubacyjnego wynosiło 9,2. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 45 minut. Płyn inkubacyjny w kontroli swoistości odczynu histochemicznego zawierał dodatkowo 0,5 mM hydrochlorek lewamisolu, stanowiący inhibitor FZ (Borgers 1973).

Skrawki do badań w mikroskopie świetlnym montowano w sposób typowy na szkiełkach podstawowych. Bloczki do badań mikroskopowo-elektronowych przeprowadzano rutynowo do zatopienia w żywicy „Spurr”.

Materiał do badań ME skrawano na ultramikrotomie LKB, montowano na siatkach oraz oglądano i wykonywano zdjęcia w mikroskopie elektronowym JEM 100 Cx lub Philips 300*.

WYNIKI

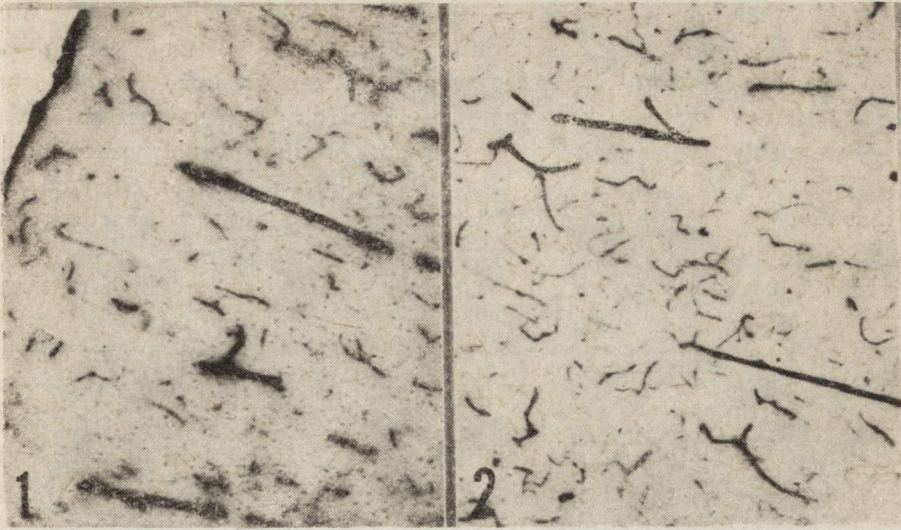
Aktywność cyklazy adenylowej

Badania w mikroskopie świetlnym. U zwierząt kontrolnych reakcja histochemiczna występowała w naczyniach krwionośnych mózgowia i w splotach naczyńkowych. Wyrysowywała ona ściany naczyń we wszystkich strukturach OUN, zarówno w istocie szarej (ryc. 1) jak i białej. Intensywność odczynu była wyraźnie wyższa w naczyniach większych niż w sieci włósczkowej (ryc. 1). Nie obserwowano przy tym różnic nasilenia reakcji w licznych naczyniach włosowatych istoty szarej i ubogiej sieci kapilar w istocie białej.

U zwierząt badanych bezpośrednio po zatruciu odczyn histochemiczny był znacznie słabszy (ryc. 2); spadek ten był większy w naczyniach istoty białej niż szarej. Było to wyraźnie widoczne w zwojach podstawy, w których naczynia pęczków pallido-striatalnych pozbawione były całkowicie produktu reakcji histochemicznej lub wykazywały znaczne zróżnicowanie intensywności odczynu w różnych odcinkach (ryc. 3). W korze mózgu, w której obniżenie intensywności odczynu histochemicznego było mniej wyraźne niż w jądrach podstawy, stwierdzano naczynia o zróżnicowanym nasileniu reakcji oraz drobne pólka z całkowicie bezodczynowymi naczyniami włosowatymi. Znaczne osłabienie odczynu w stosunku do kontroli występowało również w splotach naczyńkowych.

U zwierząt badanych w 24 godziny po zatruciu utrzymywało się nadal osłabienie odczynu histochemicznego, jakkolwiek było ono mniej wyraźne niż w grupie poprzedniej (ryc. 4). Niekiedy stwierdzano wyższy odczyn w naczyniach istoty białej niż w formacjach szarych.

* Zdjęcia wykonano w Instytucie Anatomii Uniwersytetu w Helsinkach oraz w Instytucie Ochrony Pracy w Helsinkach.

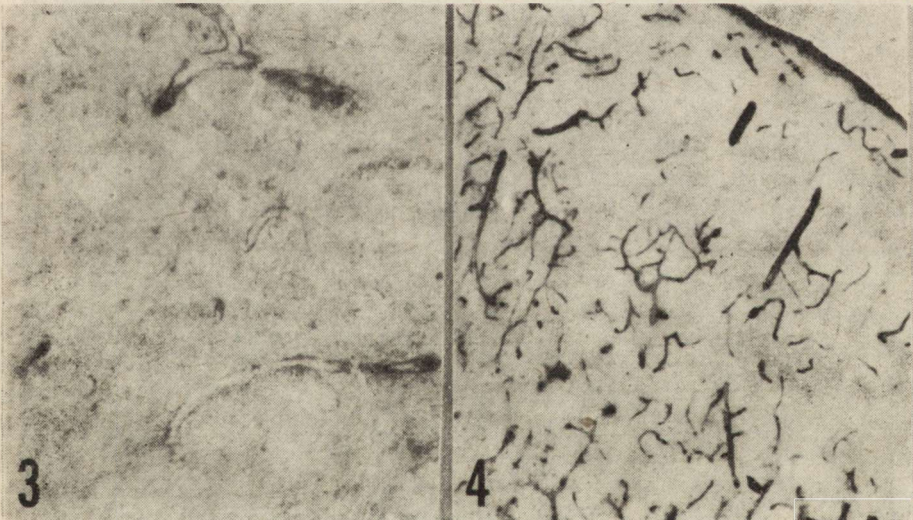


Ryc. 1. Kontrola. Kora mózgu. Cyklaza adenylova. Reakcja dodatnia w kapilarach oraz silniejsza w większych naczyniach mózgowych. Pow. 60 ×

Fig. 1. Control rat. Cerebral cortex. Adenylyl cyclase activity. Positive reaction in capillary vessels, more pronounced in vessels of greater caliber. × 60

Ryc. 2. Czas 0 (zwierzę zabite natychmiast po ostatniej dawce maganu). Kora mózgowa. Cyklaza adenylova. Spadek aktywności enzymatycznej w sieci kapilarów. W naczyniach większych reakcja silna. Pow. 60 ×

Fig. 2. Time 0 — rat sacrificed directly after last injection of $MnCl_2$. Cerebral cortex. Adenylyl cyclase activity. Decrease of enzyme activity in capillary network. Strong reaction in blood vessels of greater caliber. × 60



Ryc. 3. Czas 0. Jądro ogoniaste. Wyraźny spadek aktywności cyklazy adenylowej w kapilarach. Pow. 200 ×

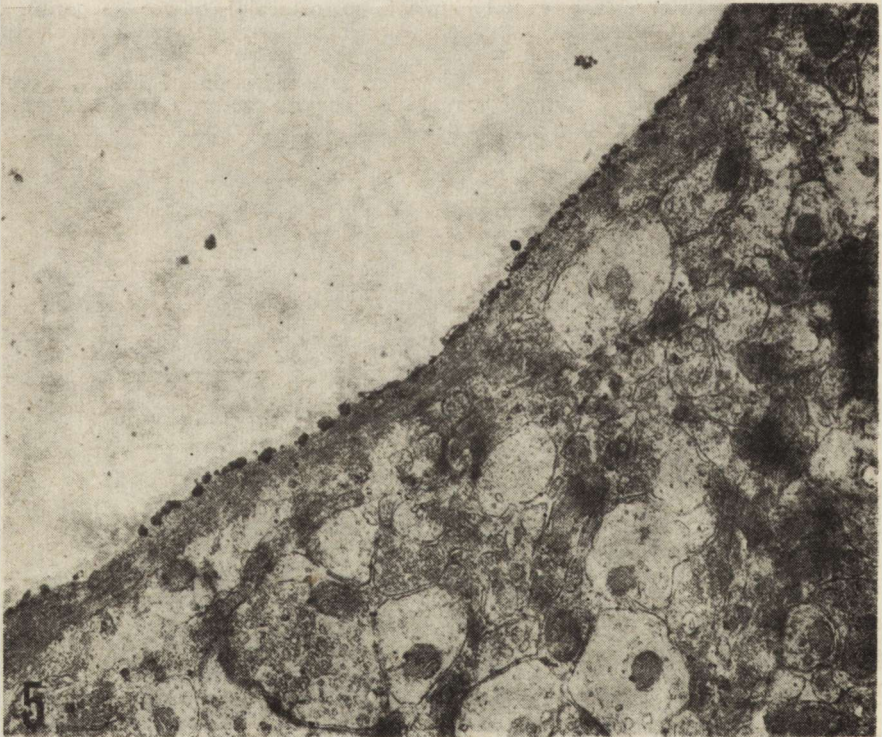
Fig. 3. Time 0. Caudate nucleus. Distinct decrease of adenylyl cyclase activity in capillary vessels. × 200

Ryc. 4. 24 godziny po ostatniej dawce maganu. Kora mózgowa. Wzrost aktywności cyklazy adenylowej wobec grupy 0. Pow. 60 ×

Fig. 4. Rat 24 h after last $MnCl_2$ injection. Increase of adenylyl cyclase activity in cerebral cortex in comparison with that at time 0. × 60

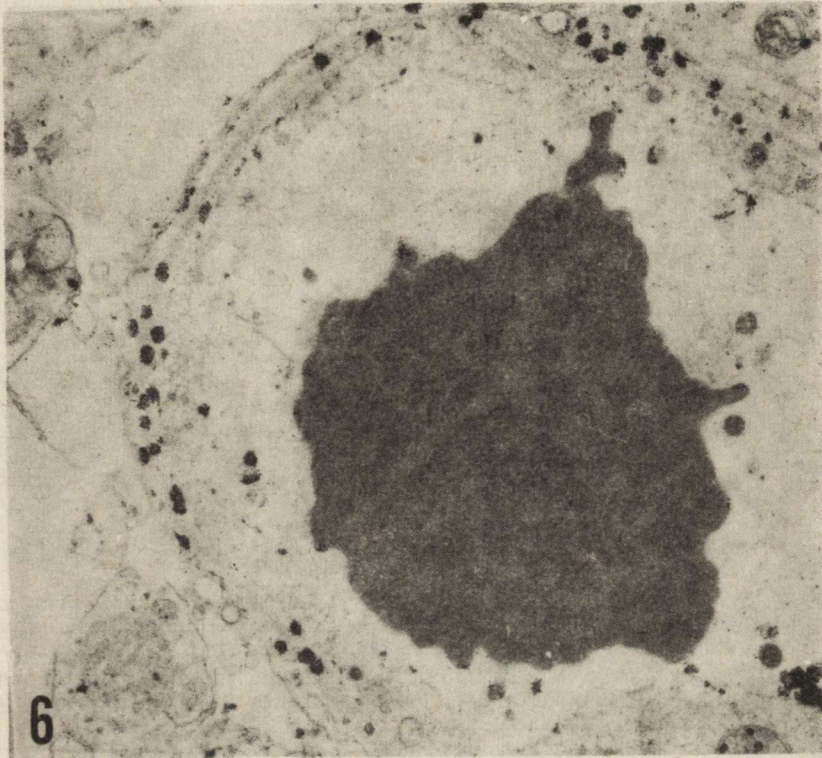
U zwierząt, które przeżyły 7 dni po ostatniej iniekcji $MnCl_2$, obraz reakcji histochemicznej przypominał opisany u zwierząt kontrolnych. Intensywność odczynu wyznaczającego sieć naczyń kory mózgu wydawała się nawet wyższa niż w materiale kontrolnym. Równocześnie zwracały uwagę naczynia pozbawione zupełnie produktów odczynu histochemicznego w istocie białej (spoidło wielkie) oraz znaczne zróżnicowanie intensywności reakcji w naczyniach jąder podstawy od bardzo silnej do śladowej. Część naczyń nie wykazywała jej w ogóle.

Badanie mikroskopowo-elektronowe. U zwierząt kontrolnych stwierdzono dwa wzorce rozmieszczenia produktów reakcji histochemicznej. W typie pierwszym, charakterystycznym przede wszystkim dla kapilarów, produkt reakcji związany był głównie z błoną komórkową śródbłonnków zwróconą do światła naczynia (powierzchnia luminalna) (ryc. 5) lub jej zagłębieniami i z pęcherzykami pinocytarnymi. W typie drugim, właściwym dla drobnych tętniczek, produkt reakcji wykazywał związek z luminalną i abluminalną błoną komórek śródbłonna oraz zwróconą do błony podstawnej powierzchnią wypustek komórek mięśni gładkich.



Ryc. 5. Kontrola. Kora mózgowa. Cyklaza adenylowa. Produkt reakcji enzymatycznej rozmieszczony na luminalnej błonie komórek śródbłonna. Pow. 9000 \times
 Fig. 5. Control rat. Cerebral cortex. Product of enzymatic activity distributed on luminal membrane of endothelial cell. Adenylate cyclase activity. \times 9000

U zwierząt zabijanych bezpośrednio i w 24 godziny po zatruciu stwierdzono wyraźnie uboższe niż w kontroli odkładanie się produktu reakcji histochemicznej zarówno w ścianach naczyń włosowatych (ryc. 6), jak i w tętniczkach. Bardzo często spotykano przekroje naczyń cał-



Ryc. 6. Naczynie włosowate z jądra ogoniastego. Czas 0. Produkt reakcji cykazy adenyłowej związany z błoną abluminalną kapilary. Reakcja osłabiona wobec kontroli. Pow. 4182 \times

Fig. 6. Rat after manganese intoxication. Time 0. Capillary vessel from caudate nucleus. The reaction product connected with abluminal membrane. Decreased reaction compared with that of control rat. Adenylate cyclase activity. $\times 4182$

kowicie pozbawione złogów produktu końcowego. Dotyczyło to głównie naczyń z obrzmiałymi komórkami śródbłonka, zawierającymi liczne pęcherzyki pinocytarne. Nierzadko stwierdzano naczynia włosowate, w których produkt reakcji ograniczał się wyłącznie do powierzchni komórek śródbłonka zwróconej do błony podstawowej.

U zwierząt zabijanych w 7 dniu po zatruciu odczyn histochemiczny przypominał na ogół obrazy kontrolne. Zwraçało jednak uwagę zróżnicowanie jego intensywności. W wielu naczyniach występowały bardzo znaczne złogi produktu końcowego reakcji (ryc. 7), w innych jedynie śladowe. W większości naczyń włosowatych, podobnie jak w normie, były one związane z luminalną błoną komórek śródbłonka.



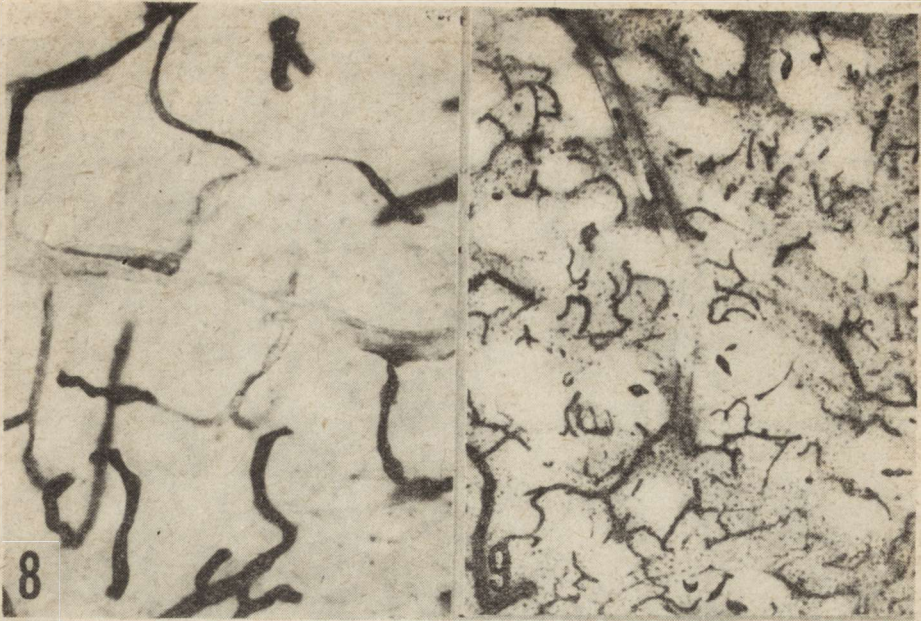
Ryc. 7. 7 dni po zatruciu manganem. Złogi produktu reakcji uwidaczniające cyklazę adenylową występującą zarówno w obrębie części luminalnej i abluminalnej śródbłonna, jak i w obszarze błony podstawnej. Pow. 3440 \times

Fig. 7. Rat 7 days after $MnCl_2$ intoxication. Products of enzymatic reaction within luminal and abluminal endothelial membranes and in the basal lamina. Adenylate cyclase activity. $\times 3440$

Aktywność fosfatazy zasadowej

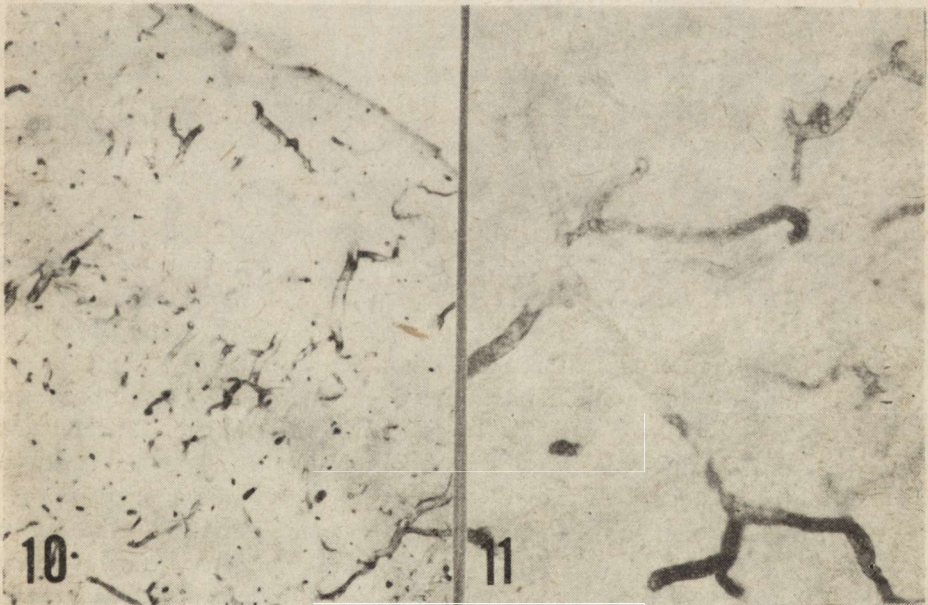
Badania w mikroskopie świetlnym. U zwierząt kontrolnych produkt reakcji histoenzymatycznej wyznaczał sieć naczyń włosowatych we wszystkich strukturach mózgu. Odwrotnie niż w przypadku cyklazy adenylowej, intensywność odczynu histochemicznego była najwyższa w naczyniach włosowatych i malała wraz ze wzrostem średnicy naczynia (ryc. 8). Wydawała się ona również wyższa w naczyniach formacji szarych (kora mózgu i zwoje podstawy) niż w istocie białej (ryc. 9). W większych powiększeniach naczynia włosowate mózgu wydawały się jednolicie „wypełnione” produktem reakcji histochemicznej.

U zwierząt zabijanych bezpośrednio po ostatniej iniekcji $MnCl_2$ stwierdzono bardzo znaczne obniżenie intensywności odczynu zarówno w istocie szarej mózgu, jak i białej (ryc. 10). Sieć naczyń włosowatych kory mózgu wydawała się „wypłukana” z produktu końcowego reakcji (ryc. 11). W jądrach podstawy wyznaczona przez odczyn histochemiczny sieć naczyńniowa była uboższa niż u zwierząt kontrolnych, co wskazy-



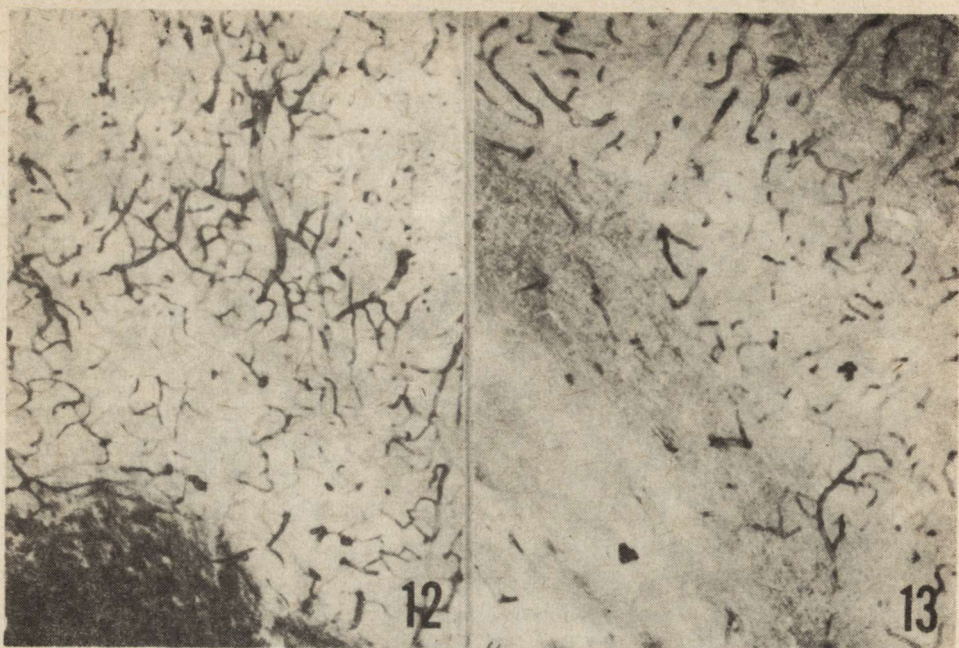
Ryc. 8. Kontrola. Kora mózgowa. Fosfataza zasadowa. Reakcja dodatnia w naczyniach włosowatych, słabnąca w miarę wzrostu średnicy naczyń. Pow. 200 ×
Fig. 8. Control rat. Cerebral cortex. Alkaline phosphatase activity. Positive reaction in capillary network declining with increase of vessels' caliber. × 200

Ryc. 9. Kontrola. Jądro ogoniaste. Fosfataza zasadowa. Pow. 60 ×
Fig. 9. Control rat. Alkaline phosphatase activity in caudate nucleus. × 60



Ryc. 10. Natychmiast po podaniu ostatniej dawki manganu (czas 0). Wyraźny spadek aktywności fosfatazy zasadowej w sieci naczyniowej kory mózgowej. Pow. 60 ×
Fig. 10. Time 0 — directly after last manganese injection. Distinct decrease of alkaline phosphatase activity in cortical vascular network. × 60

Ryc. 11. Czas 0. Włośniczki wydają się „wypłukane” z produktu reakcji wykazującej fosfatazę zasadową. Kora mózgowa. Pow. 200 ×
Fig. 11. Time 0. Capillary vessels in cerebral cortex seem to be washed away from reaction product. Alkaline phosphatase activity. × 200



Ryc. 12. 24 godziny po ostatniej iniekcji manganu. Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w sieci naczyniowej kory mózgowej. Pow. 60 ×

Fig. 12. Rat 24 h after last manganese injection. Increase of alkaline phosphatase activity in vascular network of cerebral cortex. × 60

Ryc. 13. 7 dni przeżycia po intoksykacji manganem. Zróżnicowana aktywność fosfatazy zasadowej w przebiegu poszczególnych naczyń. Ogólnie reakcja słabsza niż w kontroli. Pow. 60 ×

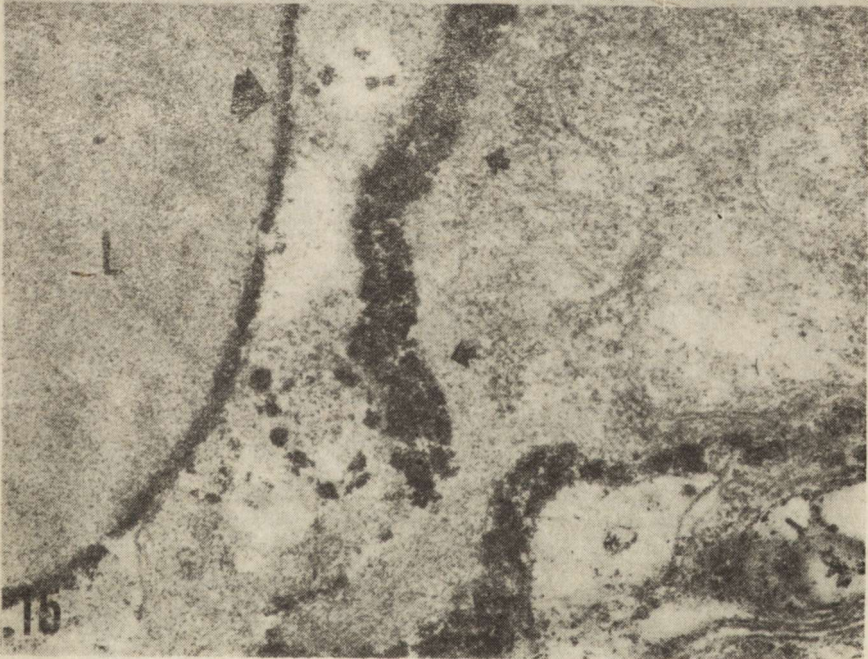
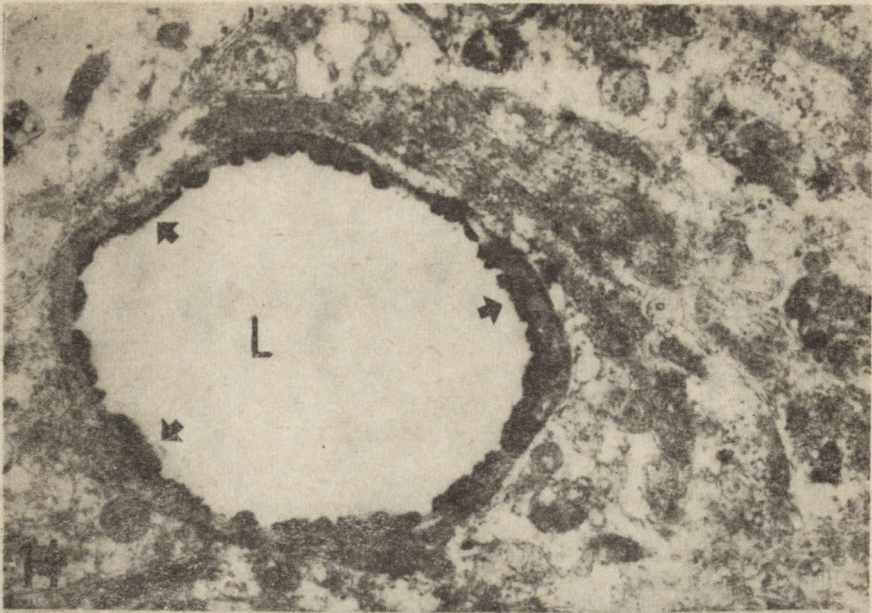
Fig. 13. Rat 7 days after intoxication. Different alkaline phosphatase activity along the course of particular vessels. Generally the reaction is less pronounced than in control. × 60

wało, iż w licznych naczyniach nie występował on w ogóle. Stwierdzało się również odcinkowe zróżnicowanie nasilenia odczynu na przebiegu tego samego naczynia. W istocie białej, a przede wszystkim w spoidle wielkim i w pograniczu korowo-podkorowym, występowały liczne naczynia pozbawione produktu reakcji histochemicznej.

W 24 godziny po zatruciu nasilenie odczynu było wyższe niż w grupie poprzedniej. Dotyczyło to zwłaszcza kory mózgu (ryc. 12). Zwraçało uwagę zróżnicowanie intensywności reakcji. Obok naczyń o odczynie wyższym niż w normie występowały naczynia z reakcją śladową.

Po 7 dniach odczyn histochemiczny był nadal znacznie słabszy niż u zwierząt kontrolnych (ryc. 13). Duże odcinki naczyń włosowatych nie zawierały w ogóle produktu końcowego, w innych stwierdzano jego znaczne nagromadzenie.

Badanie mikroskopowo-elektronowe. W materiale kontrolnym produkt reakcji histochemicznej ograniczony był wyłącznie do komórek śródbłónka włosniczek i tętniczek. Występował on w postaci



Ryc. 14. Kontrola. Jądro ogoniaste. Fosfataza zasadowa. Produkt reakcji na luminalnej błonie komórek śródbłonna. Pow. 3440 ×

Fig. 14. Caudate nucleus of control rat. Alkaline phosphatase activity. The reaction product on luminal membrane of endothelial cell. × 3440

Ryc. 15. 24 godziny po podaniu manganu. Produkt końcowy wykazujący miejsca aktywności fosfatazy zasadowej zgromadzony na luminalnej (duża strzałka) i abluminalnej (małe strzałki) błonie śródbłonna oraz na błonie podstawnej włosniczki. Pow. 17 220 ×

Fig. 15. Rat 24 h after manganese intoxication. The final reaction product accumulated on luminal (big arrow) and abluminal (small arrow) membranes and on the basal membrane of a capillary vessel. × 17 220



Ryc. 16. 7 dni po podaniu manganu. Produkt końcowy reakcji wyznaczający aktywność fosfatazy zasadowej zlokalizowany jest w obszarze błony abluminalnej (duża strzałka) i pogranicza z błoną podstawową śródbłonna (mała strzałka). Pow. 17 220 ×

Fig. 16. Rat 7 days after intoxication. The reaction product localized on the albuminal endothelial membrane (arrow) and at the border-line with the based lamina (small arrow). Alkaline phosphatase activity. × 17 220

drobnych nieregularnych ziarnistości związanych głównie z ich luminalną plazmolemmą (ryc. 14). Niekiedy występował również w pęcherzykach pinocytarnych.

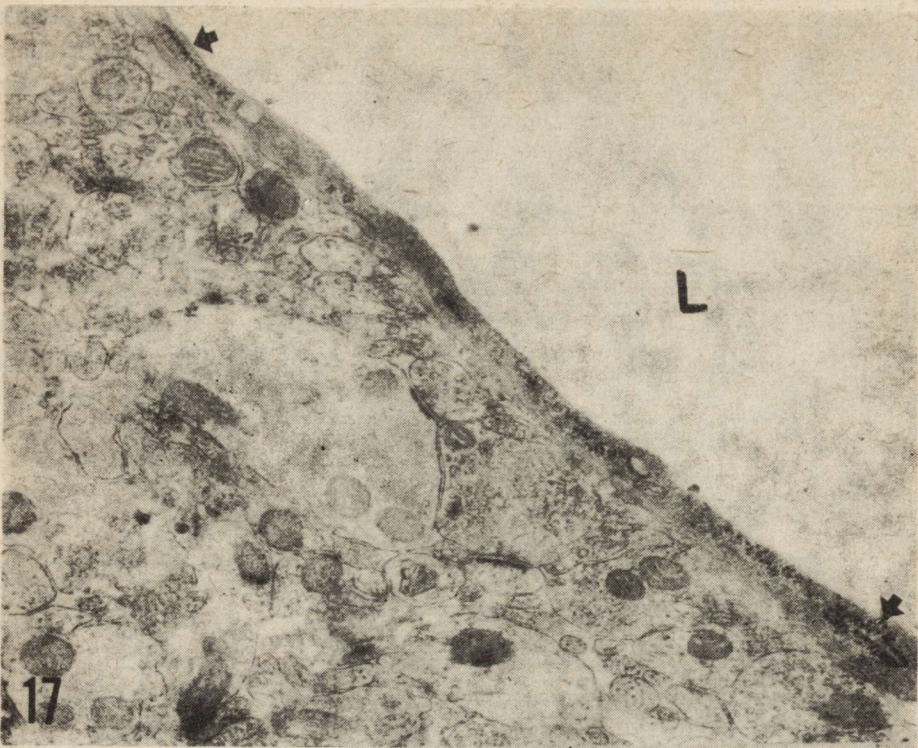
Wzorec zaburzeń obrazu histochemicznego u zwierząt doświadczalnych był wspólny dla wszystkich grup czasowych. Produkt reakcji histoenzymatycznej gromadził się nie tylko na powierzchni luminalnej komórek śródbłonna, lecz również na ich plazmolemme albuminalnej

Ryc. 17. 7 dni po podaniu manganu. Produkt reakcji fosfatazy zasadowej zlokalizowany w strukturach kanalikopodobnych śródbłonna (strzałki). Pow. 22 140 ×

Fig. 17. Rat 7 days after $MnCl_2$ intoxication. The reaction product localized in tubular-like structures of endothelial cell. Alkaline phosphatase activity. × 22 140

Ryc. 18. 7 dni po podaniu manganu. Fosfataza zasadowa. Reakcja negatywna we wszystkich strukturach naczyń. Pow. 3440 ×

Fig. 18. Rat 7 days after manganese injection. Negative reaction of alkaline phosphatase in all vascular structures. × 3440



i w błonie podstawnej (ryc. 15). Często spotykano śródbłonkowe struktury kanalikopodobne wypełnione produktem odczynu histochemicznego. Natomiast tylko część spośród licznych pęcherzyków pinocytarnych wypełniona była ziarnistościami produktu końcowego. Cechą charakterystyczną wszystkich grup czasowych było znaczne zróżnicowanie obrazu histochemicznego. W części naczyń włosowatych, podobnie jak w normie, odczyn ograniczał się do luminalnej plazmolemy komórek śródbłonka i jej głębokich wgłobień, w części związany był z ich powierzchnią abluminalną i błoną podstawną (ryc. 16), a w komórkach śródbłonka występowały struktury kanalikopodobne wypełnione produktem końcowym reakcji (ryc. 17). W niektórych naczyniach stwierdzano jego obfite nagromadzenie, w innych bardzo skąpe, a w innych nie stwierdzało się go w ogóle (ryc. 18).

OMÓWIENIE

Przedstawione obserwacje wskazują, że w zastosowanym modelu doświadczalnej encefalopatii manganowej występują zaburzenia aktywności cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w ścianie naczyń krwionośnych mózgu. Są one najsilniej wyrażone we wczesnym okresie po zatruciu, ale utrzymują się przez cały okres obserwacji. Zaznaczają się przy tym wyraźne różnice między obu badanymi enzymami, o ile bowiem histochemiczny obraz aktywności cyklazy adenylowej wykazuje tendencję do normalizacji w miarę wydłużania się czasu od zatrucia, o tyle morfologiczne wykładniki zaburzonej aktywności fosfatazy zasadowej są zjawiskiem bardziej trwałym, utrzymującym się do końca obserwacji.

Histochemiczne zaburzenia aktywności obu enzymów wyrażały się przede wszystkim wyraźnie zmniejszoną intensywnością odczynu, aż do zaniku włącznie, bardzo znacznym zróżnicowaniem jego nasilenia w poszczególnych naczyniach lub ich odcinkach, od bardzo silnego, przewyższającego w późniejszych okresach obserwacji występujący u zwierząt kontrolnych, do śladowego lub wręcz jego braku, i wreszcie zaburzeniem jego rozmieszczenia w elementach ściany naczyniowej. W warunkach prawidłowych aktywność cyklazy adenylowej w naczyniach mózgu wykazuje zróżnicowanie rozkładu. W naczyniach włosowatych związana jest ona z luminalną plazmolemą komórek śródbłonka i jej wgłobieniami oraz z pęcherzykami pinocytarnymi, w drobnych tętniczkach natomiast z luminalną i abluminalną powierzchnią śródbłonek i zwróconymi do błony podstawnej powierzchniami komórek mięśni gładkich (Wagner i wsp. 1972; Joó 1979; Panula, Rechar 1979; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). Rozkład ten ulegał wyraźnemu zaburzeniu po zatruciu manganem. Zmiany w cytologicznym rozkładzie aktywności fosfatazy zasadowej były jeszcze wyraźniejsze. U zwierząt kontrolnych

końcowy produkt reakcji histochemicznej odkłada się linijnie na luminalnej powierzchni komórek śródbłonka, rzadko wykazując związek z ich plazmolemmą abluminalną i nielicznymi pęcherzykami pinocytarnymi (Vorbrot i wsp. 1981 a; Kreutzberg, Toth 1983; Vorbrot i wsp. 1983). Sugeruje się, iż właśnie w obszarze luminalnej plazmolemmy komórek śródbłonka odbywa się proces defosforylacji różnych substancji metabolicznych transportowanych z krwi do mózgu (Vorbrot i wsp. 1981 a, b). Polarność ta ma warunkować w przypadku szeregu enzymów śródbłonek naczyń, w tym również fosfatazy zasadowej, enzymatyczną kontrolę procesów czynnego transportu (Betz i wsp. 1980). Ulegała ona wyraźnemu zaburzeniu w zatruciu chlorkiem manganawym. Produkt reakcji enzymatycznej w licznych naczyniach był w ogóle nieobecny na zwróconej do światła powierzchni komórek śródbłonka, a gromadził się obficie w ich plazmolemmie abluminalnej, w błonie podstawnej oraz w licznych pęcherzykach pinocytarnych i w kanalikopodobnych strukturach śródbłonek. To ostatnie zjawisko Lossinsky i wsp. (1981) wiąże szczególnie ze wzmożoną przepuszczalnością naczyń.

Całokształt stwierdzonych przez nas zaburzeń histochemicznych jest identyczny ze zmianami opisywanymi w przebiegu uszkodzenia mechanizmów bariery krew-mózg (Joó 1979; Joó i wsp. 1983; Vorbrot i wsp. 1981 a, b; 1983; Spatz, Mrsulja 1982). Są one również podobne do nieprawidłowości histoenzymatycznych, dotyczących szeregu fosfataz nukleozydowych w innych doświadczalnych stanach patologicznych przebiegających z uszkodzeniem bariery krew-mózg (Torack, Barnett 1964; Szumańska i wsp. 1976; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska 1981).

Opierając się na przedstawionych powyżej spostrzeżeniach i danych z piśmiennictwa można sądzić, że w zatruciu solami manganu dochodzi do upośledzenia mechanizmów bariery krew-mózg, z jego wszystkimi skutkami prowadzącymi do rozwoju ciężkich uszkodzeń tkanki. Są one zbieżne w czasie z obecnością morfologicznych wykładników naczyniopochodnego obrzęku mózgu. Patomechanizm naczyniopochodnego obrzęku mózgu nadal nie jest jednoznacznie wyjaśniony. W przeciwieństwie do wcześniejszych poglądów wiążących jego rozwój wyłącznie z uszkodzeniem ścisłych zespołów międzyśródbłonekowych (Rapaport 1970; Brightman i wsp. 1973), obecnie przyjmuje się alternatywny patomechanizm, uwarunkowany przechodzeniem białek surowicy krwi do tkanek mózgu drogą wzmożonego transportu pęcherzykowego w śródbłonekach naczyń (Joó 1971; Beggs, Waggener 1976; Westergaard i wsp. 1978). W regulacji tego zjawiska istotną rolę odgrywa cyklaza adenylova, zlokalizowana w śródbłonekach naczyń włosowatych (Joó 1972). Spostrzeżenia Wierzby (1984) w tym samym modelu doświadczalnej encefalopatii manganowej z użyciem peroksydazy chrzanowej, wskazujące na penetrację znacznika barierowego z krwi do tkanek mózgu przy nie-

zmienionym stanie zespołów ścisłych, sugerują w naszym materiale doświadczalnym ten właśnie mechanizm patogenetyczny naczyniopochodnego obrzęku mózgu. Potwierdzają to również przedstawione powyżej wyniki badań histochemicznych dotyczących aktywności cykazy adenylowej.

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛОВОЙ ЦИКЛАЗЫ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СОСУДАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ ХЛОРИСТЫМ МАРГАНЦОМ

Резюме

Авторы оценили на уровне светового и электронного микроскопа активность адениловой циклазы и щелочной фосфатазы в сосудах головного мозга крысы в отравлении хлористым марганцем. Марганцовую энцефалопатию они вызывали 7-кратным внутривентральным введением хлористого марганца в периоде I месяца в общей дозе 240 мг M^{++} /кг массы тела. Животных умерщвляли при помощи чрезсердечной перфузии фиксирующим средством непосредственно после отравления, спустя 24 часа и по истечении 7 дней.

В микроскопной и в электронно-микроскопной картине констатировано изменения гистохимической картины выражающиеся снижением активности обоих ферментов а также неправильной локализацией конечной реакции. Своим характером они напоминали нарушения описываемые в случаях повреждения гемато-энцефалического барьера. Они внушают ослабление активного транспорта в сосудах и повышение проницаемости сосудов для высокомолекулярных веществ. Они указывали также на то, что нарушения гемато-энцефалического барьера могут участвовать при развитии марганцовой энцефалопатии.

ADENYLATE CYCLASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE CEREBRAL BLOOD VESSELS OF THE RAT IN MANGANESE CHLORIDE INTOXICATION

Summary

Changes in the histochemical activity of adenylate cyclase and alkaline phosphatase in the cerebral microvessels of the rat were studied in manganese intoxication at the level of light- and electron microscopy. Manganese encephalopathy was induced by 7 intraperitoneal injections of manganese chloride in the course of one month in a total dose of 240 mg Mn^{++} /kg body weight. The animals were sacrificed by transcardiac perfusion of the appropriate fixatives immediately after last intoxication, 24 h and 7 days after it.

Light- and electronmicroscopic studies revealed alterations in the histochemical picture as compared with that of untreated animals, expressed by reduction of the activity of both enzymes and abnormalities in distribution of the reaction end product. They were similar in nature to those described as a result of changes in the blood-brain barrier. They suggest the existence of both disturbances of active transport mechanism and increased permeability for high molecular weight substances. The observed changes indicate that damage to the blood-brain barrier may play an important role in the pathogenesis of manganese encephalopathy.

PIŚMIENNICTWO

1. Beggs J. L., Waggener J. D.: Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord. *Lab. Invest.*, 1976, 34, 428—439.
2. Betz A. L., Firth J. A., Goldstein G. W.: Polarity of the blood-brain barrier. Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.*, 1980, 192, 17—28.
3. Bedonheimer T. S., Brightman M. W.: A blood brain barrier to peroxidases in blood vessels surrounded by perivascular spaces. *Am. J. Path.*, 1968, 122, 249—268.
4. Borgers M.: The cytochemical application of new, potent inhibitors of alkaline phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 812—824.
5. Brightman M. W., Hori M., Rapaport S. J., Reese T. S., Westergaard E.: Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J. comp. Neurol.*, 1973, 152, 317—326.
6. Dydyk L., Mossakowski M. J.: Ultrastructural alterations of the grey matter structures of the brain due to experimental manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 265—280.
7. Joó F.: Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Brit. J. Exper. Pathol.*, 1971, 52, 646—649.
8. Joó F.: Effect of N⁶O⁶-dibutyryl cyclic 3; 5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. *Experientia*, 1972, 28, 1470.
9. Joó F.: Significance of adenylate cyclase in the regulation of the permeability of brain capillaries. [W:] *Pathophysiology of cerebral energy metabolism*. Red.: B. B. Mrsulja, L. M. Rakić, I. Klatzo, M. Spatz. Plenum Press, New York 1979, 211—237.
10. Joó F., Temesvari P., Dux E.: Regulation of the macromolecular transport of the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res.*, 1983, 278, 165—174.
11. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—13.
12. Kreutzberg G. W., Toth L.: Enzyme cytochemistry of cerebral microvessel wall. [W:] *Cerebrovascular transport mechanisms*. Red.: K.-A. Hossmann, I. Klatzo. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. 8, 1983, 35—41.
13. Lossinsky A. S., Vorbrodt A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultracytochemical evidence for endothelial channel — lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 53, 197—202.
14. Mayahara H., Hirano H., Saito T., Ogawa K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of nonspecific alkaline phosphatase. *Histochemie*, 1967, 1, 88—96.
15. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983 a, 21, 393—410.
16. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1983 b, 21, 455—468.
17. Ostenda M., Szumańska G., Gadamski R.: Specific hydrolases activity in blood vessels of rabbit brain after circulatory hypoxia. [W:] *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. Polish Medical Publishers. Warsaw 1978, 60—66.

18. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neuroscience*, 1979, 4, 779—788.
19. Rapaport S. I.: Effect of concentrated solutions on blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol. Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 270—274.
20. Reese T. S., Karnowski M. J.: Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 207—212.
21. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability. *Lab. Invest.*, 1961, 10, 492—501.
22. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
23. Spatz M., Mrsulja B. B.: Progress in cerebral microvascular studies related to the function of the blood-brain barrier. *Advances in Cell Neurobiol.*, 1982, 3, 311—337.
24. Szumańska G., Ostenda M., Mossakowski M. J.: Aktywność nukleozyddwui trójfosfataz w mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 197—207.
25. Szumańska G.: Badania ultrastrukturalne fosfataz nukleozydowych w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 551—573.
26. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1984, 62, 219—224.
27. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleotide phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. exper. Neurol.*, 1964, 23, 46—59.
28. Vorbrodth A. W., Lassmann H., Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S.: Ultracytochemical studies of the blood-meningeal barrier (BMB) in rat spinal cord. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981 a, 55, 113—123.
29. Vorbrodth A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981 b, 53, 203—211.
30. Vorbrodth A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. 8, 1983, 43—57.
31. Vorbrodth A. W., Szumańska G., Dobrogowska D. H.: Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 1984, 32, 275—284.
32. Wagner R. C., Kreiner P., Barrette R. J., Bitensky M. W.: Biochemical characterization and cytochemical localization of catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated brain capillary endothelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3175—3179.
33. Westergaard E., Go G. K., Klatzo I., Spatz M.: Enhanced vesicular transport of horseradish peroxidase across cerebral vessels induced by ischemia in Mongolian gerbils. [W:] *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. Polish Medical Publishers, Warsaw 1978, 53—59.
34. Wierzba T.: Badanie ultrastrukturalne bariery krew-mózg dla peroksydazy chrzanowej u szczurów po zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1984 (w druku).

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

BARBARA GAJKOWSKA, ANNA ZARĘBA-KOWALSKA

THE EFFECT OF LITHIUM ON CULTURED NERVOUS TISSUE

Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw

Most accounts of the history of lithium therapy begin with the report by Cade in 1949 of an anti-manic action of lithium salts in a small group of patients. Lithium is being used in the treatment of affective disorders, such as hyperactivity in children and manic-depressive disorders in adults. It was reported that it has also partial anti-psychotic effects in schizophrenia (Hirschowitz et al. 1980). The mechanism of anti-manic effects of lithium is not enough understood, however, it is believed to involve catecholamine neurotransmission in the central nervous system (Bunney, Murphy 1976).

Numerous reports indicated a teratogenic effect of lithium on development and reproduction. It was found in amphibians that lithium may produce abnormalities of the central nervous system (Schou 1957). The abnormalities in the nervous tissue seem to depend mostly upon electrolyte and osmotic disturbances in the neurons in prolonged lithium intoxication. Lithium passes from the circulation into neurons where it becomes highly concentrated. It causes a shift of sodium and potassium from the cells into the intercellular spaces (Katzman, Pappius 1973). Having replaced sodium inside the neurons lithium does not leave the nerve cells easily (Dieling et al. 1969). Trautner et al. (1958) and Johansen and Urlich (1969) reported a teratogenic effect of lithium on rat fetuses. A high dose-related incidence of cleft palate was noted in mouse fetuses from mothers treated with lithium (Szabo 1970). Mroczka et al. (1983) observed delayed postnatal growth and development after mating pairs of mice kept continuously on drinking water containing 50 mEq/l LiCl_2 . The development effect of lithium noted here may be due to some interaction with hormones since some endocrine tissues have the ability to concentrate lithium (Stern et al. 1977). The effect

of lithium on some hormonal functions may be mediated by its possible inhibition of adenylate cyclase activity which would prevent an increase in intracellular cyclic AMP (Gelfand et al. 1979).

Weinstein and Goldstein (1973), on the other hand, found no fetal abnormalities in humans treated with lithium. We are inclined to agree with those authors who stated that most reported cases of lithium teratogenicity in nonhuman mammals resulted from either single large doses or multiple doses in excess of 5—6 times those used clinically. It seems that variations in the effects found may be due to the differences in dosage of lithium used, mode of administration or duration of treatment in the various experiments.

This led us to study the direct effect of lithium on nervous tissue maturing *in vitro*. In the present work, ultrastructural changes were studied with the use as a simple experimental model of organotypic cultures of cerebellum, hypophyseal neural lobe and striatum deriving from newborn rats treated with lithium carbonate in a dose corresponding to a clinically used twenty-four-hour dose.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on 14 organotypic cultures of cerebellum, 12 cultures of hypophyseal neural lobe and 12 cultures of striatum which derived from newborn rats of both sexes. The tissue sections were explanted on collagen-coated coverslips and kept in Carrel flasks. The nutrient medium, changed twice weekly, consisted of 50% human serum, 40% Earle's solution, pH 7.2, and 10% 9-day-old chicken embryo saline extract. It was supplemented with glucose 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 living state by light microscopy. Selected 14-day-old cultures were treated with lithium carbonate, added to the culture medium in a single dose of 8 mg% for three days. Control experiments were simultaneously carried out in which tissue were cultured without lithium carbonate. For light microscopy, the cultures were fixed in 10% formaldehyde and stained with hematoxylin-eosin. The influence of lithium on mitosis was analyzed in three experimental and three control cultures of cerebellum (Table 1). The number of mitotic cells in relation to the general number of cells in ten areas of culture, both in the explant and in the outgrowth zone was counted at a magnification $\times 400$. The percentage of mitotic cells was estimated.

For electron microscopy the 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 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 1 h and postfixed for 1 h in 1.5% osmium tetroxide

Table 1. Influence of lithium carbonate on mitotic activity in cerebellum cultures
 Tabela 1. Wpływ węglanu litu na aktywność mitotyczną w hodowli mózdzku

Culture Hodowla	Experimental Hodowla doświadczalna		Control Kontrola	
	number of cells counted liczba komórek	number and (%) of mitotic cells liczba i (%) ko- mórek mitotycznych	number of cells counted liczba komórek	number and (%) of mitotic cells liczba i (%) ko- mórek mitotycznych
I	1400	39 (2.9)	1400	25 (1.8)
II	1400	51 (3.1)	1400	19 (1.4)
III	1400	42 (3.0)	1400	24 (1.6)
Total Razem	4200	132 (3.0)	4200	68 (1.6)

in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2. After dehydration the cultures were embedded in Epon 812, and thin sections counter stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEM 7A electron microscope.

RESULTS

Light microscopy observations are summarized in Table 1. Lithium carbonate added to the culture medium markedly increased the percentage of mitotic cells in the cerebellum cultures. Mean values were 3% of mitotic cells for experimental and 1.6% for control cultures of cerebellum, respectively. Figure 1 shows the distribution of mitoses in the experimental cultures.

In comparison with controls, organotypic cultures of rat cerebellum subjected to lithium influence exhibited ultrastructural changes in both nerve and glia cells.

The basic ultrastructural features of neurons could be summarized as follows: markedly enlarged nucleus; centrally located, irregular in shape, rich in chromatin with heterochromatin aggregated beneath the nuclear envelope (Figs. 2, 3). The prominent nucleolus consisted of fibrillar, granular and amorphous parts and perinucleolar chromatin. Abundant rough endoplasmic reticulum in the form of numerous narrow, long and parallelly running channels was thickly and regularly covered with ribosomes. Numerous free ribosomes and polyribosomes were also observed. Enlarged Golgi apparatus mingled with other cell organelles. Numerous and well preserved mitochondria and numerous granulated vesicles, some of them showing close association with rough endoplasmic reticulum (RER) profiles were observed. These vesicles usually contained an electron-dense core or dark central dots (Figs 2 a,

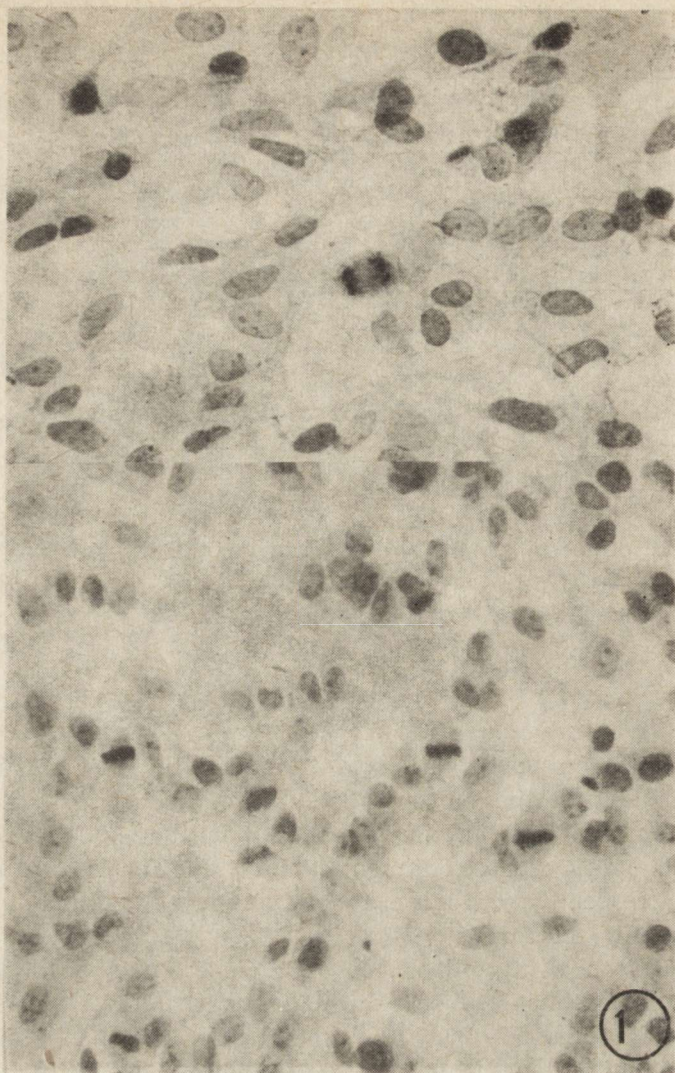


Fig. 1. Culture of cerebellum. An area of well differentiated glial cells with numerous mitotic divisions. $\times 400$

Ryc. 1. Hodowla mózdzku. Liczne podziały mitotyczne komórek glejowych. Pow. $400 \times$

b). In size and morphology, they resembled secretory granules of very active secretory cells. Both the perikarya and the numerous cell processes contained neurotubules and neurofilaments.

Glial cells of rat cerebellum exhibited morphological features of both karyokinesis and cytokinesis, this suggesting numerous mitotic cell divisions. Numerous glial cells showed ultrastructural manifestations of different phases of mitosis (Figs 5, 6). In many cells the occurrence of a mitotic spindle was observed. Centrioles and microtubules forming



Fig. 2 a. Culture of cerebellum. Nerve cell with large, irregular nucleus containing a very dense nucleolus and abundant RER. $\times 12\ 150$

Ryc. 2 a. Hodowla mózdzku. Komórka nerwowa z dużym jądrem o nieregularnym kształcie i elektronowogęstym jąderkiem z obfitą RER. Pow. 12 150 \times

Fig. 2 b. Culture of cerebellum. Numerous granulated vesicles closely associated with parallel RER profiles (arrows). $\times 12\ 150$

Ryc. 2 b. Hodowla mózdzku. Pęcherzyki z ziarnistą zawartością w ścisłym kontakcie z kanałami RER, ułożonymi równolegle (strzałki). Pow. 12 150 \times

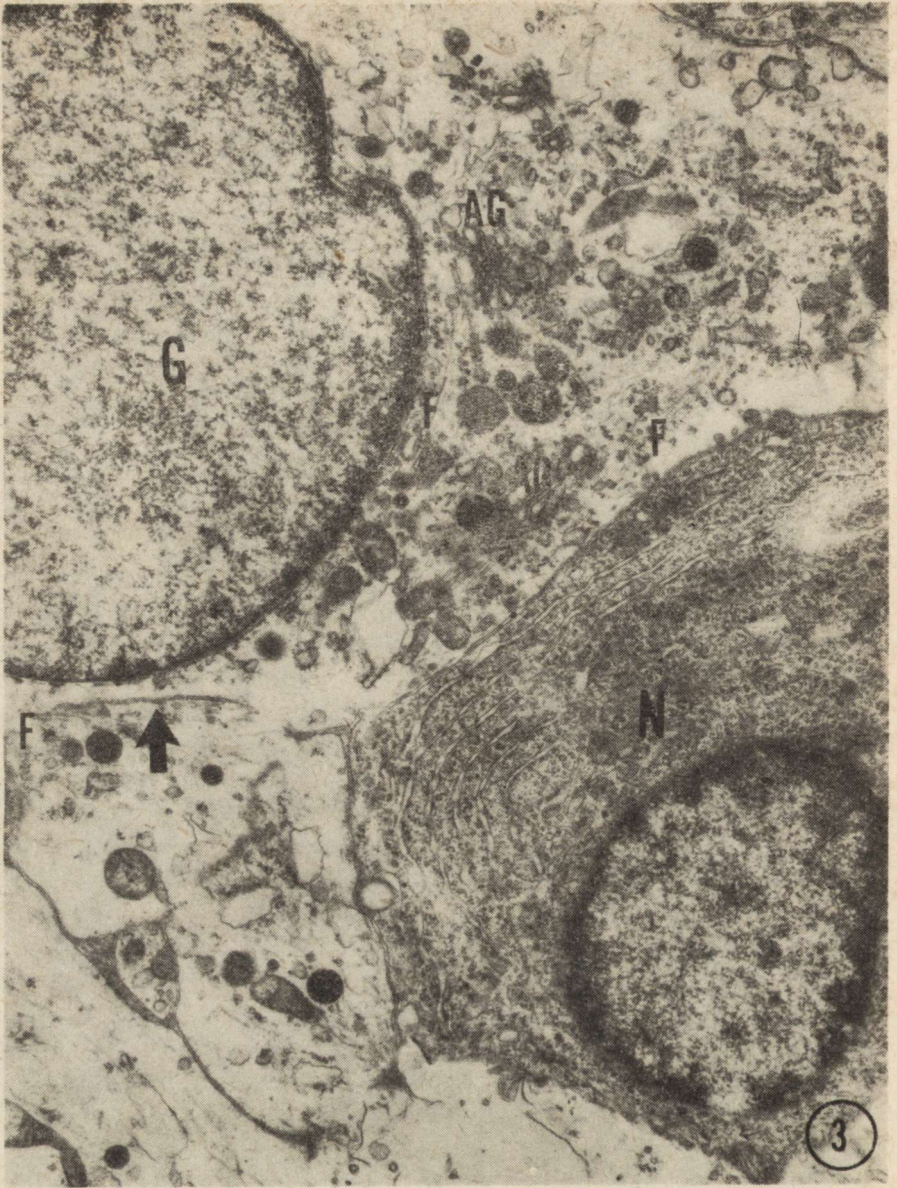


Fig. 3. Culture of cerebellum. Fragment of a neuron with hypertrophic RER. In glial cell (G) "ring" membrane in the vicinity of nucleus (arrow). Filaments (F), dense bodies, lysosomes and vesicular Golgi apparatus (AG) are present.
 × 12 150

Ryc. 3. Hodowla mózdzku. We fragmencie neuronu obfita RER. W komórce glejowej (G) błona „pierścieniowa” (strzałka) w pobliżu jądra. Filamenty (F), ciała gęste, lizosomy oraz pęcherzykowaty aparat Golgiego (AG) obecne są w cytoplazmie. Pow. 12 150 ×

mitotic spindles could also be seen (Fig. 4). These structures are considered to be responsible for the contraction activities of the mitotic spindle and constitute a kind of skeleton maintaining the direction of chromosome movement. Some cells were in the latter half of prophase while others were in prometaphase. The latter was manifested by the disintegration of the nuclear envelope. Morphological features of late metaphase and early anaphase were also found. Ultrastructurally, anaphase was manifested by the presence of short, separated daughter chromosomes, lying loosely in the cytoplasm (Fig. 5). Telophase was manifested by the presence of two separated nuclei (Fig. 6). Interphase glial cells were characterized by an increased amount of filaments often aggregated in bundles and microtubules. Numerous dense bodies and secondary lysosomes were also observed (Figs 3, 4). Some cells contained "ring" membranes in the vicinity of the nucleus. "Ring" membranes may be interpreted as "replicas" containing nuclear material passing from the nucleus to the cytoplasm. Many cells possessed cilia.

In cultured pituicytes treated with Li^+ the frequent observation of karyokinesis and cytokinesis is evidence of numerous cell divisions. The interphase pituicytes contained hypertrophied RER. Frequently distended RER channels, covered with ribosomes, as well as interpituicytic spaces, were abundantly filled with a homogeneous, flocculent material of moderate electron density (Figs 7, 8). Prominent Golgi apparatus occupied large areas of the cytoplasm. Granular vesicles, pinched off from the Golgi profiles (Figs 7, 9). A characteristic feature was the presence of numerous filaments forming bundles in the cytoplasm (Figs 8, 9).

In cultures of striatum treated with Li^+ , changes were also observed in both neurons and glial cells. The majority of nerve cells displayed morphological features of activation (Fig. 10). Moreover, some cells exhibited ultrastructural abnormalities of the nuclear envelope (Fig. 11). Enlarged spaces between the external and internal membranes of the nuclear envelope contained flocculent material. The nuclei and nucleoli of these cells did not show ultrastructural changes, RER was poorly developed and irregularly covered with ribosomes (Fig. 11). Polyribosomes were rarely observed. Granular vesicles were observed in close association with or in the vicinity of some RER channels (Fig. 11). Neurotubules and neurofilaments were irregularly distributed in the cytoplasm. Electron micrographs showed the fibrous masses to be composed of felt-like undirected filaments (Figs 10, 11). Alterations appeared as a swelling of the mitochondria in some neurons, whereas the majority of the cells were intact. Some swollen mitochondria had an electron-lucent matrix and shortened, peripherally displaced cristae. In some glial

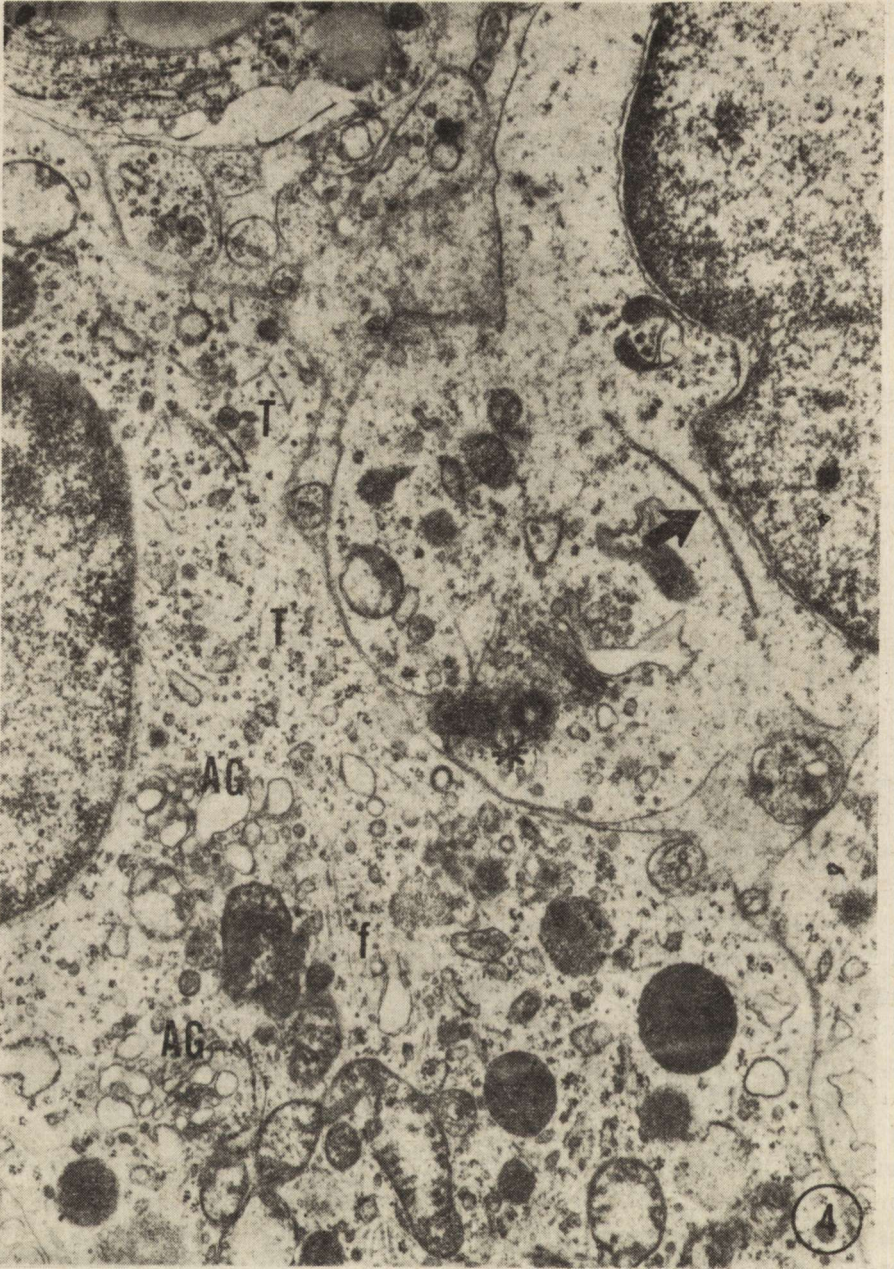


Fig. 4. Culture of cerebellum. Glial cells. In some of them note centrioles from which tubules arise (asterisk) and "ring" membrane (arrow). In the second cell abundant organelles, prominent Golgi apparatus (AG), dense bodies, lysosomes, tubules (T), filaments (f) are present. $\times 12\ 150$

Ryc. 4. Hodowla mózdzku. Komórki glejowe. W jednej widoczna centriola i odchodzące od niej tubule (gwiazdka) oraz błona „pierścieniowa” (strzałka). W drugiej — obfita ilość organelli, dobrze rozwinięty aparat Golgiego (AG), ciała gęste, lizosomy, tubule (T) i filamenty (f). Pow. 12 150 \times

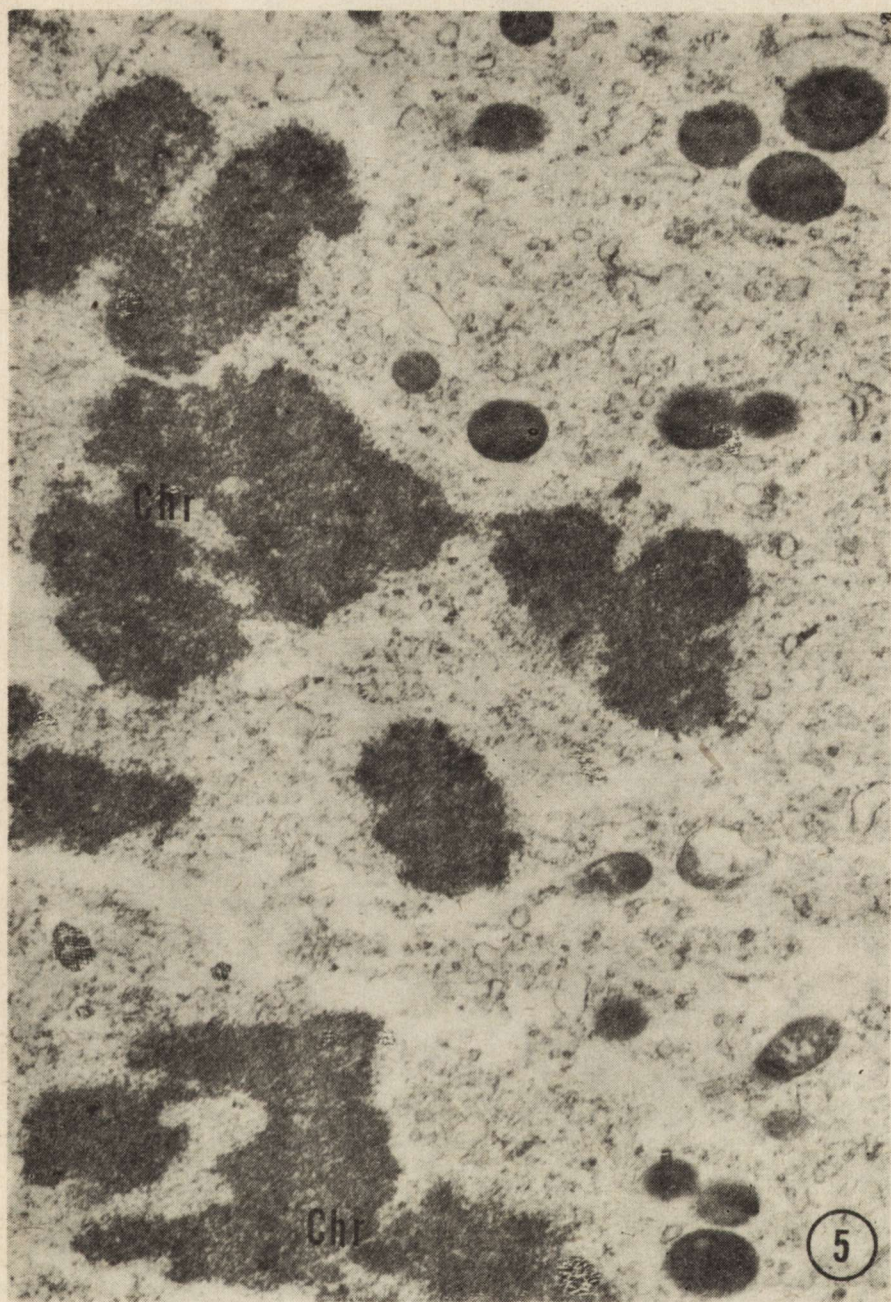


Fig. 5. Culture of cerebellum. Glial cell. Pairs of separated daughter chromosomes (Chr) lying loosely in the cytoplasm. $\times 12\ 150$

Ryc. 5. Hodowla mózdzku. Komórka glejowa. Luźno leżące w cytoplazmie rozdzielone siostrzane chromosomy (Chr). Pow. $12\ 150 \times$

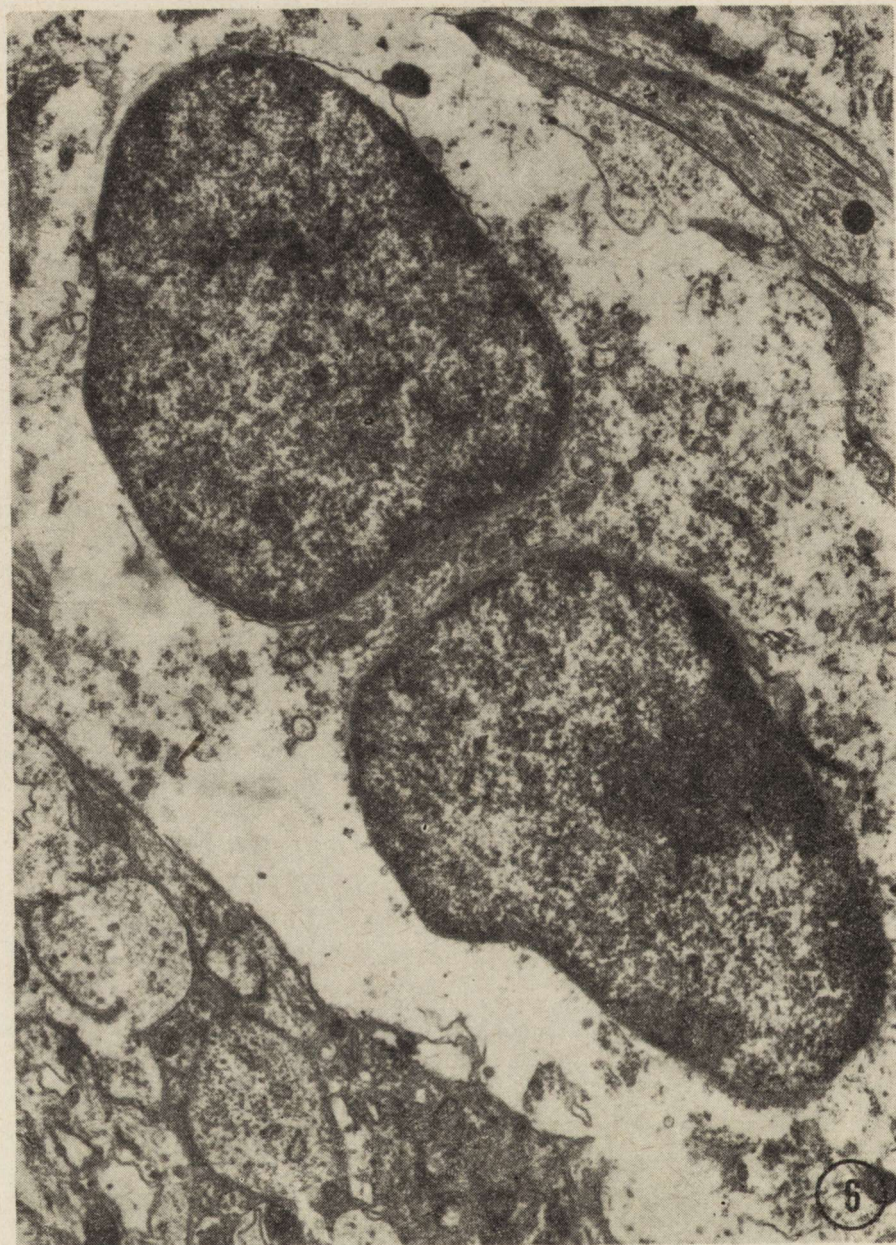


Fig. 6. Culture of cerebellum. Glial cell in telophase. In cytoplasm two nuclei after division are visible. $\times 12\ 150$

Ryc. 6. Hodowla mózdzku. Komórka glejowa w stadium telofazy. W cytoplazmie widoczne dwa jąderka po podziale. Pow. $12\ 150 \times$

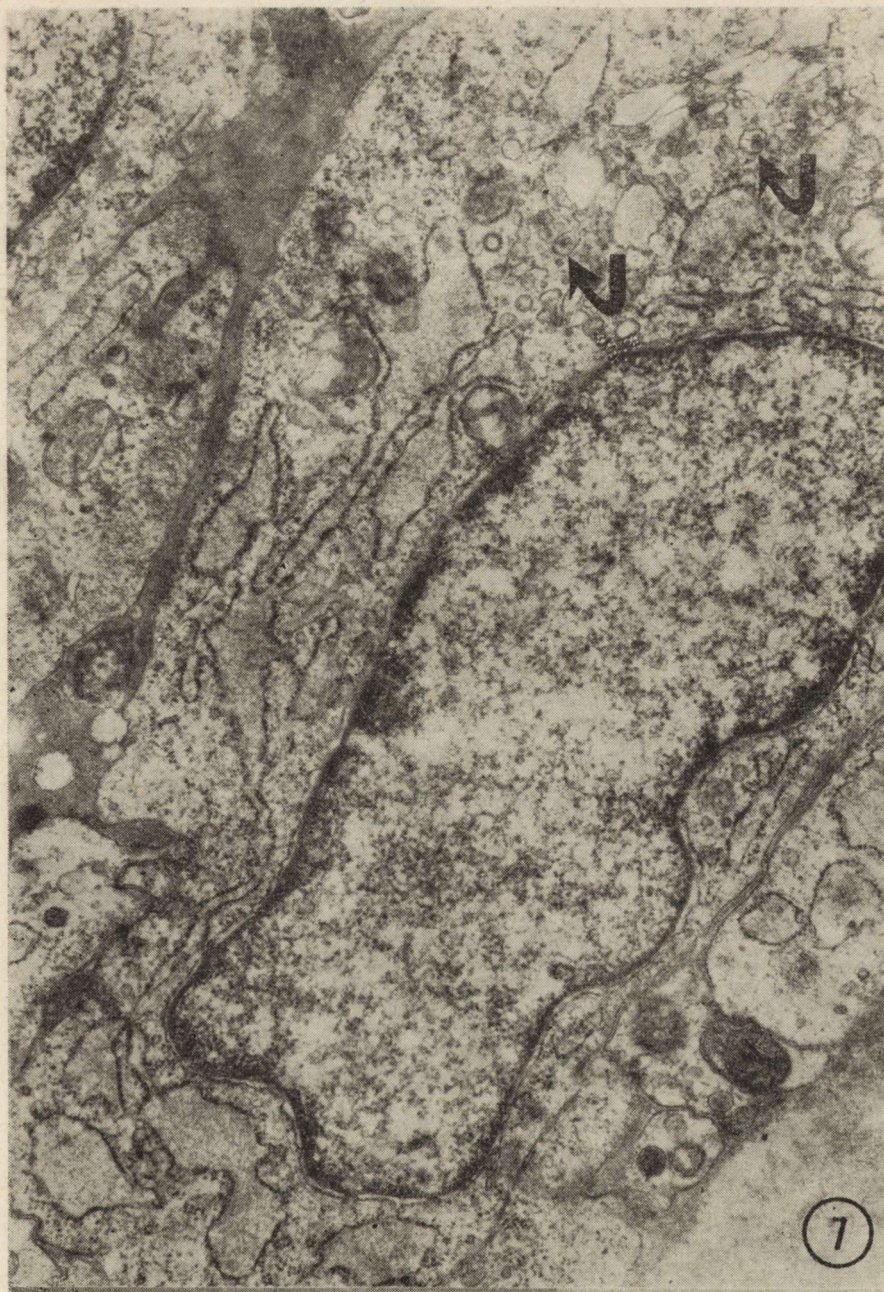


Fig. 7. Culture of hypophyseal neural lobe. Note distended RER channels densely covered with ribosomes and filled with electron-dense material. Golgi apparatus with granular vesicles pinched off from Golgi profiles (arrows).
 × 28 800

Ryc. 7. Hodowla płata nerwowego przysadki. W cytoplazmie poszerzone kanały RER gęsto pokryte rybosomami i wypełnione włókninkowatym elektronowo-gęstym materiałem. Rozbudowany aparat Golgiego z ziarnistymi pęcherzykami odpączkowującymi lub znajdującymi się w pobliżu aparatu Golgiego (strzałki). Pow.
 28 800 ×

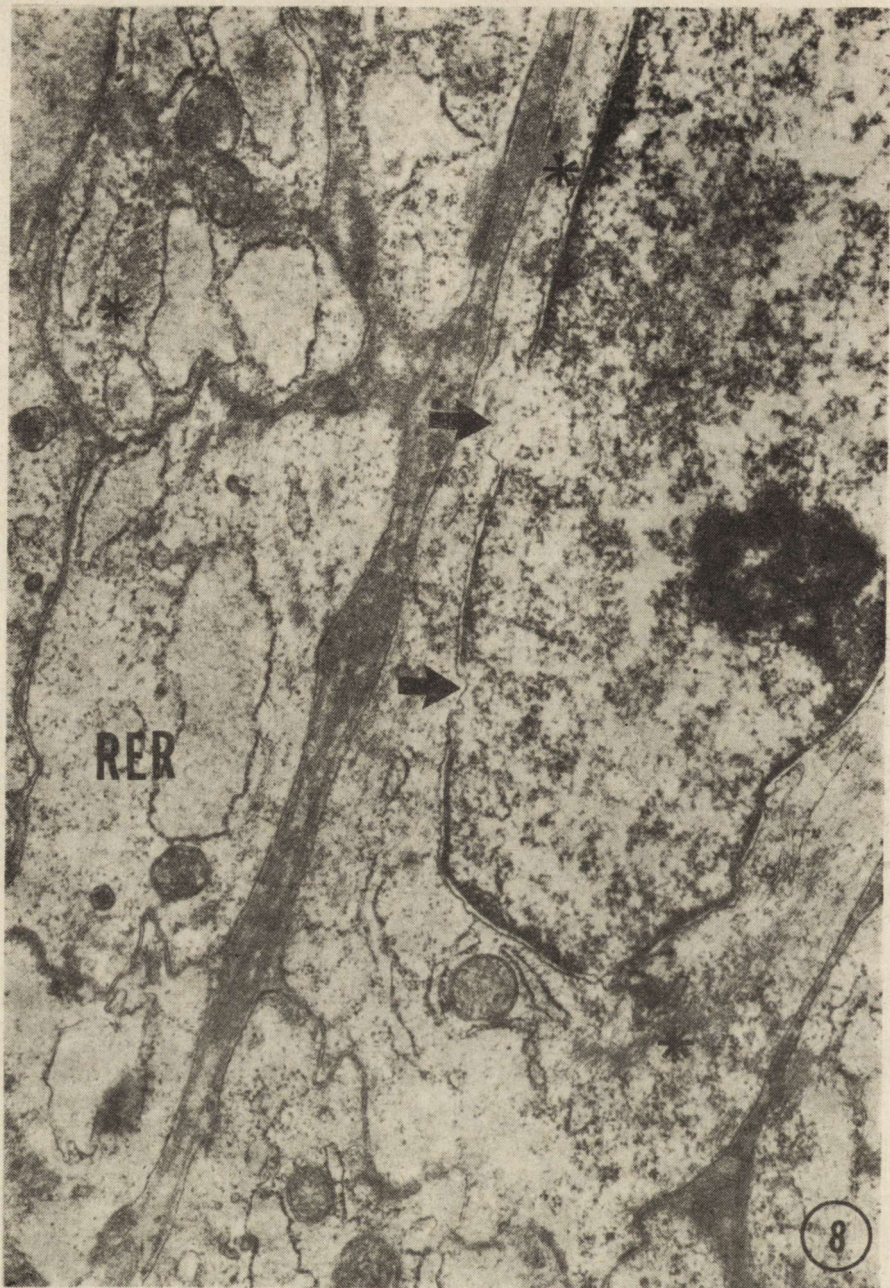


Fig. 8. Culture of hypophyseal neural lobe. Note disintegration of nuclear envelope (arrows), distended RER channels (RER) and filaments forming bundles (asterisk). $\times 28\ 800$

Ryc. 8. Hodowla płata nerwowego przysadki. Otoczka jądrowa wykazuje nieprawidłowości ultrastrukturalne (strzałki). W cytoplazmie poszerzone kanały RER (RER) i wiązki filamentów (gwiazdka). Pow. $28\ 800 \times$

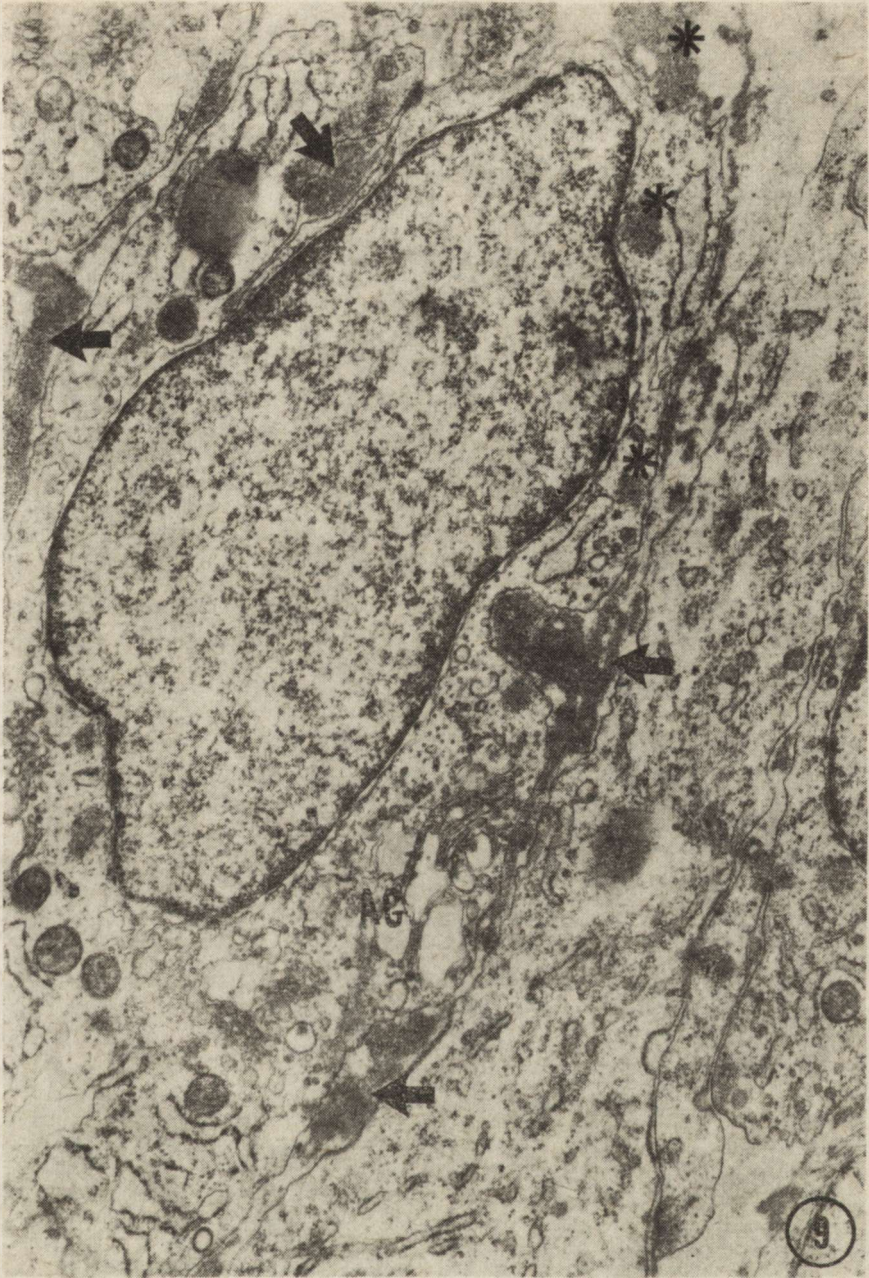


Fig. 9. Culture of hypophyseal neural lobe. Note prominent Golgi apparatus (AG) and numerous filaments forming bundles (asterisk) and distended inter-pituitary spaces filled with electron-dense material (arrows). $\times 26\,700$

Ryc. 9. Hodowla płata nerwowego przysadki. Mocno rozwinięty aparat Golgiego (AG), liczne filamenty formujące wiązki (gwiazdki) i poszerzone przestrzenie między pituicytami wypełnione elektronowogęstym materiałem (strzałki). Pow. $26\,700 \times$



Fig. 10. Culture of striatum. Note nerve cells with well developed rough endoplasmic reticulum (RER) and numerous granulated vesicles showing close contact with RER (arrows). $\times 12\ 150$

Ryc. 10. Hodowla prążkowiec. Fragmenty komórek nerwowych z obfitym RER i licznymi ziarnistymi pęcherzykami w ścisłym kontakcie z RER (strzałki). Pow. $12\ 150 \times$

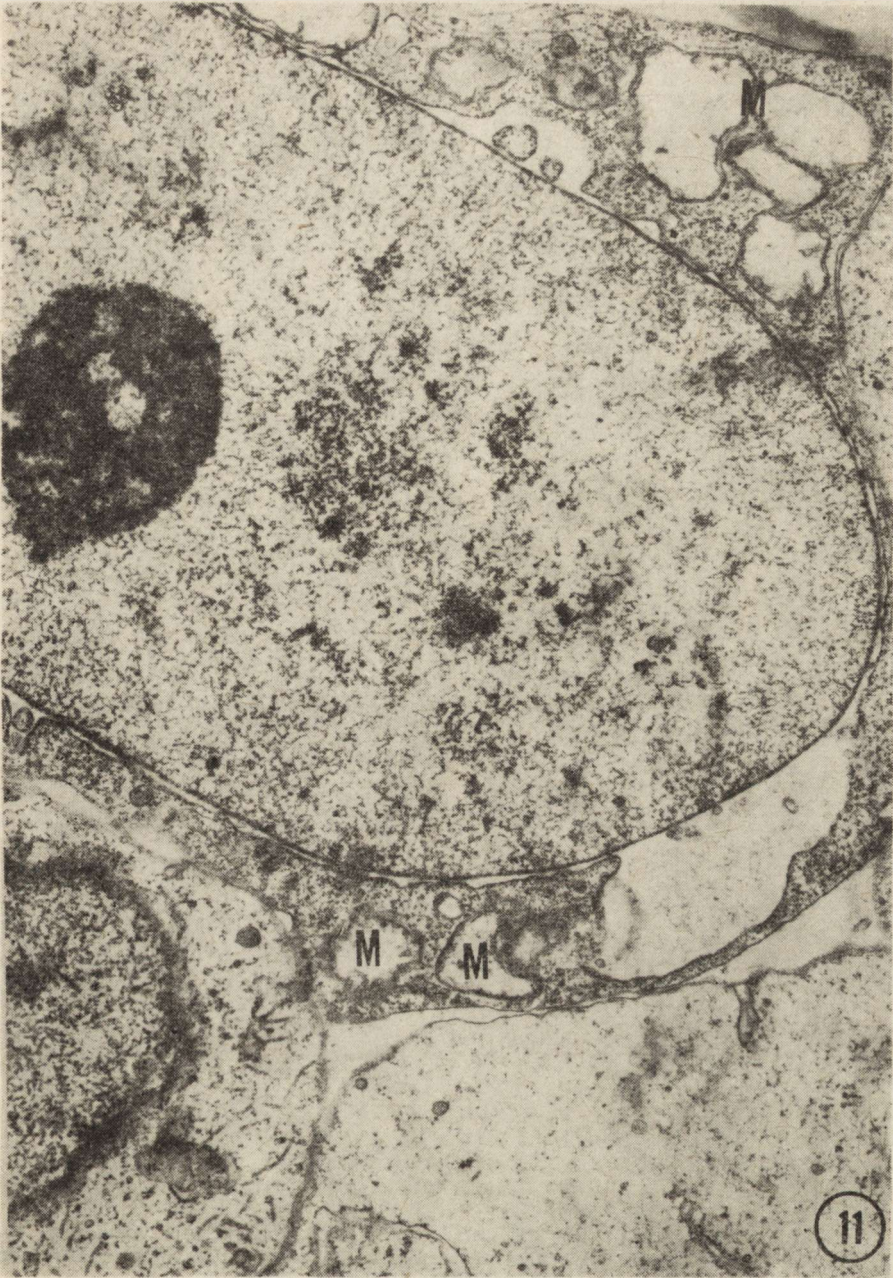


Fig. 11. Culture of striatum. Enlarged spaces between the external and internal membrane of the nuclear envelope and swollen mitochondria (M) in nerve cell are present. $\times 12\ 150$

Ryc. 11. Hodowla prążkowiec. W jądrze komórki nerwowej poszerzone przestrzenie między zewnętrzną i wewnętrzną błoną otoczki jądrowej oraz obrzmiałe mitochondria (M). Pow. 12 150 \times

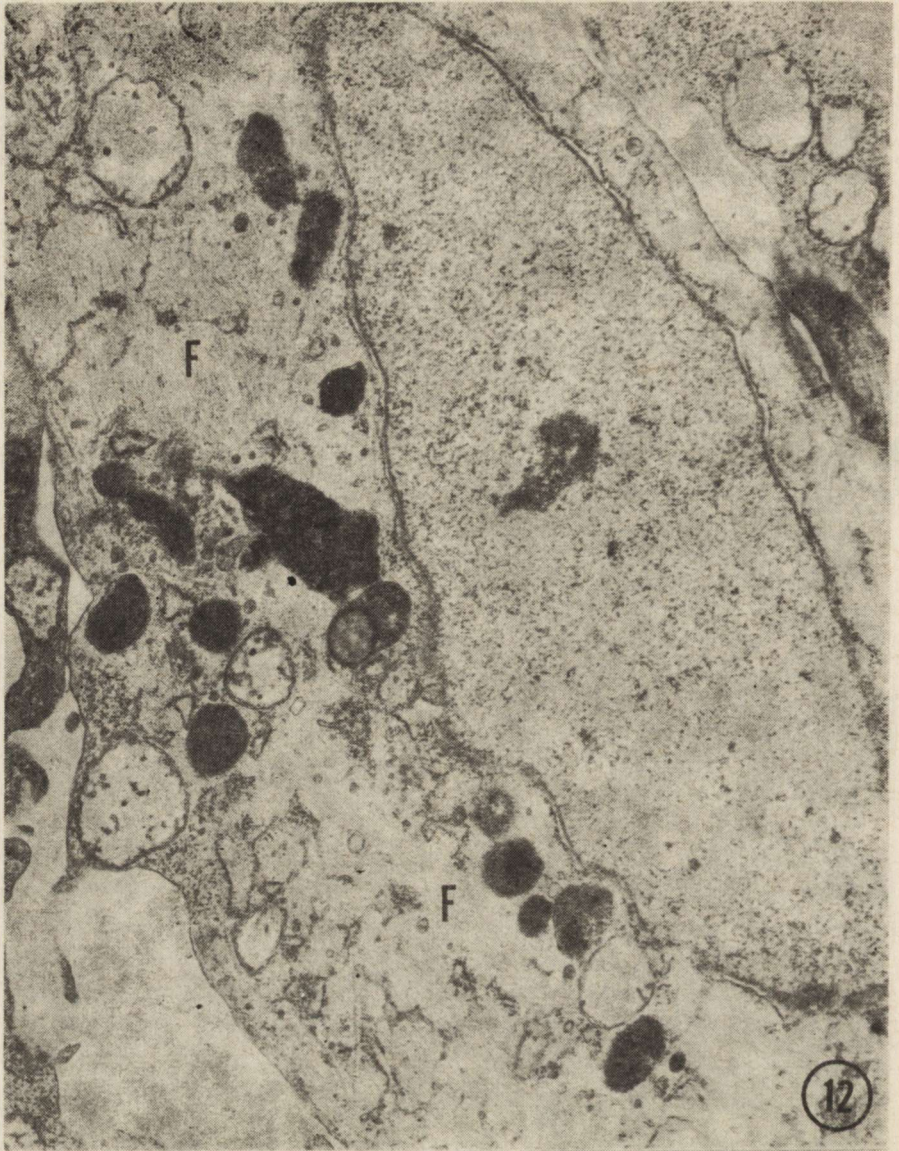


Fig. 12. Culture of striatum. Dense filamentous cytoplasm (F) dominates in glial cell. Numerous lysosomes and/or dense bodies. Scarcely dispersed endoplasmic reticulum. $\times 12\ 450$

Ryc. 12. Hodowla prążkowiec. Hialoplazma komórki glejowej wypełnia cytoskeleton (F). Stosunkowo liczne lizosomy oraz ciała gęste. Rozproszone fragmenty siateczki śródplazmatycznej. Pow. $12\ 450 \times$

cells, ultrastructural changes concerned the cytoplasm while the structure of the nucleolus was normal. A large number of regularly distributed filaments was observed in the cytoplasm of glial cells. These cells contained moreover an increased number of lysosomes, dense bodies and cytosegresomes (Fig. 12).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that addition of lithium carbonate to the culture medium, in a dose corresponding to a clinically used twenty-four-hour dose, increased the metabolic activity of nerve and glial cells maturing *in vitro*. The ultrastructural changes observed in all tissue cultures studied indicate a stimulatory effect of lithium on the synthetic activity of nerve and glial cells. The frequent occurrence of numerous granulated vesicles probably reflects active synthesis of protein material in neurons. Similar morphological pictures found in neurosecretory cells have been described as an expression of enhanced synthesis of neurosecretory proteins (Yukitake et al. 1971; Gajkowska 1981). Frequent observation of different stages of karyokinesis and cytokinesis suggest that in the present experimental conditions lithium increases mitotic activity of glial cells. In addition, the occurrence of filaments, tubules, cilia as well as "replicas" may indicate enhanced biosynthetic activity for the formation of these cellular structures. It is worth noting that in pituicytes a particularly large amount of electron-dense material was found in distended RER channels and in intercellular spaces; the Golgi apparatus was very distinct. This may reflect massive formation and secretion of protein material by these cells under lithium stimulation. In cultures of striatum, some neurons exhibited ultrastructural abnormalities. The latter observation may indicate that the striatum or some of its regions, are more sensitive to Li^+ or that more lithium ions accumulate in this tissue than in others, which may lead to the changes observed. The striatum has been shown to have a high concentration of lithium (Bond et al. 1975; Hesketh 1976 b). This is associated with a well characterized dopaminergic neuronal system that has its nerve terminals in the striatum. Striatal dopamine and its metabolites were studied in rats given lithium chloride in the diet (Hesketh et al. 1978). The results obtained by these authors indicate an increase in the release and turnover of dopamine in lithium-treated animals.

On the other hand, the ability of lithium to reduce dopaminergic hyperresponsiveness may be the result of its action on presynaptic dopamine receptors located in substantia nigra (Allikmets et al. 1979; Verimer et al. 1980). However, the recent results of Staunton et al. (1982) cannot support the hypothesis that the anti-manic action of lithium is related to its ability to prevent dopamine receptor supersensitivity.

WPLYW LITU NA TKANKĘ NERWOWĄ W HODOWLI *IN VITRO*

Streszczenie

Oceniono ultrastrukturę 14-dniowych hodowli mózdzku, płata nerwowego przy-sadki oraz prądkowia noworodków szczurzych poddanych działaniu litu przez trzy dni. Węglan litu podawano w dawce odpowiadającej dobowej dawce stosowanej klinicznie. Wykazano stymulujący wpływ litu na tkankę w hodowli. Badania w mikroskopie świetlnym wykazały wzrost liczby podziałów mitotycznych w hodowli.

Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały cechy morfologiczne świadczą- ce o znacznej aktywności komórek nerwowych i glejowych. W neuronach obser- wowano hipertrofię jądra, siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, liczne rybosomy i polirybosomy oraz obfite ziarniste pęcherzyki w bezpośrednim sąsiedztwie ka- nałów siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. W komórkach glejowych obserwo- wano różne stadia kariokinezy i cytokinezy. Wiele komórek interfazowych wy- kazywało proliferację cytoskeletonu w cytoplazmie.

Na podstawie obserwacji morfologicznych można sądzić, że lit zwiększa me- taboliczną aktywność komórek nerwowych i glejowych, na podstawie zaś zmian ultrastrukturalnych spotykanych w niektórych komórkach nerwowych prądkowia, gdzie jony litu w stosowanej dawce powodują uszkodzenie struktur komórkowych, działanie litu pozostaje dyskusyjne.

ВЛИЯНИЕ ЛИТИЯ НА НЕРВНУЮ ТКАНЬ В КУЛЬТУРЕ

Резюме

Авторы оценили ультраструктуру 14-дневных культур мозжечка нервной доли гипофиза и неостриатума крысиных новорожденных подвергнутых действию лития в течение трех дней. Карбонат лития они вводили в дозе соответствующей суточной дозе применяемой клинически. Обнаружено стимулирующее влияние лития на ткань в культуре. Исследования в световом микроскопе проявили рост числа митотических делений в культуре.

Электронно-микроскопные исследования обнаружили морфологические признаки сви- детельствующие о значительной активности нервных и глиозных клеток. В нейронах авторы наблюдали гипертрофию ядра зернистой внутриплазматической сеточки многочисленные рибосомы и полирибосомы а также обильные зернистые пузырьки в непосредственном соседстве каналов зернистой внутриплазматической сеточки. В глиозных клетках они наблю- дали разные стадии kariokinezy и cytokinezy. Многочисленные интерфазные клетки про- являли пролиферацию cytoskeletona в cytoplazme.

На основании морфологических наблюдений можно считать, что литий увеличивает метаболическую активность нервных и глиозных клеток, а на основании ультраструктурных изменений встречаемых в некоторых нервных клетках неостриатума, где ионы лития в при- меняемой дозе вызывают повреждение клеточных структур, действие лития остается дис- куссионным.

REFERENCES

1. Allikmets L., Stanley M., Gershon S.: The effect of lithium on chronic halo- peridol enhanced apomorphine aggression in rats. *Life Sci.*, 1979, 25, 165—170.
2. Bond P. A., Brooks B. A., Judd A.: The distribution of lithium, sodium and magnesium in rat brain and plasma after various periods of administration of lithium in the diet. *Br. J. Pharmacol.*, 1975, 53, 235—239.

3. Bunney W. E., Murphy D. L.: The neurobiology of lithium. *Neurosci. Res. Prog. Bull.*, 1976, 14, 11—19.
4. Cade J. F. J.: Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med. J. Australia*, 1949, 36, 349—352.
5. Dieling N., Ottoson J., Schou M.: Lithium in psychiatry. *Acta Psychiat. Scand.*, 1969, suppl. 207, 86—97.
6. Gajkowska B.: Badania ultrastrukturalne układu podwzgórzowo-przysadkowego mózgu szczura w stresie hipotermicznym. *Neuropat. Pol.*, 1981, XIX, 1—31.
7. Gelfand E., Doesch H., Hasting D., Shore A.: Lithium: a modulator of cyclic AMP-dependent events in lymphocyte. *Science*, 1979, 203, 365—367.
8. Hesketh J. E.: The effects of lithium on adenosine triphosphates and ion transport with respect to affective illness. Ph. D. Thesis, Edinburgh University, 1976 b.
9. Hesketh J. E., Nicolaou N. M., Arbutnott G. W., Wright A. K.: The effect of chronic lithium administration on dopamine metabolism in rat striatum. *Psychopharmacology*, 1978, 56, 163—166.
10. Hirschowitz J., Casper R., Garver D. L., Chang S.: Lithium response in good prognosis of schizophrenia. *Am. J. Psychiat.*, 1980, 137, 8—14.
11. Johansen K., Ulrich K.: Preliminary studies of the possible teratogenic effect of lithium. *Acta Psychiat. Scand.*, 1969, suppl. 207, 91—95.
12. Katzman R., Pappius H.: Brain electrolytes and fluid metabolism. [In:] Lithium. Eds. The Williams and Wilkins Company. Baltimore 1973, 304.
13. Mroczka D. L., Hoff K. M., Goodrich C. A., Baker P. C.: Effect of lithium on reproduction and postnatal growth of mice. *Biol. Neonate*, 1983, 43, 287—296.
14. Schou M.: Biology and pharmacology of the lithium ion. *Pharmac. Rev.*, 1957, 9, 17—58.
15. Staunton D., Magistretti P., Shoemaker W., Deyo S., Bloom F.: Effects of chronic lithium treatment on dopamine receptors in the rat corpus striatum. II. No effect on denervation on neuroleptic-induced supersensitivity. *Brain Res.*, 1982, 232, 401—412.
16. Stern S., Frazer A., Mendels J., Frustaci C.: Distribution of the lithium ion in endocrine organs of the rat. *Life Sci.*, 1977, 20, 1669—1674.
17. Szabo K.: Teratogenic effect of lithium carbonate in the fetal mouse. *Nature, Lond.* 1970, 225, 73—75.
18. Trautner E., Pennychiuk P., Morris R., Gershon S., Shankly K.: The effects of prolonged sub-toxic lithium ingestion on pregnancy in rats. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1958, 36, 305—321.
19. Verimer T., Goodale D., Long J., Flynn J.: Lithium effects on haloperidol-induced pre- and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1980, 32, 665—666.
20. Weinstein M., Goldfield M.: Pharmacology-lithium teratology. [In:] Lithium, its role in psychiatric research and treatment. Eds. S. Gershon, B. Shops in: Plenum Press, New York 1973, pp. 147—166.
21. Wright T. L., Hoffman L. H., Davies J.: Teratogenic effects of lithium in rats. *Teratology*, 1971, 4, 151—156.
22. Yukitake Y., Taniguchi Y., Kurosumi K.: Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and the formation of Herring bodies in the paraventricular nucleus in the rat. *Cell. Tiss. Res.*, 1971, 177, 1—17.

Authors' address: Nervous System Ultrastructure Laboratory, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa St., 00-784 Warsaw, Poland.

ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, JERZY BOROWICZ

THE EFFECT OF HYPERTHERMIA ON THE ULTRASTRUCTURE
OF THE GIGANTOCELLULAR RETICULAR REGION
IN THE RABBIT

Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw

The gigantocellular region (GC) of the medullary reticular formation has been a subject of interest in the past from both morphological (Scheibel, Scheibel 1958; Bowsher, Westman 1970) and physiological (Segundo et al. 1967; Bowsher et al. 1968) points of view. Despite the obvious fundamental physiological significance of this region, relatively few details are available concerning its morphology, especially in experimental conditions. The ultrastructure of the GC region is insufficiently known, and its precise function has not been determined.

It is well known that thermic stress of animal organisms leads to adaptations, including thermoregulatory mechanisms. Exceeding the capacity of those mechanisms evokes some metabolic changes due to hyperthermia, which can harmfully affect various tissues, especially nervous tissue. These changes include an increase in brain oxygen consumption (Mayer, Handa 1967; Carlsson et al. 1976), an increase of blood-brain barrier permeability (Mueller 1979), and thermally stimulated panting (Pleschka 1971). Previous observations showed that the physiological consequences of thermic stress in mammals are rather complicated. The results of studies by Kapuściński and Karczewski (1973) as well as Karczewski et al. (1973) showed that panting evoked by elevated temperature leads to the development of hypocapnia with consequent cerebral vasoconstriction and ischemic hypoxia. Carlsson et al. (1976) suggested that in heat stress ischemic-anoxic or hypoxic-anoxic cerebral ischemia may take place.

It seemed interesting and justified to study fine structure and changes in the GC region following hyperthermic stress. The aim of this study was to add some information on the morphology and possible function of GC neurons.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on 12 adult male and female rabbits, weighing between 2.6 and 3.6 kg. Nine animals were exposed to experimental thermic stress. Controls were three animals maintained in normal conditions (at temperature 18–20°C and fluctuating air humidity). Each experimental animal was individually placed in a cylindrical lucide chamber (90 × 40 × 40 cm) and exposed for 3 h to high ambient temperatures and relative humidity ranging between 45% and 60% was passed through this chamber*. For ultrastructural studies, the sections containing the gigantocellular region of the reticular formation from brain stem were taken immediately after the 3 h exposure of experimental animals to high ambient temperatures as well as 3, 6, 24 and 48 h after hyperthermic stress. Both the control and the experimental animals were anesthetized with intravenous Vetbutal at 400 mg/kg doses, and then perfused through the left cardiac ventricle with 0.9% sodium chloride at room temperature, following by aldehyde fixative at 4°C. The fixative consisted of 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4. The brain stem sections containing gigantocellular region were removed and placed in the same fixative overnight. Next, they were rinsed in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, postfixed in 2% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2. After dehydration in ethanols the brain sections were embedded in Epon 812; thin sections counterstained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEM 7A electron microscope. For light microscopy sections stained with Toluidine blue have been used.

RESULTS

Light microscopic studies

Examination of the gigantocellular region of reticular formation revealed very large, stellate neurons, which appeared to constitute the majority of the nerve cells. Small neurons had oval body (Figs 1a, b).

Ultrastructure of the gigantocellular region

Electron microscopy examination revealed two different types of neurons. Neurons of the first type had several dendritic branches and were characterized by a round, centrally placed nucleus, poor in dispersed chromatin. Some nuclei showed deep indentations. The most characteristic feature of the cytoplasm was the abundance of rough endoplasmic reticulum often consisting of several parallel running cister-

* Body temperature was measured anally. Before the experiment it was 38.5°C, after 3-hours hyperthermic stress it was 41.8°C.

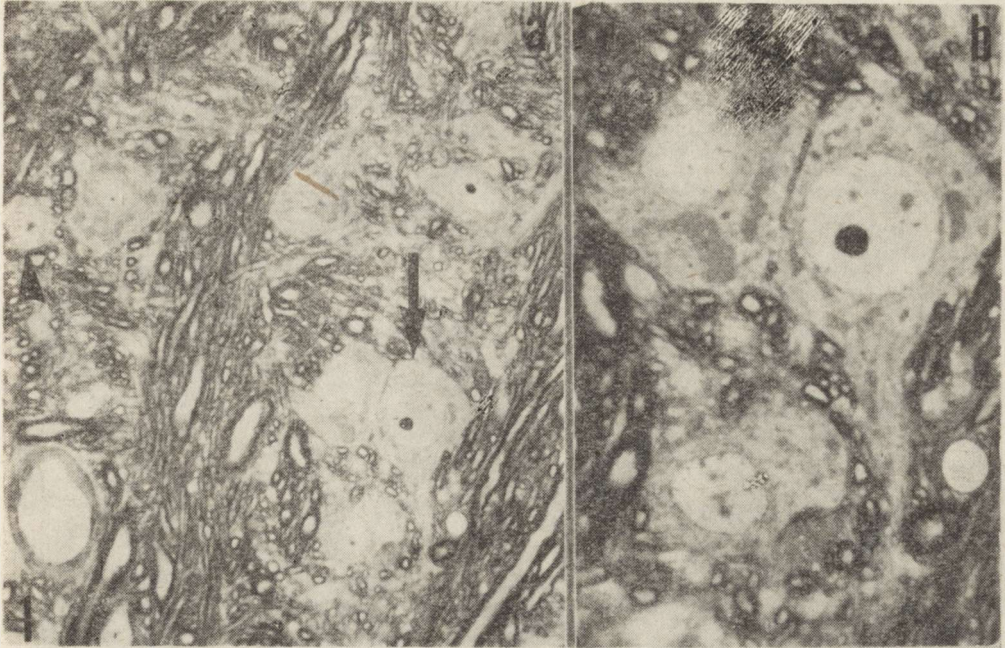


Fig. 1a. Light microscopical picture of large (arrow) and small (arrow head) neurons within the gigantocellular region. Control rabbit. Toluidine blue. $\times 600$

Ryc. 1a. Obraz mikroskopowy olbrzymich (strzałka) i małych (główna strzałki) neuronów obszaru olbrzymiokomórkowego. Królik kontrolny. Błękit toluidyny. Pow. 600 \times

Fig. 1b. Fragment of the same section showing three large neurons. $\times 1200$

Ryc. 1b. W tym fragmencie widoczne są trzy olbrzymie neurony. Pow. 1200 \times

nae. They were observed throughout the cytoplasm and were present in both the perinuclear and the peripheral regions. Free ribosomes and polysomes were also noted. The Golgi complex was moderately developed. Mitochondria were numerous and showed considerable polymorphism. They varied greatly in size and had an oval, elongated or branched shape. Numerous lisosomes, multivesicular bodies as well as neurotubules and bundles of neurofilaments were distributed mostly in the perikaryal cytoplasm (Figs 2, 3). The surfaces of the neurons, including the proximal parts of dendrites, were densely covered with presynaptic endings (Figs 2, 4). Observations revealed two distinct types of presynaptic terminals. Synaptic vesicles of a given presynaptic terminal were either spherical or predominantly flattened. The spherical vesicles usually appeared to be associated with slightly larger synaptic cleft and a thicker subsynaptic web. The presynaptic terminals with predominantly flattened vesicles often demonstrated thinner postsynaptic density and a smaller synaptic cleft. In some boutons a few synaptic vesicles were aggregated close to the synaptic contact (Fig. 3).

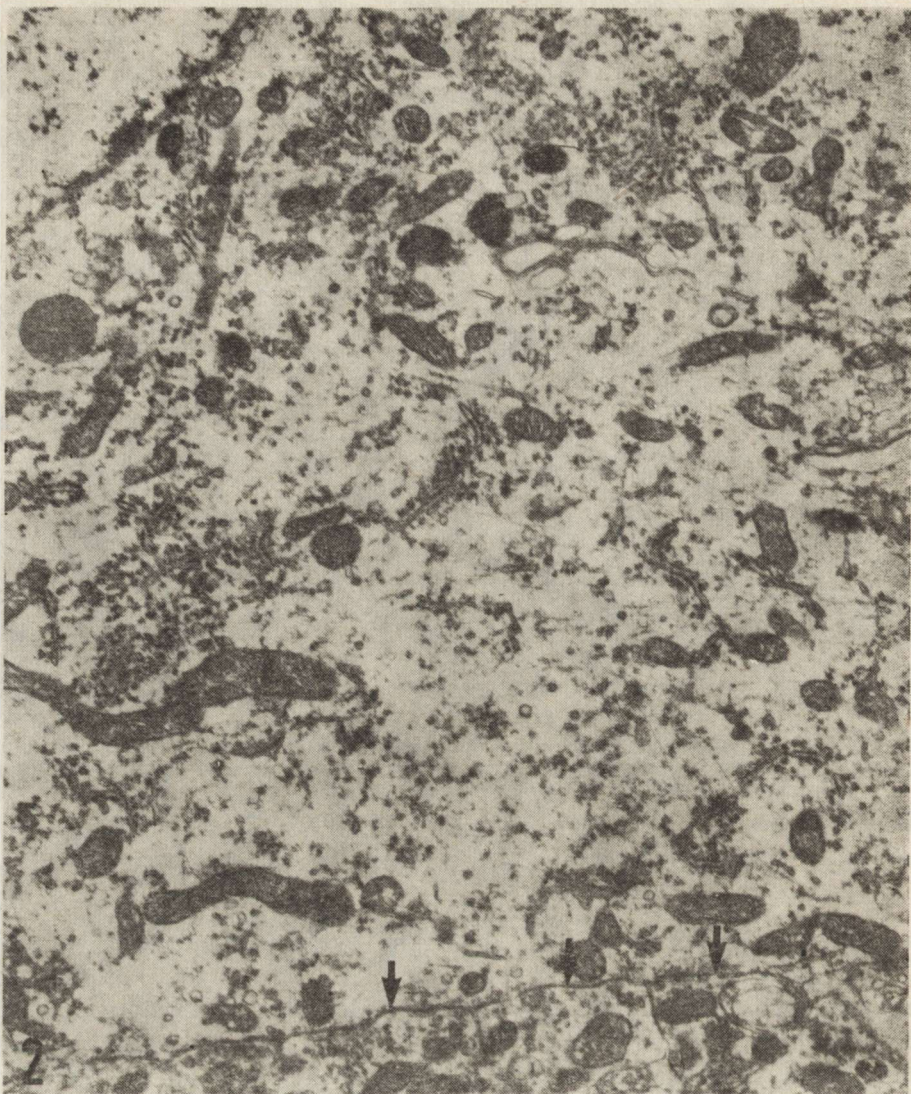


Fig. 2. Plasma membrane of a large neuron covered by numerous presynaptic elements (arrows). Dispersed agglomerations of rough endoplasmic reticulum, and concomitant polyribosomes; polymorphic mitochondria, neurotubules, neurofilaments and dense bodies are visible in cytoplasm. $\times 13\ 050$

Ryc. 2. Neuron olbrzymi, którego błona komórkowa pokryta jest licznymi zakończeniami presynaptycznymi (strzałki). W cytoplazmie widoczne są liczne skupienia siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, polirybosomy oraz polimorficzne mitochondria, neurotubule, neurofilamenty i ciała gęste. Pow. 13 050 \times

Neurons of the second type were small and exhibited a spherical shape with few primary dendrites. Neurons of this type had a centrally located nucleus, rich in heterochromatin aggregated beneath the nuclear envelope, and a moderately developed rough endoplasmic reticulum and Golgi complex (Fig. 4). The presynaptic endings were few in number on

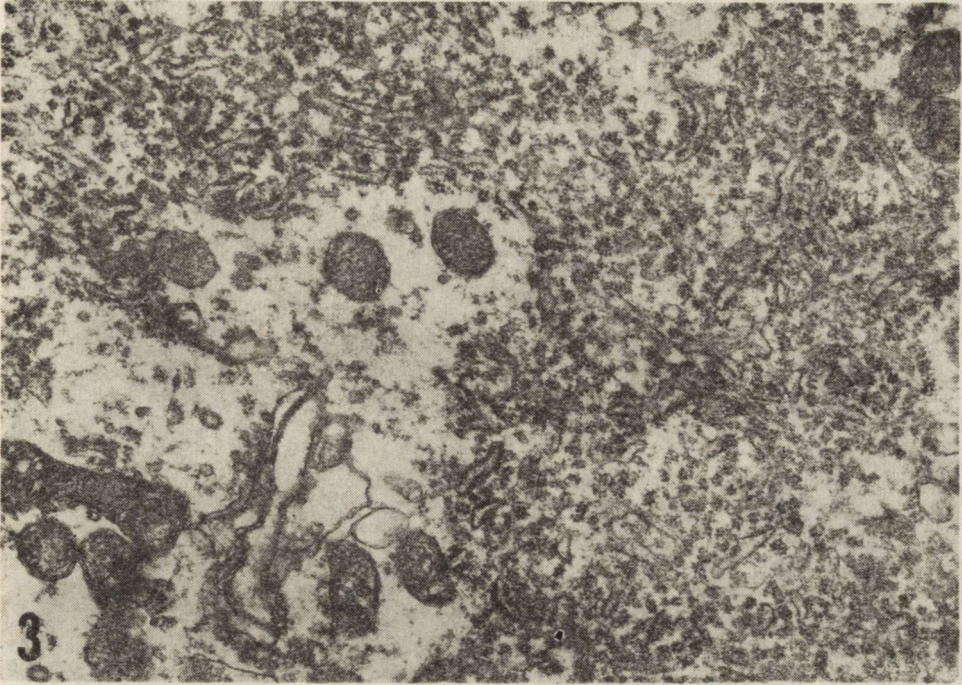


Fig. 3. Agglomerations of rough endoplasmic reticulum with concomitant numerous polyribosomes in the cytoplasm of a large neuron. $\times 18\ 350$

Ryc. 3. W cytoplazmie olbrzymiego neuronu widoczne są duże skupienia siateczki śródplazmatycznej ziarnistej oraz liczne polirybosomy. Pow. 18 350 \times

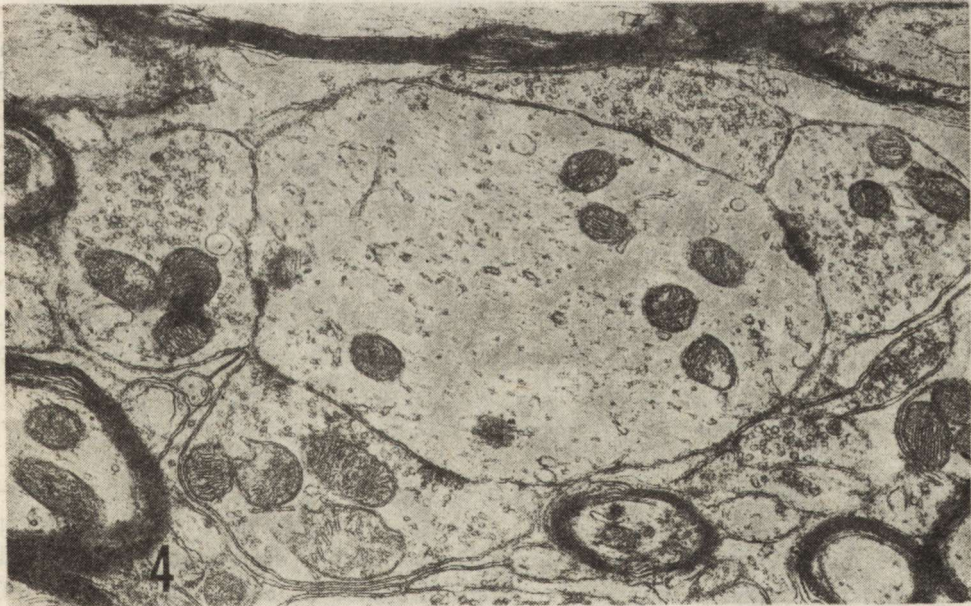


Fig. 4. Presynaptic end feet on a dendrite are present in the neuropil of the gigantocellular region. $\times 13\ 050$

Ryc. 4. W neuropilu obszaru olbrzymiokomórkowego obecne są kolbkowate zakończenia w kontakcie synaptycznym z dendrytem. Pow. 13 050 \times

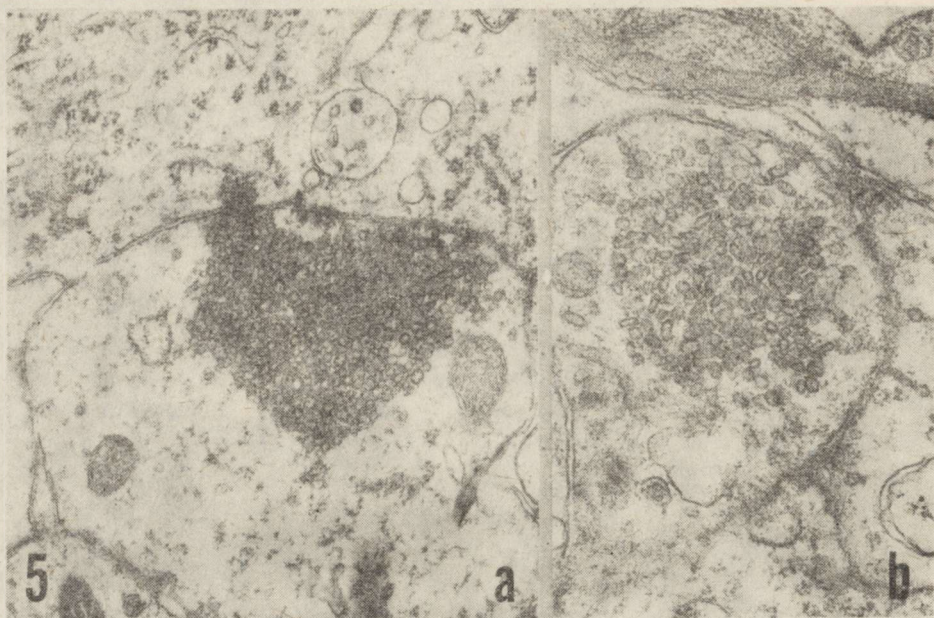


Fig. 5. Two types of synaptic boutons are visible. *a)* axo-somatic synapse containing spherical vesicles concentrated in the vicinity of synaptic cleft. $\times 23\ 800$;
b) presynaptic bouton containing flattened vesicles. $\times 31\ 200$

Ryc. 5. Dwa typy zakończeń synaptycznych. Widoczne są: *a)* synapsa akso-somatyeczna zawierająca kuliste pęcherzyki skupione w pobliżu szczeliny synaptycznej. Pow. $28\ 800 \times$; *b)* zakończenie presynaptyczne zawierające spłaszczone pęcherzyki. Pow. $31\ 200 \times$

them. The larger part of the neuronal membrane was in contact with myelinated axons, blood vessels or glial cells. Branching dendrites of gigantocellular region neurons and their axons with numerous collaterals intermingled with each other and with others axons and their collaterals forming a dense neuropil. Numerous profiles of dendrites of large diameter were prominent in neuropil. Dendrites contained mitochondria placed between microtubules and microfilaments. The mitochondria were concentrated predominantly in the vicinity of synaptic contacts. The dendrites were densely covered by synaptic boutons (Fig. 6). Glial cells both astrocytes and oligodendrocytes were observed in the neuropil.

Heat-stressed rabbits

Directly and 3 h after exposure of the rabbits to high ambient temperature the majority of neurons of both types did not exhibit striking deviations from the controls. Some large neurons contained a decreased amount of rough endoplasmic reticulum and a decreased number of polyribosomes. The Golgi complex consisted of a few narrow cisternae and vesicles (Fig. 7). The nuclei of several small neurons displayed lar-



Fig. 6. Small neuron which surface is covered with wall of capillare and myelinated axon. $\times 13\ 050$

Ryc. 6. Mały neuron, którego powierzchnia pokryta jest głównie przez elementy nie-synaptyczne, ścianę kapilary i zmielinizowany akson. Pow. $13\ 050 \times$

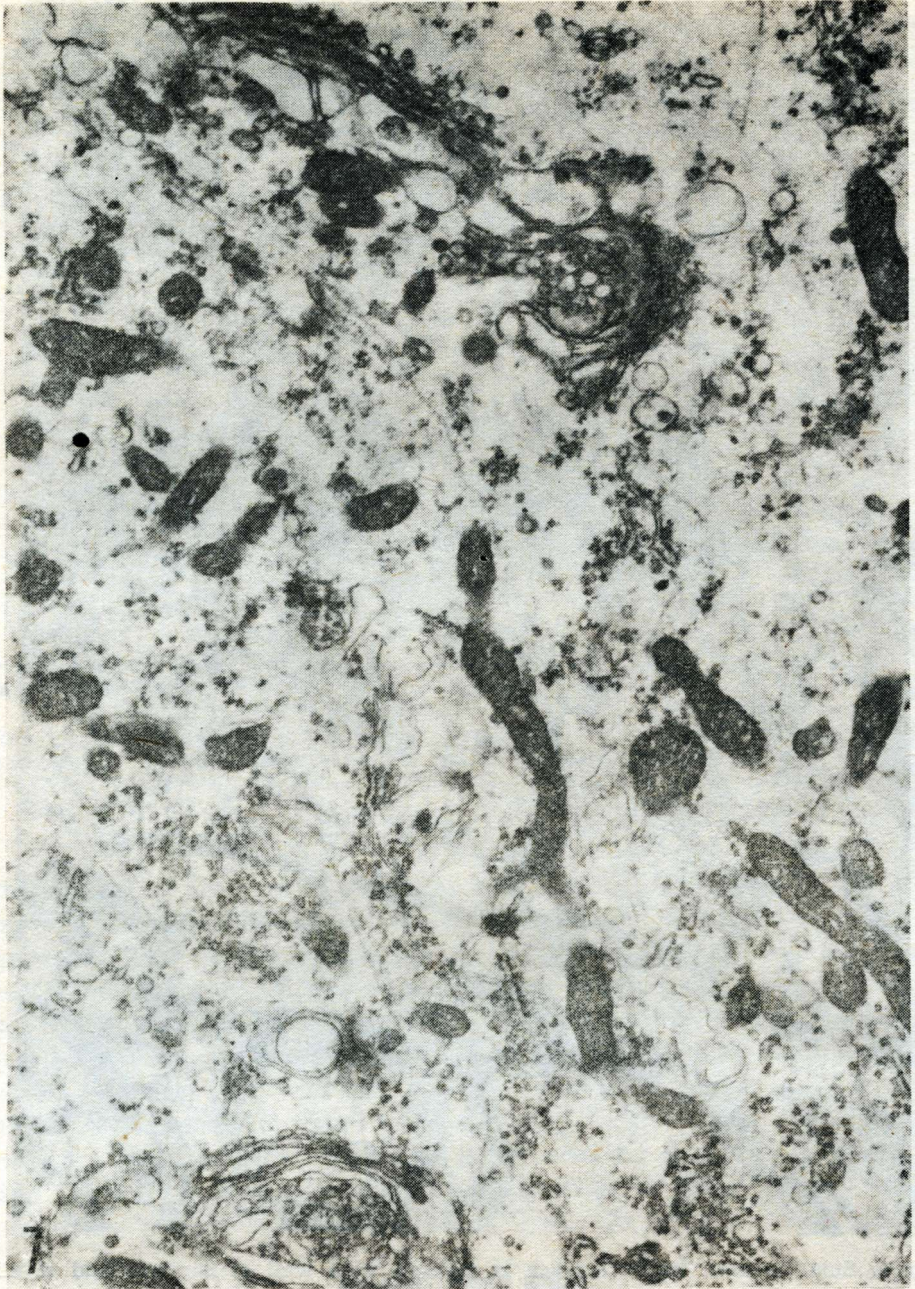


Fig. 7. Large neuron, 3 hrs after experiment. Electron-lucent cytoplasm is poor in rough endoplasmic reticulum profiles. Note numerous polymorphic, intact mitochondria and neurotubules. Moderately developed Golgi apparatus. $\times 10\ 500$

Ryc. 7. Neuron olbrzymi, 3 godziny po doświadczeniu. Cytoplazma o zmniejszonej gęstości elektronowej zawiera małą ilość siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, polirybosomów, liczne niezmienione mitochondria oraz neurotubule. Średnio rozwinięty aparat Golgiego. Pow. $10\ 500 \times$



Fig. 8. Small neuron, 3 hrs after experiment. Note large concentrations of heterochromatin beneath nuclear envelope. Numerous neurotubules and ribosomes are visible in the cytoplasm. $\times 12\ 750$

Ryc. 8. Mały neuron, 3 godziny po doświadczeniu. Widoczne są duże skupienia heterochromatyny pod otoczką jądrową, w cytoplazmie zaś liczne neurotubule i rybosomy. Pow. $12\ 750 \times$

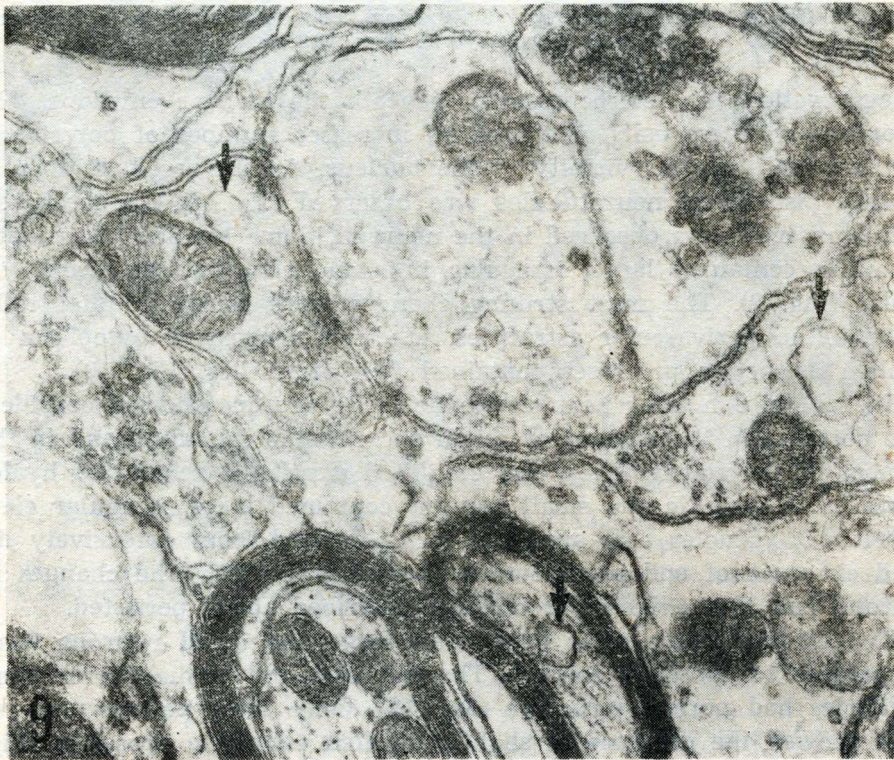


Fig. 9. Neuropil, 3 hrs after experiment. Note swollen synaptic boutons (arrows), in some of them irregular vacuoles. $\times 50\ 400$

Ryc. 9. Neuropil, 3 godziny po doświadczeniu. Widoczne są duże nieregularne wakuole w zakończeniach synaptycznych (strzałki). Pow. $50\ 400 \times$

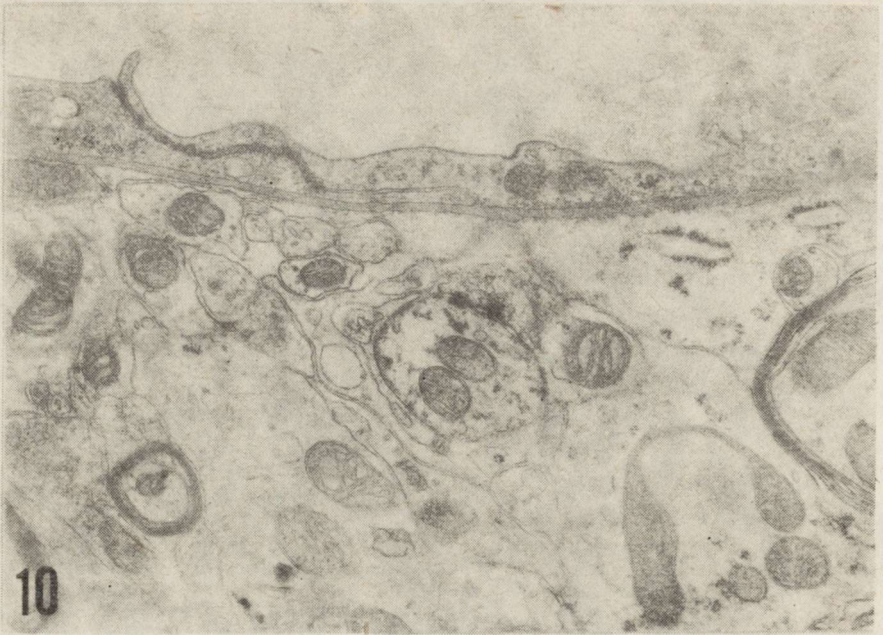


Fig. 10. Perivascular region, 3 hrs after experiment. Swelling of astrocytic processes. $\times 13\ 350$

Ryc. 10. Obszar okołonaczyniowy, 3 godziny po doświadczeniu. Obrzmienie wypustek astrocytów. Pow. 13 350 \times

ge aggregations of heterochromatin beneath the nuclear envelope. The cytoplasm of these cells contained an increased number of polyribosomes, especially in the vicinity of the nucleus. An increased number of densely distributed neurotubules was observed (Fig. 8). Larger intercellular spaces were observed in the neuropil. Some swollen presynaptic terminals contained large, irregular in shape and electron-lucent vacuoles (Fig. 9). The most striking changes were found in glial cells, above all in perivascular astrocytes. Electron-transparent cytoplasm of swollen astrocytic processes contained few organelles (Fig. 10).

In rabbits 6 h after heat stress the large neurons showed considerable decrease in the amount of rough endoplasmic reticulum and in the number of polysomes. They also exhibited decreased density of hyaloplasm. Both gigantic and small neurons contained large, irregular electron-lucent vacuoles that appeared to be derived from extensively dilated cisternae of endoplasmic reticulum (Figs 11, 12). The changes in neuropil and the perivascular changes described above persisted.

Twenty-four hours after heat stress large and small neurons were comparable to those of control. The neuropil and tissue surrounding capillaries had normal structure (Fig. 13). Only some perivascular regions showed the presence of slightly swollen astrocytic processes (Fig. 14).

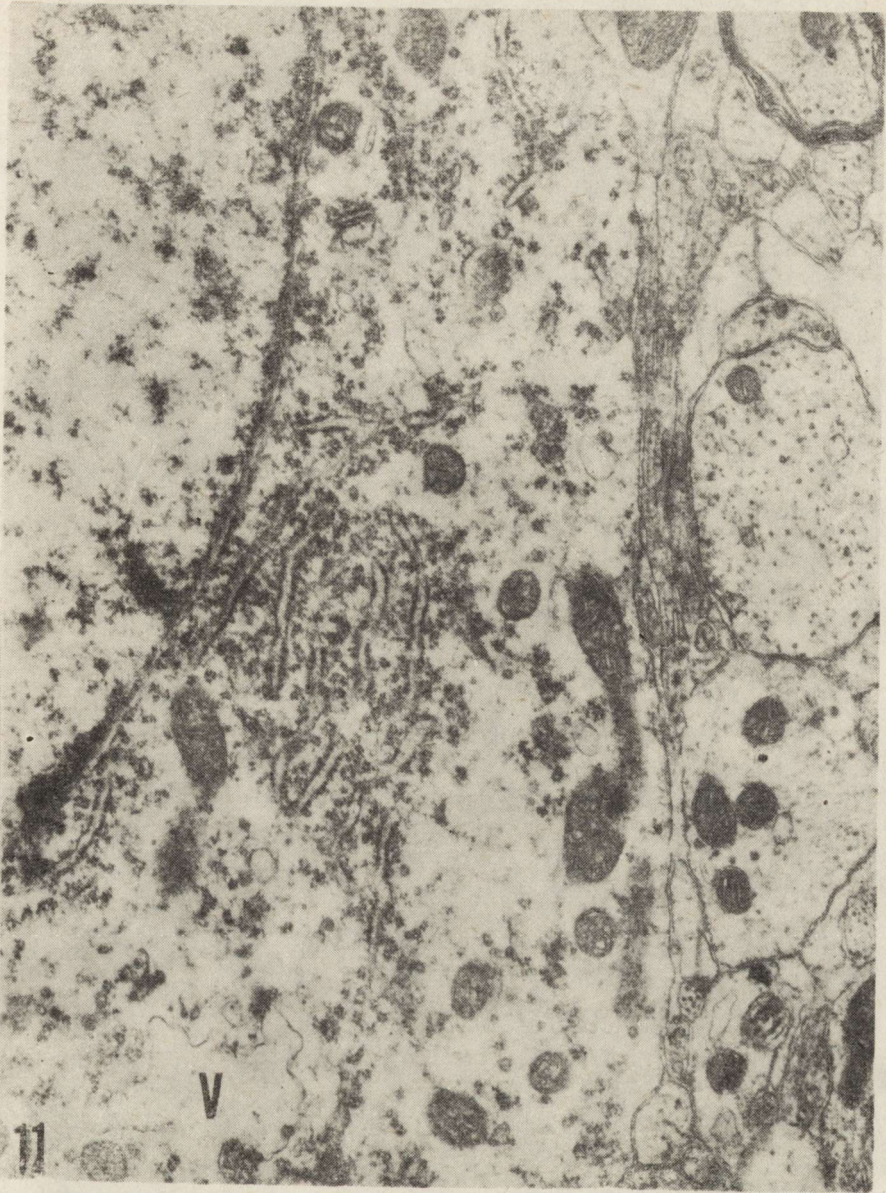


Fig. 11. Large neuron, 6 hrs after experiment. Cytoplasm with decreased electron-density containing large, irregular vacuole (V). $\times 13\ 050$

Ryc. 11. Olbrzymi neuron, 6 godzin po doświadczeniu. Cytoplazma o zmniejszonej gęstości elektronowej zawierająca dużą, nieregularną wakuolę (V). Pow. $13\ 050 \times$

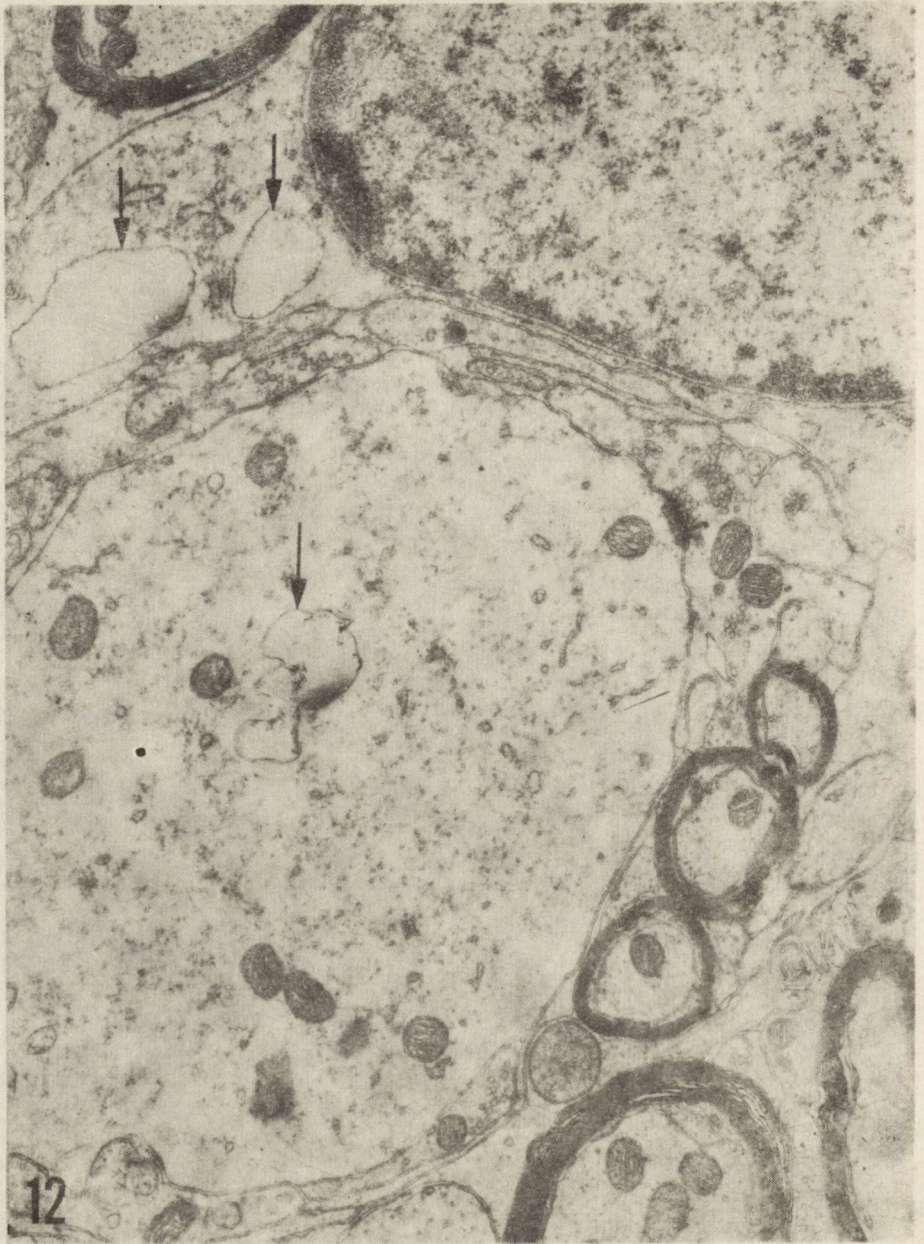


Fig. 12. Fragment of a small neuron (N) and neuropil, 6 hrs after experiment. Large, irregular vacuoles are present in the cytoplasm of the neuron and in dendrite of large neuron (arrows). $\times 12\ 150$

Ryc. 12. Fragment małego neuronu i neuropilu, 6 godzin po doświadczeniu. Duże, nieregularne wakuole są obecne w cytoplazmie małego neuronu oraz w dendrycie olbrzymiego neuronu (strzałki). Pow. 12 150 \times



Fig. 13. Perivascular region, 24 hrs after experiment. No ultrastructural changes. $\times 25\,500$

Ryc. 13. Obszar okołonaczyniowy, 24 godziny po doświadczeniu. W porównaniu z kontrolą nie obserwuje się zmian ultrastrukturalnych. Pow. $25\,500 \times$



Fig. 14. Perivascular region, 24 hrs after experiment. Slightly swollen astrocytic processes. $\times 28\,800$

Ryc. 14. Obszar okołonaczyniowy, 24 godziny po doświadczeniu. Obrzmienie wypustek astrocytów. Pow. $28\,800 \times$

DISCUSSION

The gigantocellular reticular region of the brain stem of rabbit demonstrates several characteristics. The two different types of neurons described above were easy to identify by their size and shape in sections stained with Toluidine blue. Electron microscopic studies revealed evident differences between the two types of neurons and two types of synaptic boutons. The two cell types in the gigantocellular area have not been clearly distinguished by previous investigators using light microscopic techniques, especially Golgi impregnations. These studies have been concerned mostly with gigantic polydendritic neurons, perhaps because they are preferentially impregnated by Golgi procedures. The gigantocellular region of the rabbit reticular formation reveals characteristics which are similar to those described by Bowsher and Westman (1970) in the cat. The authors examined the gigantocellular region of the cat bulbar reticular formation by light and electron microscopy, both in normal animals and following lesions of the cervical spinal cord. They distinguished clearly two types of neurons: 1) large, polydendritic neurons with 5 or 6 dendrites, spines on soma and dendrites, the whole surface apparently covered with presynaptic endings (circa 25/100 μm^2), and 2) small, oligodendritic neurons with one or two dendrites, no observable spines, and whose surface was mostly covered with nonsynaptic elements (5—6 boutons/100 μm^2). Quantitative electron microscopic examination of reticular neurons from the caudal bulbar nucleus *medullae oblongatae centralis* and the *mesencephalic nucleus commissurae posterioris* of the cat by the same authors (1970) revealed the same ultrastructural characteristics as gigantocellular region. The authors estimated that profiles of polydendritic neurons had their somatodendritic surface covered with synaptic boutons to the extent of 80% or more. The degree of synaptic coverage found on these neurons was the highest than estimated in other regions of CNS. For example, it even exceeds the degree of synaptic coverage of cell bodies (47%) and proximal dendrites (43%) of cat lumbar motoneurons (Conradi 1969). Westman and Bowsher (1971) suggested, that the polydendritic, bouton-covered neurons are characteristic of the reticular formation in its wider sense.

Our observations revealed also two distinct types of synapses. Similar observations were previously made by Miller and Fry (1980) during postnatal development of presynaptic terminals in the gigantocellular tegmental field of the rat. In respect to the functional significance of these distinct morphological categories of synapses, it is worth noting that certain specific synapses in both the mammalian and invertebrate systems appear to correlate with excitatory or inhibitory postsynaptic effects. Walberg (1968) has indicated that inhibitory axosomatic synapses in hippocampal pyramidal cells have flattened vesicles while the excitatory axodendritic synapses on the spines of these cells

possess only round vesicles. Larramendi et al. (1969) have also demonstrated that the excitatory endings of parallel and climbing fibers on cerebellar Purkinje cells possess large, round vesicles while the inhibitory endings of basket and stellate cells have small flattened vesicles. It is known that *Crustacean molluscs*, which contain both excitatory and inhibitory endplates, show two kinds of vesicles (Atwood 1968; Uchizono 1967). However, the explanation of the physiological significance of the difference between spherical and polymorphic synapses require a combined electrophysiological and electron microscopic studies.

The function of the gigantocellular region is not sufficiently known. The GC neurons are receptive to numerous central and peripheral inputs, particularly of a multi-sensory nature (Pavlasek et al. 1977; Siegel 1979). Anatomic designation of the GC region is complex. Bowsher et al. (1968) reported that cells in the GC region form a relay for somatic impulses between the spinal cord and higher brain areas. The suggestion that the GC region is a regulatory site is supported anatomically by its extensive caudal connections. Anatomically, the *nucleus reticularis gigantocellularis* has been described as a major receiving area for ascending pain transmission pathways in the cat (Burton 1968). Basbaum et al. (1976, 1978) showed that the *nucleus reticularis gigantocellularis* projects to motor-related areas including cranial motor nuclei of nerves VI, VII, and XII as well as to cells in laminae VII and VIII of the spinal cord. In addition, this nucleus sends dense projections to the periaqueductal gray matter and the dorsal raphe nucleus. The authors also showed that the *nucleus reticularis gigantocellularis* projects to the lateral hypothalamus which, as a way station of the medial forebrain bundle, is probably involved in affective aspects of the pain response. From anatomical, physiological and behavioral studies, it appears that the GC region has diverse functions related to the signaling of pain (Casey 1969; 1971).

From the results of our studies it is clear that hyperthermia evoked morphological changes in all cellular elements of the GC region. Hyperthermia resulted in transient cytotoxic edema. The earliest edematous changes affected glial cells, especially astrocytic processes. Edematous changes persisted 6 h after hyperthermia and after 24 h only minimal signs of edema in perivascular tissue were perceptible. Distinct changes in neurons occurred later, i.e., 6 h after hyperthermia, and affected mostly large neurons. Numerous perikarya of large neurons showed an evident decrease in the amount of rough endoplasmic reticulum and in the number of ribosomes and polysomes, suggesting changes in the activity of these neurons. The appearance of large, electron-lucent vacuoles in the cytoplasm of large and some small neurons may indicate osmotic disturbances. A decrease in electron-density of the cytoplasm of glial and nerve cells and an enlargement of intercellular spaces in the neuropil were observed. Hyperthermia resulted in a spe-

cific accumulation of cytoskeletal elements in small neurons. The mechanism of osmotic disturbances in hyperthermia is complex. Some authors indicate an increase in plasmolemma permeability for Na^+ in neurons of some vertebrates and invertebrates during overheating (Gorman, Marmor 1970; Zacevic, Levitan 1980). This may finally lead to swelling of the cells due to local osmotic changes (Tosteson 1964). According to Yoshimura et al. (1973) vacuolization of cellular organelles may reflect cell response to stress situation due to metabolic disturbances. It is worth noting that in the brain of animals subjected to high ambient temperature, apart from ischemic anoxia, hypoxic anoxia can develop. This was confirmed by the results of studies of Carlsson et al. (1976). They observed progressive low particle oxygen pressure in the arterial blood in hyperthermic conditions. Ischemic and hypoxic brain anoxia inhibit activity of the sodium-potassium pump, which can lead to increase of concentration of Na^+ ions in cells of nervous tissue with secondary increase of water content in their cytoplasm. Similar observations were also made in central nervous system of mammals during and after severe oxygen deprivation resulting in cerebral ischemia (Schneider, Drall 1973; Jenkins et al. 1981).

In conclusion, it seems that morphology of the gigantocellular region of the rabbit does not differ, in general, from that described in the cat (Bowsher, Westman 1970). The hyperthermia resulted in small and transient edema of this region. The most striking changes affected the large neurons. The ultrastructural changes found in the gigantocellular region were almost entirely reversible within 24 hours.

Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs. Wanda Ciesielska and Mr. Sławomir Januszewski for technical assistance and Dr. Barbara Gajkowska for help in conducting the experiment.

WPLYW HIPERTERMII NA ULTRASTRUKTURĘ OBSZARU OLBRZYMIOKOMÓRKOWEGO W TWORZE SIATKOWATYM MÓZGU KRÓLIKA

Streszczenie

Oceniono ultrastrukturę obszaru olbrzymiokomórkowego mózgu królików w normie oraz bezpośrednio, 3, 6 i 24 godziny po przegrzaniu. Badania morfologiczne wykazały występowanie dwu typów neuronów: olbrzymich i małych, oraz dwu typów synaps. U zwierząt doświadczalnych stwierdzono zmiany ultrastrukturalne, które dotyczyły głównie neuronów olbrzymich. W większości spośród nich siateczka śródplazmatyczna ziarnista była słabiej rozwinięta oraz wykazywała znaczne poszerzenie kanałów. Obserwowano również zmniejszenie ilości polirybosomów oraz przejaśnienie cytoplazmy komórek. Zmianom neuronów olbrzymich towarzyszył przejściowy obrzęk badanego obszaru mózgu. Obserwowane zmiany ultrastrukturalne były prawie całkowicie odwracalne w ciągu 24 godzin po przegrzaniu.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГИГАНТОКЛЕТОЧНОЙ ОБЛАСТИ В СЕТЕВИДНОМ ОБРАЗОВАНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКА

Резюме

Авторы оценили ультраструктуру гигантоклеточной области головного мозга кроликов в норме а также непосредственно, 3, 6 и 24 часа после гипертермии. Морфологические исследования обнаружили выступление двух типов нейронов: гигантских и малых а также двух типов синапс. У экспериментальных животных констатировано ультраструктуральные изменения которые относились главным образом к гигантским нейронам. У большинства из них зернистая внутриплазматическая сеточка была более слабо развита и проявляла значительное расширение каналов. Авторы наблюдали также уменьшение числа полирибосом и просветление цитоплазмы клеток. Изменениям гигантских нейронов сопутствовал временный отек исследуемой области головного мозга. Наблюдаемые ультраструктурные изменения были почти полно обратимы в течение 24 часов после гипертермии.

REFERENCES

1. Atwood H. L.: Peripheral inhibition in crustacean muscle. *Experientia* (Basel), 1968, 24, 753—763.
2. Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.: Ascending projections of nucleus gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the cat: an autoradiographic study. *Anat. Res.*, 1976, 184, 354—367.
3. Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.: Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J. comp. Neurol.*, 1978, 178, 209—224.
4. Bowsher D., Mallart A., Petit D., Albe-Fessard D.: A bulbar relay to the centre median. *J. Neurophysiol.*, 1968, 21, 288—300.
5. Bowsher W., Westman J.: The gigantocellular reticular region and its spinal afferents: a light and electron microscopic study in the cat. *J. Anat. (Lond.)*, 1970, 106, 23—36.
6. Burton H.: Somatic sensory properties of caudal bulbar reticular neurons in the cat (*Felis domestica*). *Brain Res.*, 1968, 11, 357—372.
7. Carlsson C., Hagendal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001—1006.
8. Casey K. L.: Somatic stimuli, spinal pathways, and size of cutaneous fibers influencing unit activity in the medial medullary reticular formation. *Exp. Neurol.*, 1969, 25, 35—56.
9. Casey K. L.: Responses of bulboreticular units to somatic stimuli eliciting escape behavior in the cat. *Int. J. Neurosci.*, 1971, 2, 15—28.
10. Conradi S.: Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, 1969, 332, 5—48.
11. Gorman A. L. F., Marmor M. F.: Temperature dependence of the sodium-potassium permeability ratio of a mollusian neurone. *J. Physiol. (Lond.)*, 1970, 210, 913—931.
12. Jenkins L. W., Pawlishock J. T., Lewelt W., Miller J. D., Becker D. P.: The role of postischemic reticulation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 55, 205.

13. Kapuściński A., Karczewski W. A.: The effects of hyperventilation on the cerebral blood flow in normal and hyperthermic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—11) 11—1—22.
14. Karczewski W. A., Karczewska E., Rycembel Z.: Thermal polypnoea: response of phrenic nerve activity to hyperthermia and hyperventilation. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—8) 12—1—12.
15. Larramendi L. M. N., Fickenscher L., Lemkey-Johnson N.: Synaptic vesicles of inhibitory and excitatory terminals in the cerebellum. *Science*, 1967, 156, 967—969.
16. Meyer J. S., Handa I.: Cerebral blood flow and metabolism during experimental hyperthermia. *Minn. Med.*, 1967, 50, 37—44.
17. Miller A. J., Fry G.: Postnatal development of presynaptic terminals in the gigantocellular tegmental field (FTG) of the rat. *Brain Res.*, 1980, 188, 301—317.
18. Mueller S. M.: Increased blood-brain barrier permeability during hyperthermia in the awake rat. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 1979, 104, 81—83.
19. Pavleseck J., Gokin A. P., Duda P.: Visceral pain: response of the reticular formation neurons to gall bladder distension. *J. Physiol. (Paris)*, 1977, 73, 335—346.
20. Pleschka K.: Interaction of CO₂ and thermal stimuli in panting. *J. Physiol. (Paris)*, 1971, 63, 383—386.
21. Scheibel M. E., Scheibel A. B.: Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. [In:] *Reticular formation of the brain*. Eds. H. H. Jasper, L. D. Proctor, R. S. Knighton, W. C. Noshay, R. T. Costello. Little, Brown and Co., 1958, 31—55.
22. Schneider H., Dralle J.: Ultrastructural changes in the rat spinal cord after temporary occlusion of the thoracic aorta. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1973, 26, 302.
23. Segundo J. P., Takenaka T., Encabo N.: Somatic sensory properties of bulbar reticular neurons. *J. Neurophysiol.*, 1967, 30, 1221—1238.
24. Siegel J. M.: Behavioral functions of the reticular formation. *Brain Res. Rev.*, 1979, 1, 69—105.
25. Tosteson D. C.: Regulation of cell volume by sodium and potassium transport. [In:] *The cellular functions of membrane transport*. Ed. J. F. Hoffman, N. J. Englewood Cliffs, Prentice-Hall 1964, 89—101.
26. Uchizono K.: Inhibitory synapses on the stretch receptor neurons of the crayfish. *Nature (Lond.)*, 1967, 214, 833—844.
27. Walberg F.: Morphological correlates of postsynaptic inhibitory processes, [In:] *Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms*. Eds. C. von Euler, S. Skoglund, U. Sodeberg. Pergamon, Oxford 1968, 7—14.
28. Westman J., Bowsher D.: The fine structure of "non-specific" grey matter (laminae V and VII) of the cat spinal cord. *Exp. Brain Res.*, 1971, 12, 227—236.
29. Yoshimura F., Harummiya K., Soiji T., Yokoyama M., Kumagai T.: Possible reversion of pituitary "thyroidectomy cells" into their original acidophils in rats. *Endocrinol. Jap.*, 1973, 20, 249.
30. Zecevic D., Levitan H.: Temperature acclimation effects on membrane physiology of an identified snail neuron. *Am. J. Physiol.*, 1980, 239, 47—57.

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

BARBARA GAJKOWSKA

REAKCJA JĄDRA NADWZROKOWEGO I JĄDRA
PRZYKOMOROWEGO PODWZGÓRZA KRÓLIKA
NA PRZEGRZANIE I OZIĘBIENIE ORGANIZMU

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Instytutu Centrum
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Pod wpływem wstrząsu zarówno układ sympatyczno-rdzeniowo-nadnerczowy, jak i układ podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowy ulega gwałtownej aktywacji (Makara i wsp. 1984). Istnieje wiele dowodów wskazujących na udział podwzgórza w termoregulacji ustroju (Bell i wsp. 1981; Briese 1981; Cabanac, Dib 1983; Ferguson i wsp. 1984). Własne badania eksperymentalne (Gajkowska 1980; 1981; Gajkowska i wsp. 1985; Loesch i wsp. 1985) przemawiają za tym, iż obszary przedniego podwzgórza oraz układ podwzgórzowo-przysadkowy stanowią bardzo istotną strefę mózgu dla utrzymywania homeostazy termicznej (Szczepańska-Sadowska 1977; Satinoff 1978).

Działanie wysokiej temperatury otoczenia powoduje wzrost ogólnej ciepłoty ciała oraz wzrost metabolizmu. Pociąga to za sobą nasilenie utraty wody. Warunki te sprzyjają pobudzeniu podwzgórzowo-przysadkowego układu antydiuretycznego.

Wyniki badań nad wpływem niskiej temperatury otoczenia na układ podwzgórzowo-przysadkowy są kontrowersyjne (Khail 1954; Guzek 1956). Jedyne badania biochemiczne jednoznacznie wskazują, że hipotermia wywołuje diuretyczne odwodnienie organizmu, powodując aktywację neuronów jąder sekrecyjnych (Fregly, Tyler 1972; Nelson i wsp. 1974). Wykazano również, że oziębienie powoduje gwałtowne wydzielanie katecholamin w zakończeniach nerwów sympatycznych oraz w rdzeniu nadnerczy (Benedict i wsp. 1977; Johanson i wsp. 1977).

Przeprowadzono wiele badań neurochemicznych i neurofizjologicznych nad rolą neurotransmiterów (noradrenaliny, acetylocholino, dopaminy, serotoniny) w kontroli temperatury ciała (Metcalf, Myers 1978; Poole, Stephenson 1979). Przypuszcza się, że temperatura otoczenia wpływa aktywnie na udział neurotransmiterów w podwzgórzowej re-

gulacji temperatury ciała (Ferguson 1984). Badania Lomax i Green (1981) wykazały także szczególnie wysoką zawartość histaminy w podwzgórzowym szlaku termoregulacyjnym.

Przedstawiona praca jest kontynuacją naszych poprzednich badań nad wpływem wysokiej temperatury otoczenia na układ podwzgórzowo-przysadkowy. Jej celem jest ustalenie wpływu zarówno przegrzania, jak i oziębienia organizmu na wykładniki ultrastrukturalne aktywności neuronów sekrecyjnych podwzgórza królika. Badano neurony należące do antydiuretycznego układu podwzgórzowo-przysadkowego, odpowiedzialnego między innymi za termoregulację ustroju. Uzasadnieniem celowości podjęcia tych badań jest fakt, że wielu ludzi przebywa ze względu na charakter wykonywanego zawodu w otoczeniu o wysokiej temperaturze. Co więcej, często ekspozycja na wysoką temperaturę otoczenia jest połączona z wykonywaniem pracy fizycznej sprzyjającej dodatkowo podwyższaniu wysokiej ciepłoty ciała. Ludzie ci po zakończeniu pracy przechodzą do otoczenia o niskiej temperaturze.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 13 królikach albinosach, obu płci, wagi około 3 kg, hodowanych w zwierzętarni w temperaturze 16—18°C. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: grupa I — dwa króliki poddawane były przez 3 godziny działaniu temperatury otoczenia do 38—39°C, według metody opisanej w poprzedniej pracy (Gajkowska i wsp. 1985); grupa II — trzy króliki poddawano przez 40 minut działaniu temperatury otoczenia obniżonej do 6—8°C. W obu tych doświadczeniach wilgotność powietrza wynosiła 85%; grupa III — pięć królików poddawano przez 3 godziny działaniu temperatury otoczenia do 38—39°C, a następnie bezpośrednio przenoszono je do pomieszczenia o temperaturze obniżonej do 6—8°C, gdzie przebywały przez 40 minut; trzy króliki zdrowe stanowiły kontrolę.

We wszystkich grupach doświadczalnych wykonano pomiary temperatury ciała w *rektum* królika. I tak w pierwszej grupie, zwierząt wystawionych na 3-godzinne działanie wysokiej temperatury, temperatura wynosiła 41,8°C. W drugiej grupie, zwierząt oziębionych przez 40 minut, temperatura w *rektum* wynosiła 37,9°C. W trzeciej grupie, gdzie zwierzęta były przegrzane, a następnie gwałtownie oziębione, temperatura wynosiła 38,5°C. Ciepłota ciała królików kontrolnych wahała się od 38,0°C do 38,5°C.

Wycinki z jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) pobierano natychmiast po zakończeniu doświadczeń w każdej z trzech grup, zawsze łącznie z wycinkami SO i PV od zwierząt zdrowych, kontrolnych. Materiał utrwalano w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylanowym o pH = 7,4 przez 1 godzinę, a na-

stępnie płukano w tym samym buforze przez całą noc i dodatkowo utrwalano przez 1 godzinę w 2% roztworze OsO_4 w 0,2 M buforze kodylanowym, po czym odwadniano materiał we wzrastających stężeniach alkoholu i tlenu propylenu i zatapiano w Eponie 812. Skrawki krojono na ultramikrotomie Reichart OmU₂, dobarwiano wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu oraz oglądano w mikroskopie JEM 7A.

WYNIKI

Zwierzęta zdrowe. Kontrola

Neurony jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) były opisywane we wcześniejszej publikacji (Gajkowska i wsp. 1985). Neurony obydwu jąder wykazują duże podobieństwo morfologiczne. Zarówno w SO, jak i PV neurony układają się blisko siebie. Mają one duże, bogate w chromatynę jądra, zawierające jedno lub dwa jąderka. Obfita cytoplazma tych neuronów posiada dobrze rozwiniętą siatkę śródplazmatyczną pokrytą gęsto rybosomami. Pomiędzy jej kanałami znajduje się duża ilość organelli, zwłaszcza mitochondriów, polirybosomów oraz pojedyncze tzw. ciała jąderkopodobne. We wszystkich neuronach aparat Golgiego zajmuje duże obszary okołojarowe. W jego okolicy znajduje się zmienna ilość ziarnistości neurosekrecyjnych oraz różnej wielkości elektronowo-przeziernych pęcherzyków, pęcherzyki opłaszczone. Obecne są również ciała wielopęcherzykowe, ciała gęste oraz wtórne lizosomy. Między neuronami SO i PV obecne są liczne synapsy typu akso-somatycznego, akso-dendrytycznego i synapsy akso-aksoniczne.

I grupa doświadczalna

Neurony SO i PV królików po wstrząsie cieplnym opisane były szczegółowo w poprzedniej pracy (Gajkowska i wsp. 1985). Badania mikroskopowo-elektronowe neuronów SO i PV nie różniły się w tej grupie doświadczalnej od opisywanych poprzednio, wykazując takie same zmiany morfologiczne zauważalne w neuronach zarówno SO, jak i PV. Wstrząs cieplny spowodował wystąpienie różnic w zawartości ziarnistości neurosekrecyjnych. Poza tym w niektórych neuronach pojawiały się nieprawidłowości w obrazie ultrastrukturalnym, polegające na obrzmieniu cytoplazmy oraz mikrowakuolizacji pojedynczych neuronów.

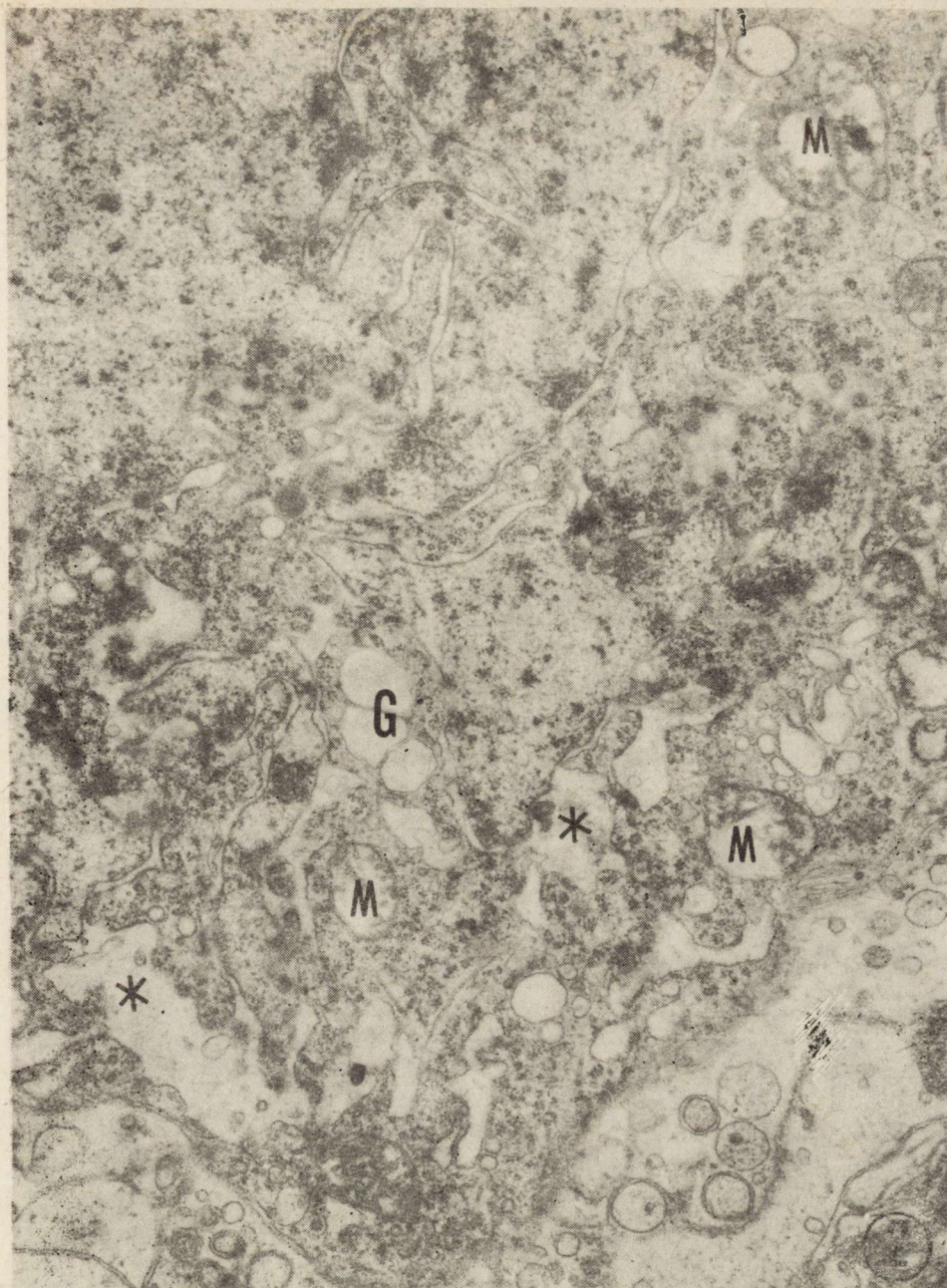
II grupa doświadczalna

Neurony SO i PV zwierząt poddanych nagłemu oziębieniu zachowują się podobnie. Wiele neuronów SO i PV posiada na ogół prawidłową budowę ultrastrukturalną. Niekiedy jednak obserwowano gromadzenie filamentów pośrednich cytoskeletonu, czemu towarzyszyło znaczne zmniejszenie się liczebności ziarnistości neurosekrecyjnych (ryc. 1). Dość licz-



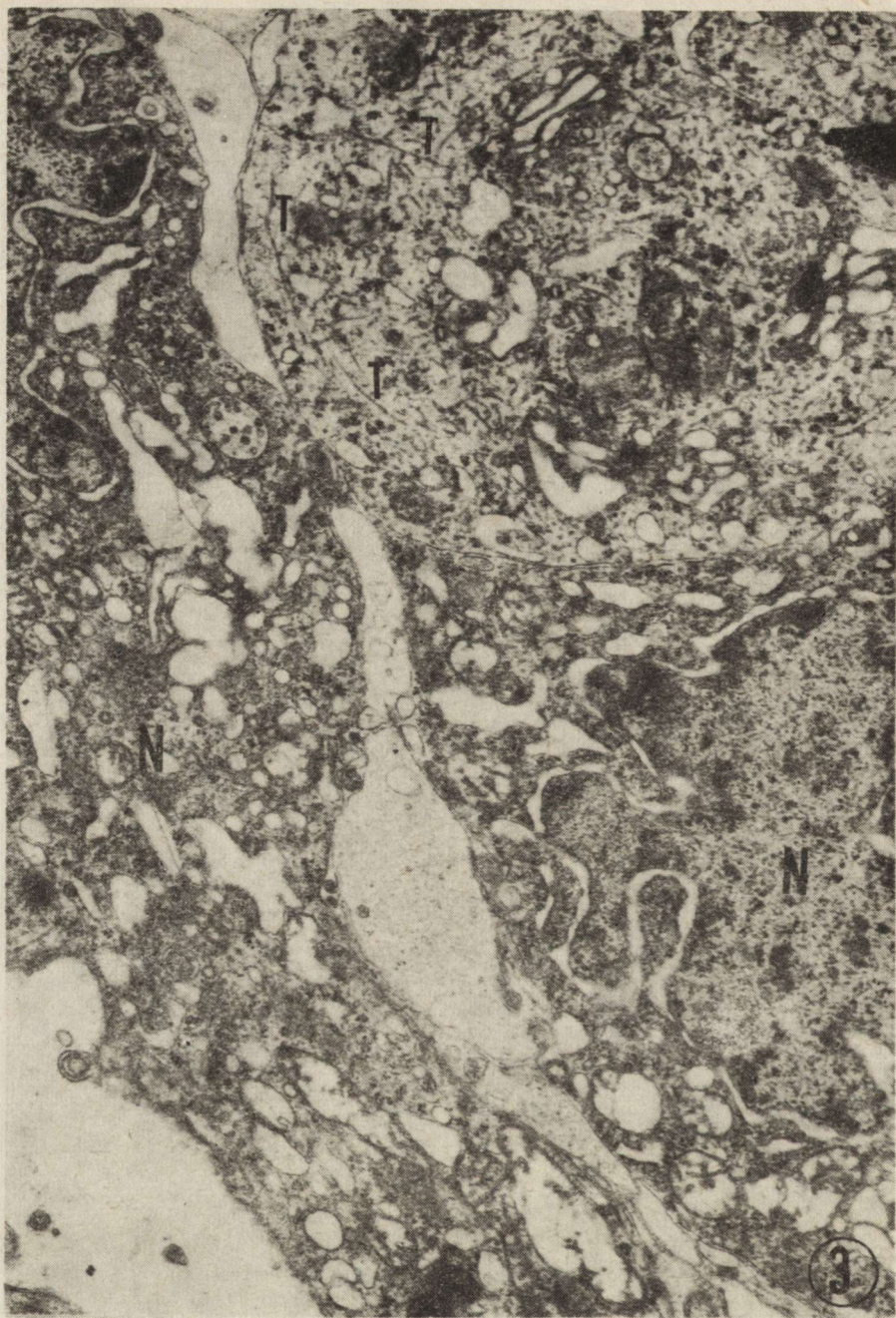
Ryc. 1. Jądro nadwzrokowe. Hipotermia. We fragmencie neurocytoplazmy zwiększona ilość neurotubul (T), pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne oraz mitochondria (M) o nieregularnej obrzmiałej macierzy, w pobliżu widoczne synapsy (S) o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Pow. 12 450 ×

Fig. 1. Supraoptic nucleus. Hypothermia. Increased number of neurotubules (T), individual neurosecretory granules, and mitochondria (M), with swollen matrix are visible in fragment of cytoplasm. In the vicinity the synapses (S) of normal ultrastructure. × 12 450



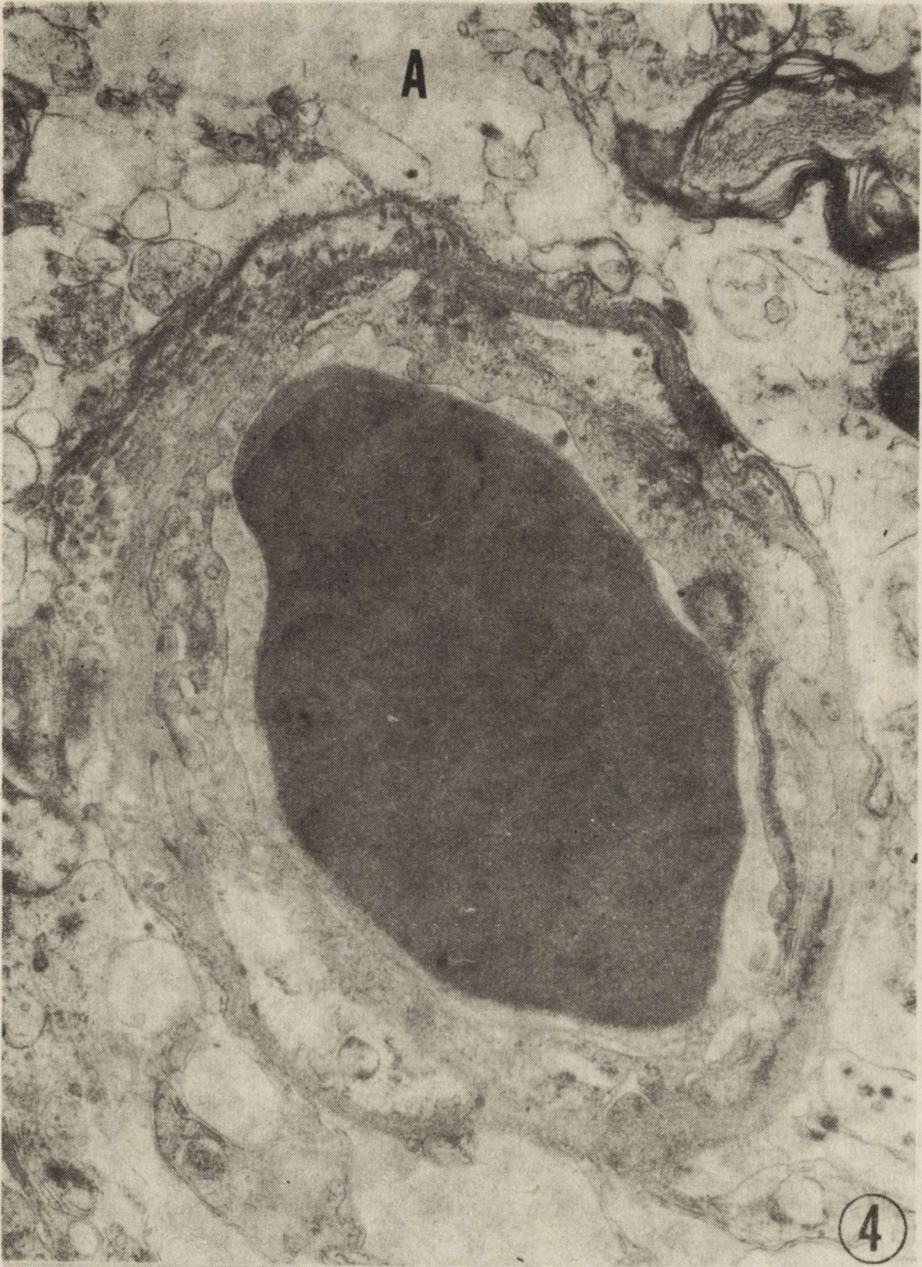
Ryc. 2. Jądro przykomorowe. Hipotermia. Neuron ciemny o dużym nieregularnym jądrze z wgłobieniami. Znaczne poszerzenie przestrzeni między zewnętrzną i wewnętrzną blaszką otoczki jądrowej, wykazuje ciągłość z kanałami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (gwiazdki). W miejscach poszerzeń gromadzą się niewielkie ilości substancji włóczkowatej o małej gęstości elektronowej. W cytoplazmie widoczny pęcherzykowaty aparat Golgiego (G), liczne polirybosomy oraz mitochondria, niektóre o obrzmiałej macierzy (M). Pow. 10 800 ×

Fig. 2. Paraventricular nucleus. Hypothermia. Dark neuron containing large, irregular nucleus. Dilatations between internal and external membrane of nuclear envelope, showing connection with rough endoplasmic reticulum (asterisk). Small amounts of substances of slow electron density are visible in places of dilatations. Vesicular Golgi apparatus (G), numerous polyribosomes, and mitochondria (M), some of them with swollen matrix, are visible in cytoplasm. × 10 800



Ryc. 3. Jądro przykomorowe. Hipotermia. Fragmenty dwóch neuronów ciemnych (N), pomiędzy nimi poszerzone przestrzenie międzykomórkowe. W neuronie o prawidłowej budowie zwiększona ilość neurotubul (T). Pow. 10 800 ×

Fig. 3. Paraventricular nucleus. Hypothermia. Fragments of two dark neurons (N). Between them dilated intercellular spaces. Increased number of neurotubules (T) is present in neuron of normal ultrastructure. × 10 800



Ryc. 4. Jądro przykomorowe. Hipotermia. Naczynie krwionośne o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej; otaczające wypustki astrocytarne (A) obrzmiałe. Pow. 10 800 \times

Fig. 4. Paraventricular nucleus. Hypothermia. Blood vessel of normal ultrastructure surrounding swollen astrocytic processes (A). \times 10 800

ne były tzw. neurony ciemne (ryc. 2, 3), posiadające jądro komórkowe znacznych rozmiarów, zawierające duże ilości heterochromatyny. Jądra te miały zwykle nieregularne kształty z licznymi wgłobieniami, czemu towarzyszyły nieprawidłowości w budowie otoczki jądrowej. Często występowały znaczne poszerzenia przestrzeni pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną otoczki jądrowej. Otoczka ta wykazywała często ciągłość z kanałami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. We wspomnianych powyżej poszerzeniach oraz w kanałach siateczki śródplazmatycznej spotykano niewielkie ilości kłaczkowatego materiału o małej gęstości elektronowej. W neuronach tych aparat Golgiego wykazywał przeważnie budowę pęcherzykową. Siateczka śródplazmatyczna ziarnista była bardzo obfita, lecz wiele jej kanałów krótkich i rozdętych, pokrytych było skąpą ilością rybosomów, natomiast zwracała uwagę duża ilość polirybosomów. Obserwowano także znaczną ilość mitochondriów okrągłych, owalnych, niektóre wykazywały cechy obrzmienia. W większości ciemnych neuronów ziarnistości neurosekrecyjne znajdowano sporadycznie. W niektórych neuronach ciemnych nieprawidłowości ultrastrukturalne jądra były bardziej nasilone. Cytoplazma sprawiała wrażenie mniej obfitej i zagęszczonej, kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej były przeważnie krótkie, rozdęte i elektronowo-przeziernie, prawie wszystkie mitochondria były obrzmiałe, obserwowano liczne ciała wielopęcherzykowe. Przestrzenie międzykomórkowe w pobliżu ciemnych neuronów były poszerzone (ryc. 3). W neuropilu otaczającym neurony SO i PV obserwowano nieprawidłową budowę ultrastrukturalną wypustek astrocytarnych okołonaczyniowych. Wypustki te o jasnej cytoplazmie były niekiedy całkowicie pozbawione organelli, natomiast budowa ultrastrukturalna naczyń pozostawała prawidłowa (ryc. 4).

III grupa doświadczalna

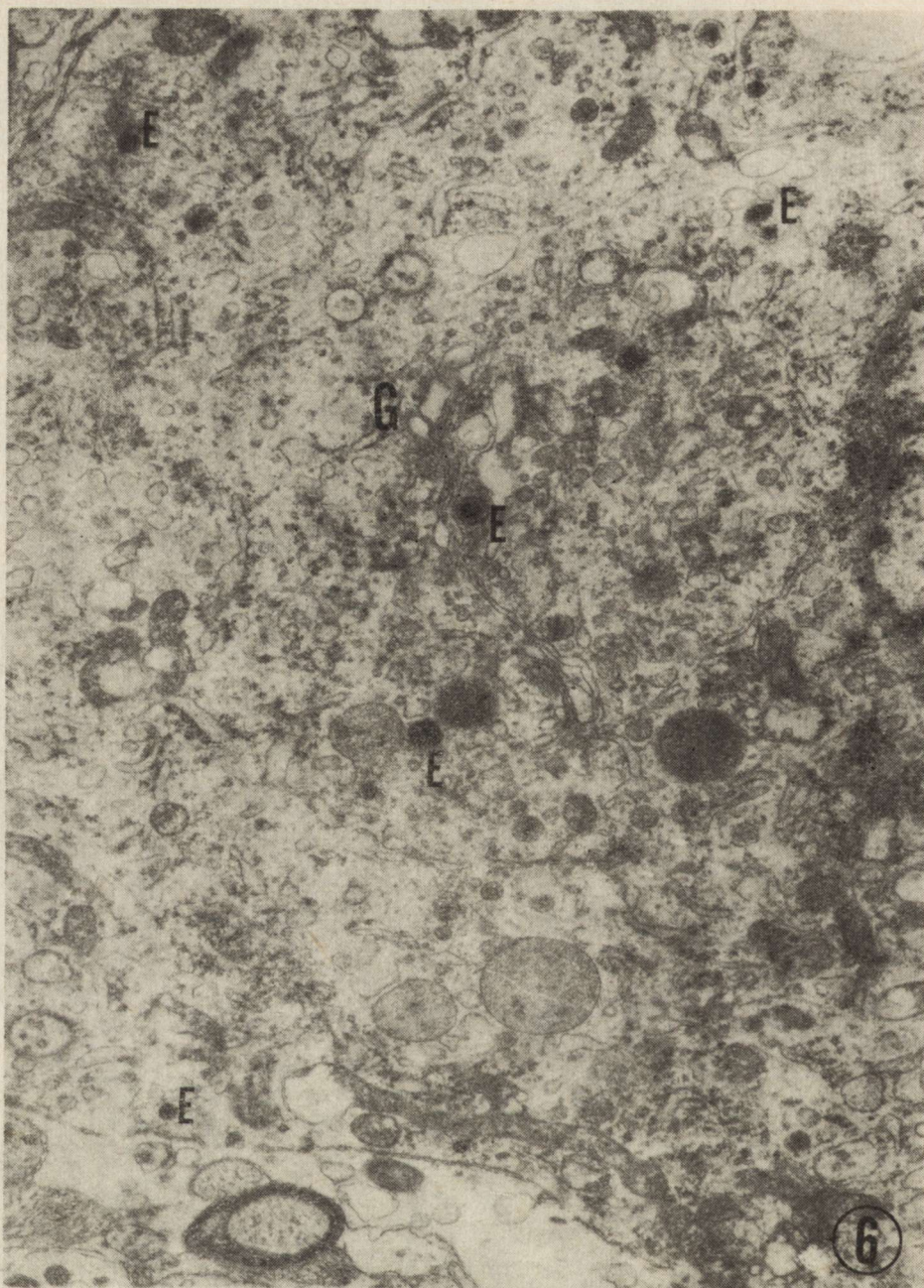
Zwierzęta poddawane działaniu 3-godzinnej hipertermii, a następnie oziębiane przez 40 minut wykazywały bardzo znaczne zmiany ultrastrukturalne w wielu neuronach SO i PV. Nieliczne tylko spośród obserwowanych neuronów SO i PV wykazywały prawidłową budowę ultrastrukturalną, spotykano tam zazwyczaj bardzo dobrze rozwinięty aparat Golgiego oraz niekiedy tzw. ciało jąderkopodobne, posiadające błonę otaczającą (ryc. 5). Ziarnistości neurosekrecyjne rozmieszczone były w nich zarówno w okolicy aparatu Golgiego, jak i w całej pozostałej cytoplazmie (ryc. 6).

Natomiast większość oglądanych neuronów SO i PV posiadała nieregularne w kształcie, bardzo znaczne poszerzenia kanałów siateczki śródplazmatycznej, zlokalizowane przeważnie w brzeżnych obszarach komórek oraz w wypustkach (ryc. 7, 8). Obecne były także ziarnistości neurosekrecyjne w całej komórce oraz w pobliżu aparatu Golgiego. Licz-



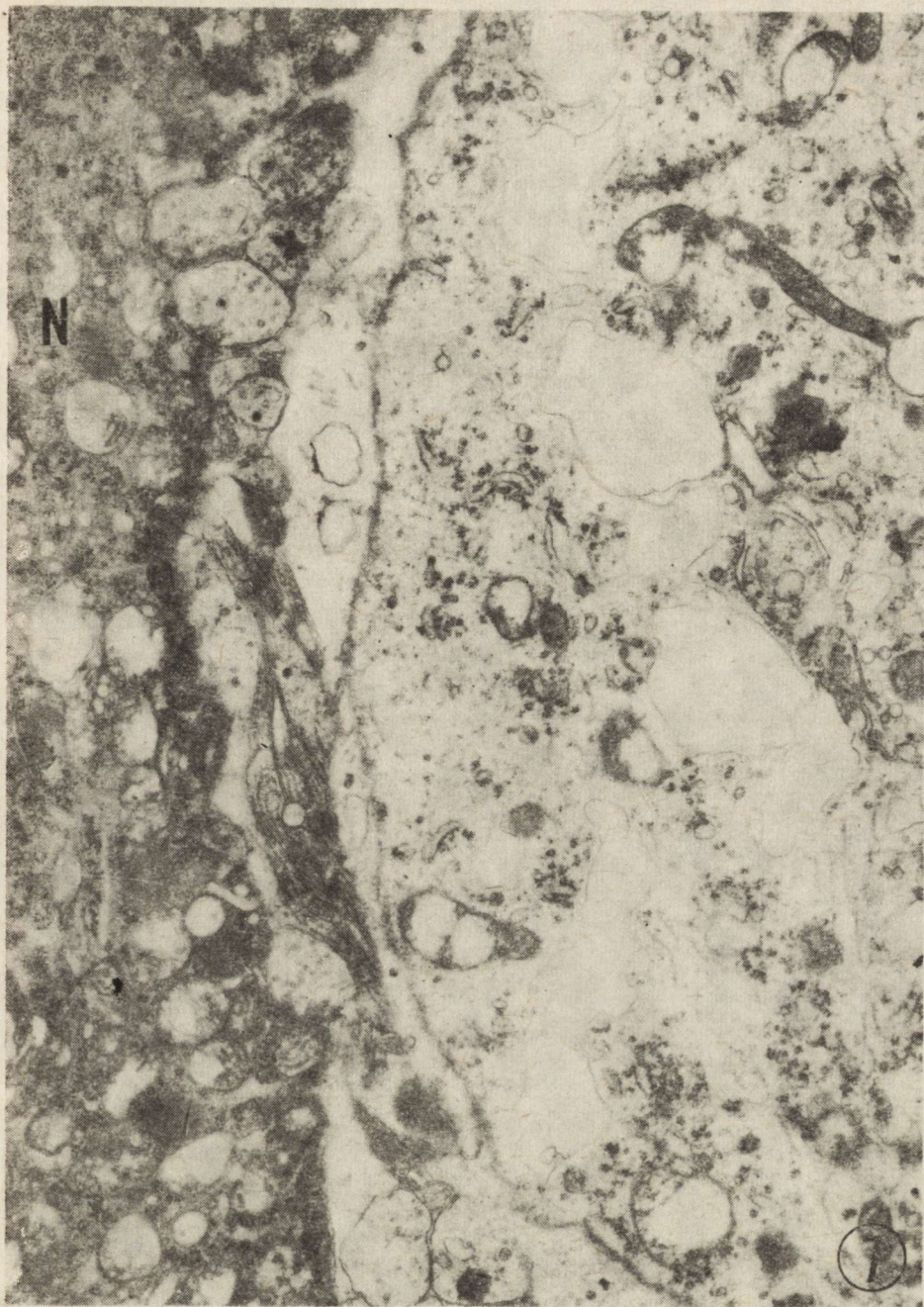
Ryc. 5. Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hipotermia. Fragment jądra i cytoplazmy. W cytoplazmie dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G) i liczne organella oraz ciało jąderkopodobne (NLB) otoczone pojedynczą błoną (strzałka). Pow. 12 450 \times

Fig. 5. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Very well developed Golgi apparatus (G), numerous organelles and nucleolus-like body (NLB) surrounded by unit membrane (arrow). $\times 12\ 450$



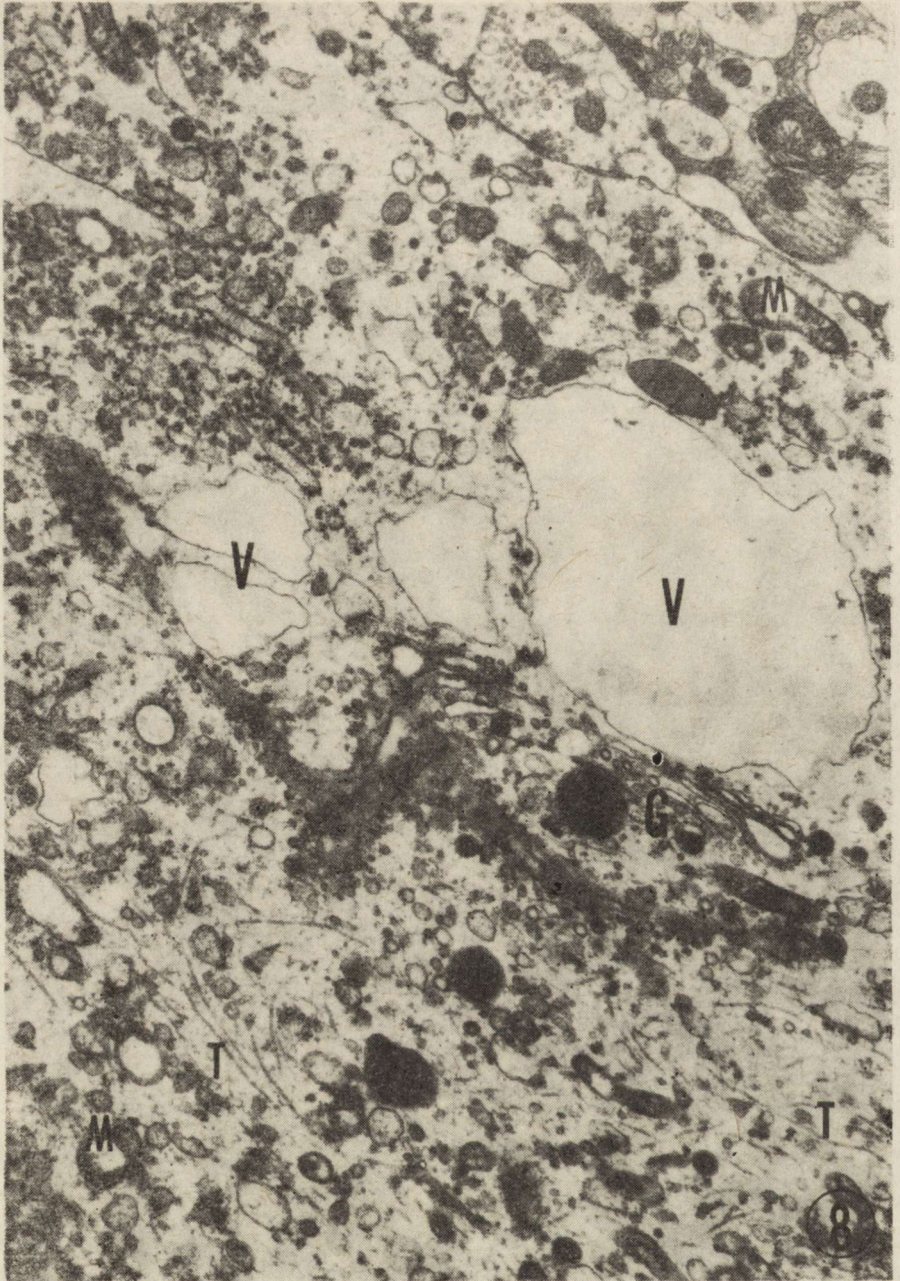
Ryc. 6. Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hipotermia. We fragmencie cytoplazmy ziarnistości neurosekrecyjne (E) zarówno w pobliżu aparatu Golgiego (G), jak i w całej cytoplazmie. Obecne są także liczne drobne mitochondria, ciała gęste i lizosomy. Pow. 12 750 ×

Fig. 6. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Numerous neurosecretory granules (E) are visible in the vicinity Golgi apparatus (G) and in whole cytoplasm. Numerous small mitochondria, dense bodies and lisosomes are visible in the fragment of cytoplasm. × 12 750



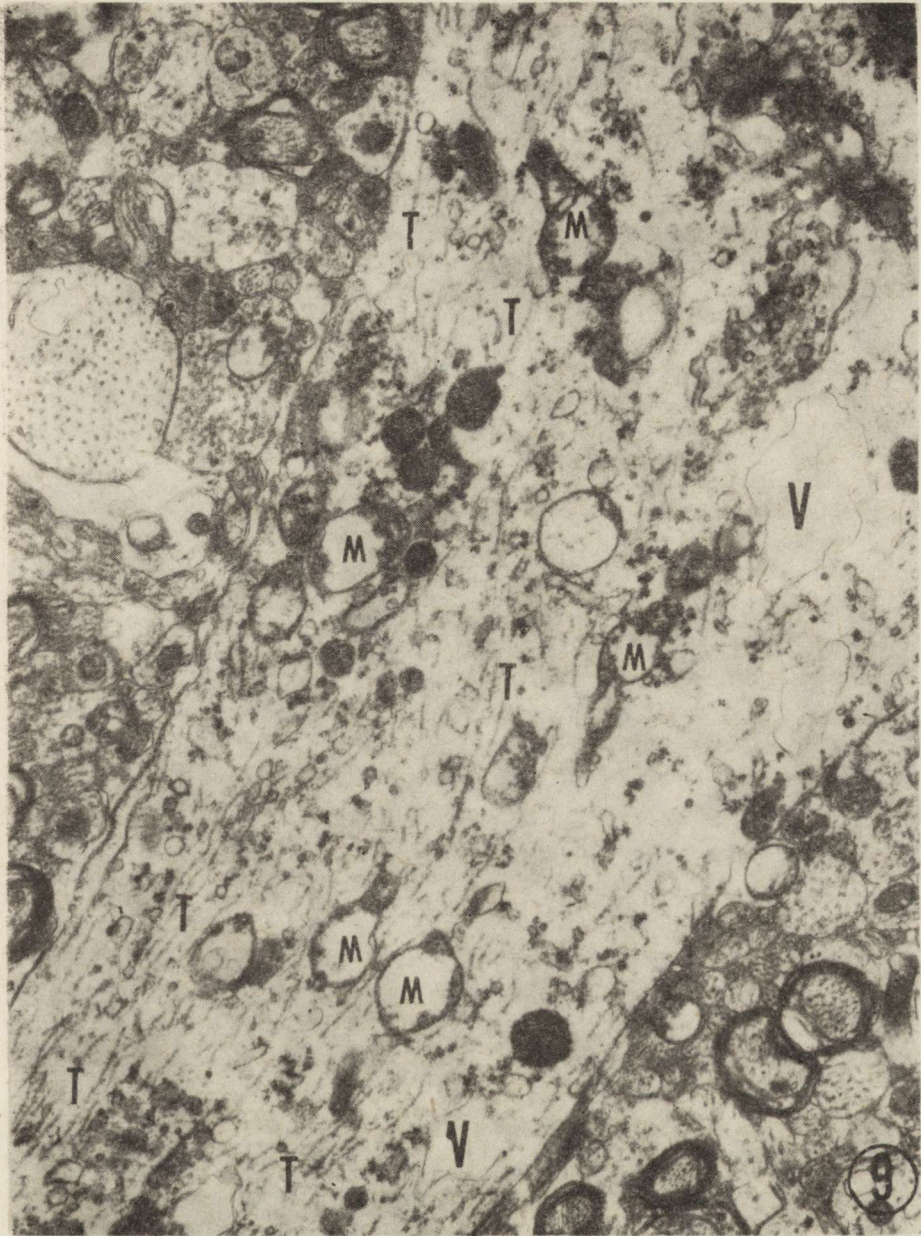
Ryc. 7. Jądro przykomorowe. Hipertermia i hipotermia. Fragmenty neuronu ciemnego (N) oraz neuronu z dużymi nieregularnymi poszerzeniami kanałów siateczki śródplazmatycznej w obwodowych partiach komórki. Pow. 12 750 ×

Fig. 7. Paraventricular nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Fragment of dark neuron (N), and neuron with big irregular dilatations of endoplasmic reticulum channels in periphery of cells. × 12 750



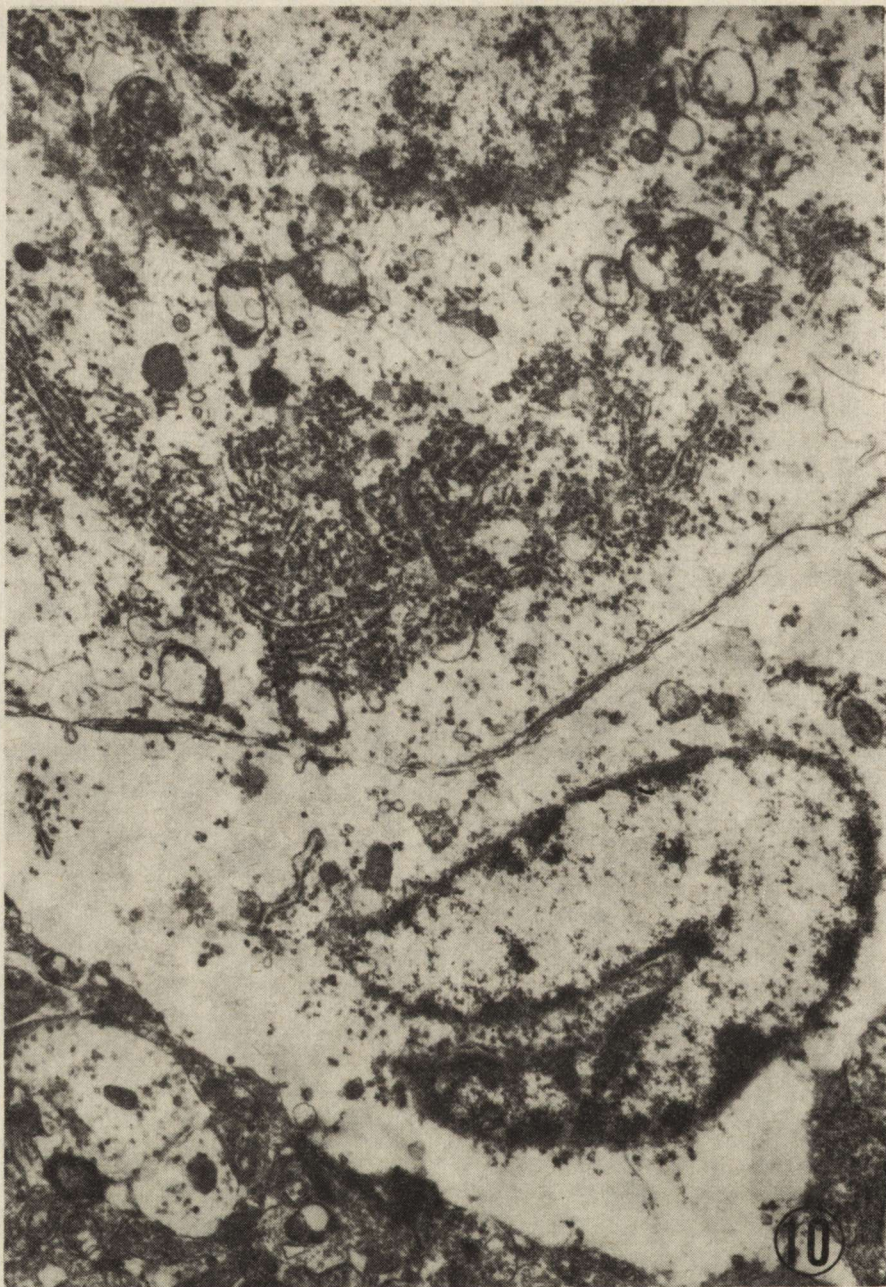
Ryc. 8. Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hypotermia. Obecne monstrialne poszerzenia siateczki śródplazmatycznej tworzące puste wakuole (V) oraz dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G) i liczne elementy cytoskeletonu (T). Niektóre mitochondria obrzmiałe (M). Pow. 12 750 ×

Fig. 8. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Monstrual dilatation of endoplasmic reticulum forming empty vacuoles (V), well developed Golgi apparatus (G) and numerous cytoskeleton elements (T). Some swollen mitochondria (M) are present. × 12 750



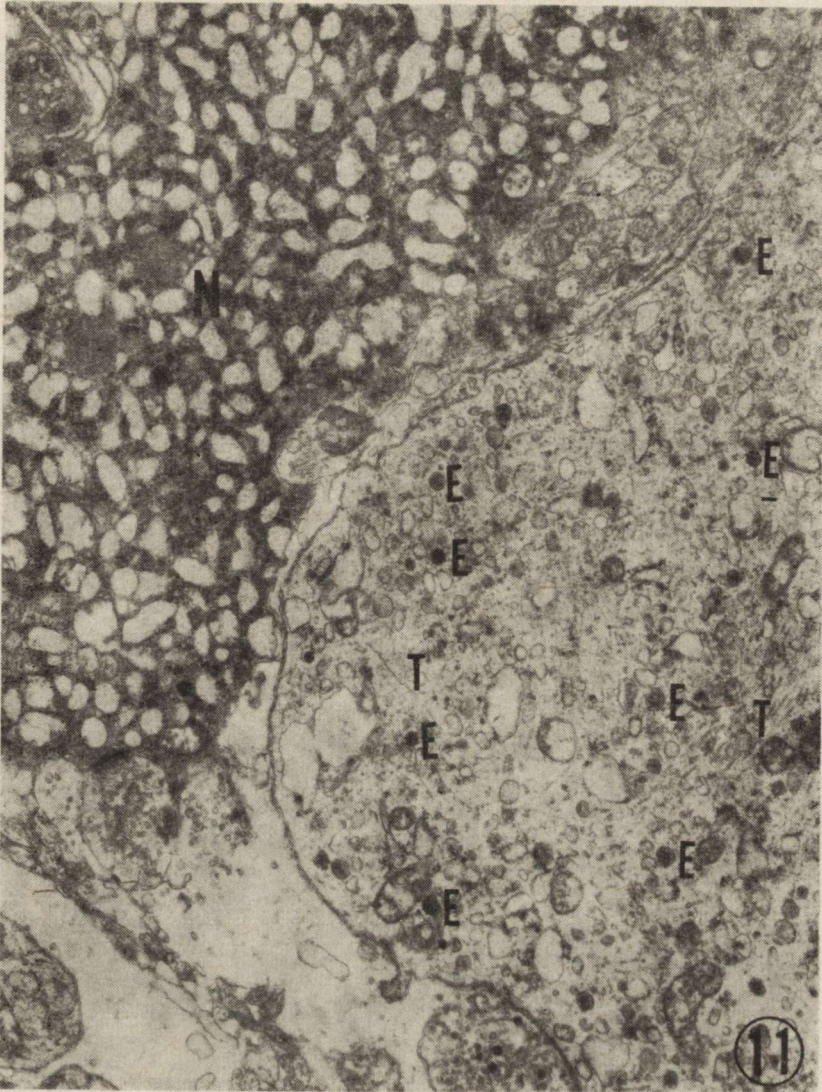
Ryc. 9: Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hipotermia. We fragmencie wypustki neuronu wakuolarne poszerzenia siateczki śródplazmatycznej (V), liczne elementy cytoskeletonu (T), ciała gęste i lizosomy oraz przeważnie obrzmiałe mitochondria (M). Pow. 12 750 ×

Fig. 9. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Vacuolar dilatations of endoplasmic reticulum (V), numerous elements of cytoskeleton (T) and dense bodies and lysosomes and swollen mitochondria (M) in process of neuron. × 12 750



Ryc. 10. Jądro przykomorowe. Hipertermia i hipotermia. Fragmenty dwóch neuronów o różnym stopniu obrzmienia. W jednym neuronie organelle są rozproszone, w drugim siateczka śródplazmatyczna ziarnista tworzy agregaty. Pow. 12 750 ×

Fig. 10. Paraventricular nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Fragments of two neurons of various extent of swelling. In one of them organelles are dispersed, in second rough endoplasmic reticulum forms aggregates. × 12 750

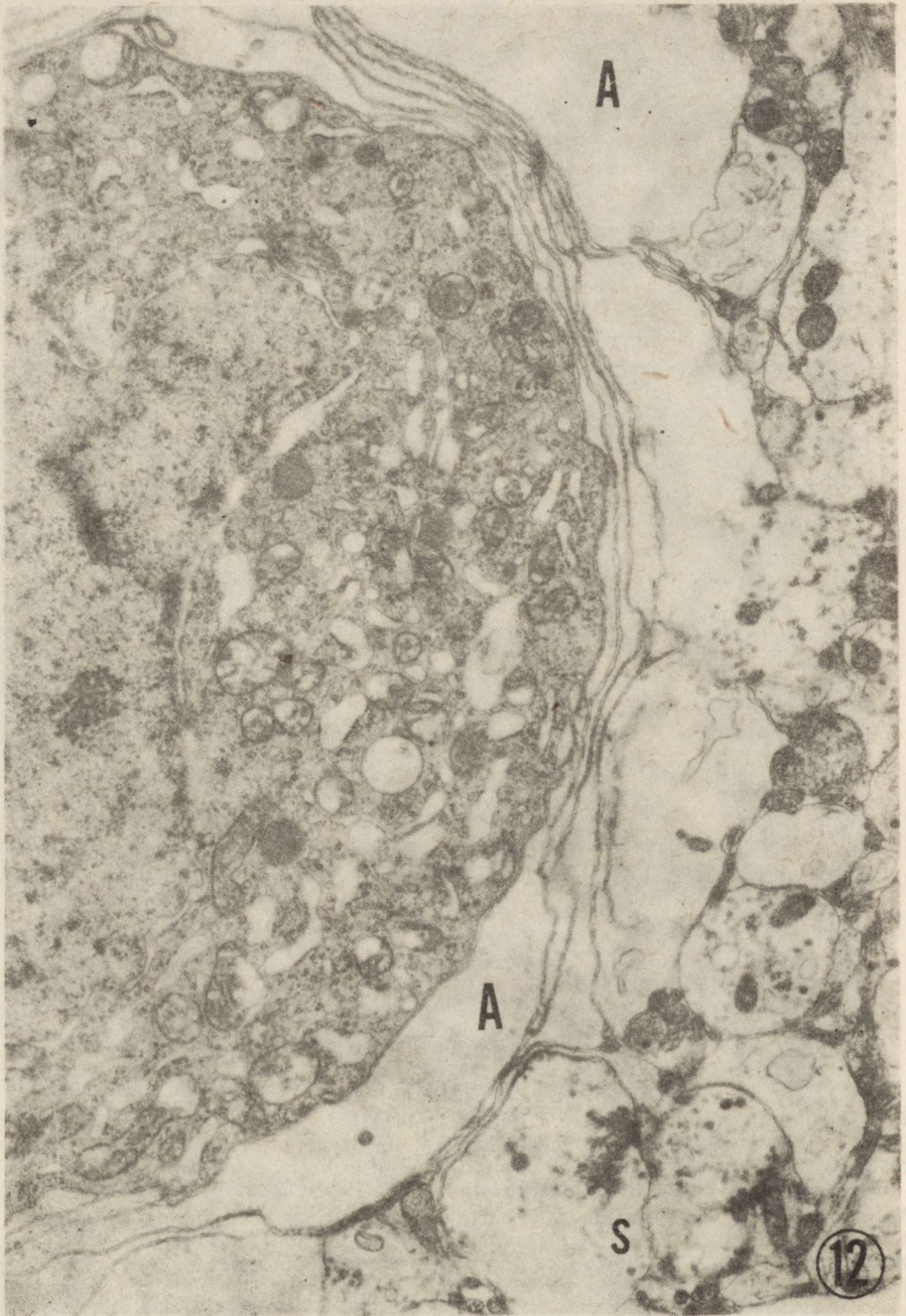


Ryc. 11. Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hipotermia. Fragmenty dwóch neuronów, jeden ulega mikrowakuolizacji (N), drugi o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej z dużą ilością ziarnistości neurosekrecyjnych (E), organelli i elementów cytoskeletonu (T). Pow. 12 750 \times

Fig. 11. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Fragments of two neurons. One of them is microvacuolized (N), second of normal ultrastructure, with large number of neurosecretory granules (E), organelles and cytoskeleton elements (T). $\times 12\ 750$

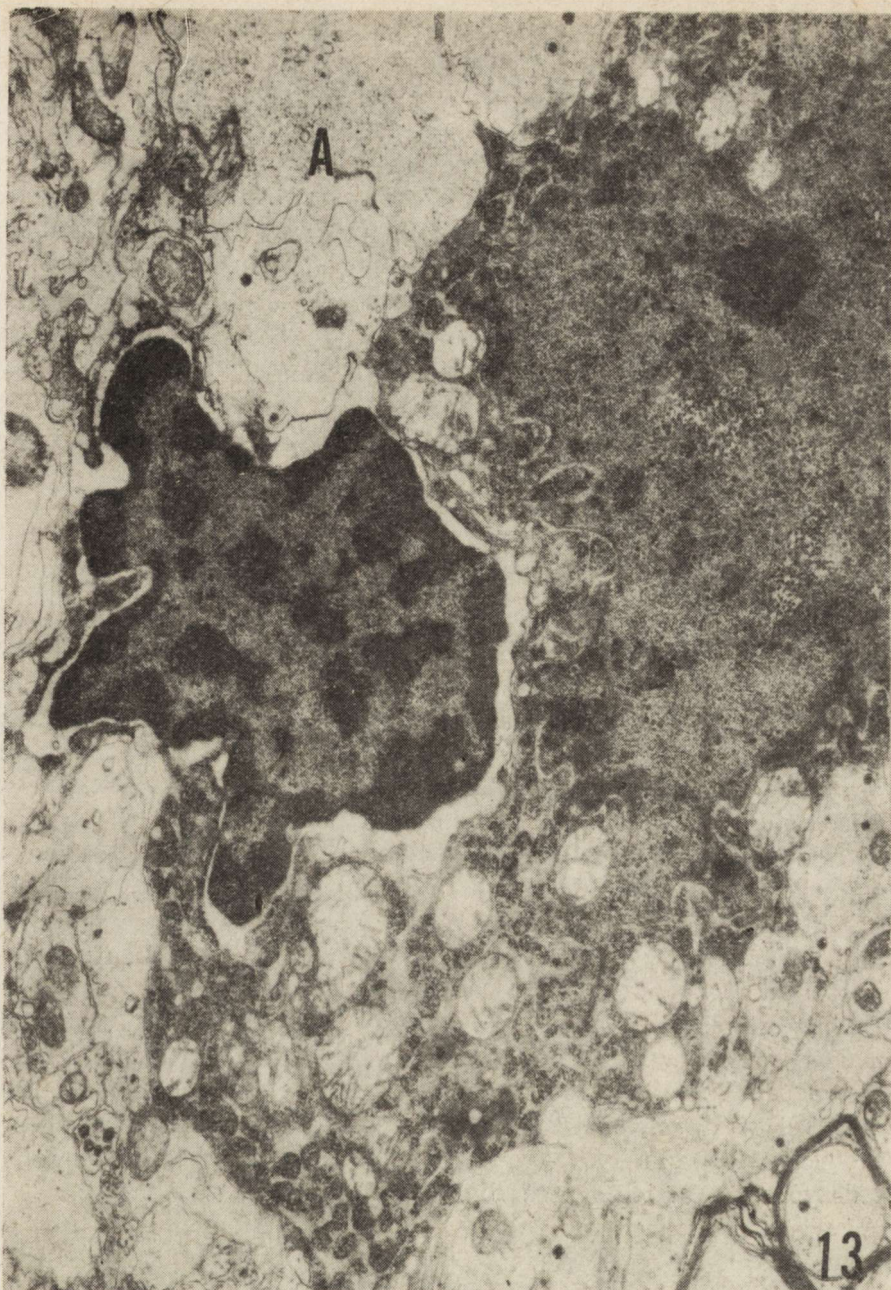
ne, różnej długości neurotubule układały się z dużą regularnością (ryc. 8, 9). Mitochondria były obrzmiałe.

W wielu neuronach obydwu jąder neurosekrecyjnych obserwowano duże obrzmienie cytoplazmy, prowadzące bądź do agregacji organelli (np. kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej, czy mitochondriów),



Ryc. 12. Jądro przykomorowe. Hipertermia i hipotermia. Fragment neuronu ciemnego, obok obrzmiałe wypustki astrocytarne (A) oraz zakończenia synaptyczne o jasnej aksoplazmie i skupionych mikropęcherzykach w niektórych synapsach (S).
Pow. 12 750 ×

Fig. 12. Paraventricular nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Fragment of dark neuron, beside swollen astrocytic processes (A), and synapses with electron lucent axoplasm and aggregated microvesicles (S). × 12 750



Ryc. 13. Jądro nadwzrokowe. Hipertermia i hipotermia. Fragment mocno zmienionego neuronu ciemnego w towarzystwie komórki mikroglejowej. Widoczne obrzmiałe wypustki astrocytarne (A). Pow. 12 750 \times

Fig. 13. Supraoptic nucleus. Hyperthermia and hypothermia. Fragment of considerable changed dark neuron, beside microglial cell. Swollen astrocytic processes (A) are visible. \times 12 750

bądź ich rozproszenia (ryc. 10). Obecne były także neurony ulegające mikrowakuolizacji (ryc. 11). Widywano również typowe neurony ciemne; towarzyszyły im w większym lub mniejszym stopniu obrzmiałe wypustki astrocytarne (ryc. 12). W bliskim kontakcie z neuronami ciemnymi wydawały się komórki mikrogleju (ryc. 13).

Wokół wielu naczyń krwionośnych obserwowano nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej otaczających wypustek astrocytarnych polegające na ich obrzmieniu. Budowa ultrastrukturalna niektórych połączeń synaptycznych odbiegała od normy. Połączenia akso-somatyczne i akso-dendrytyczne w pobliżu neuronów ciemnych wykazywały zmienioną budowę ultrastrukturalną, mianowicie w odcinku presynaptycznym aksoplazma była przejaśniona, a wiele pęcherzyków synaptycznych posklejanych między sobą; występowały pojedyncze pęcherzyki z gęstym rdzeniem różnej wielkości (ryc. 12).

OMÓWIENIE

Na podstawie uzyskanych obrazów morfologicznych należy sądzić, że zarówno hipertermia, jak i hipotermia wywołują aktywację większości neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza królika, niektóre tylko neurony ulegają zmianom nieodwracalnym (mikrowakuolizacja). Wiele neuronów ulega obrzmieniu, lecz jak wykazano, w przypadku hipertermii są to zmiany odwracalne (Gajkowska i wsp. 1985). Zastosowanie kolejno, bezpośrednio po sobie następującego przegrzania i oziębienia organizmu spowodowało również aktywację jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz ten sam charakter zmian w ultrastrukturze niektórych neuronów SO i PV. W tym ostatnim doświadczeniu zmiany miały większe nasilenie, dotyczyły też znacznie większej liczby neuronów.

Większość obserwowanych neuronów wykazywała nienormalności morfologiczne prowadzące do zaburzenia prawidłowego metabolizmu komórki neurosekrecyjnej (obrzemiecie i agregacja organelli oraz nieprawidłowości w budowie siateczki śródplazmatycznej ziarnistej). W tych neuronach widywano tylko pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne, co świadczyć może, że ich synteza była upośledzona.

W wielu neuronach zarówno SO, jak i PV zmiany mogły prowadzić do obumierania, czego dowodem było gromadzenie się komórek mikrogleju w ich najbliższym sąsiedztwie. Oprócz licznie występujących neuronów o budowie ultrastrukturalnej odbiegającej od normy spotykano w obydwu jądrach sekrecyjnych neurony prawidłowe, znajdujące się w różnych fazach cyklu sekrecyjnego. Cechy morfologiczne fazy syntezy białek sekrecyjnych opisywane przez Yukitake i wsp. (1977) odpowiadają cechom morfologicznym obserwowanym w wielu tzw. neuronach ciemnych obecnych w naszym materiale doświadczalnym. Niezwykle rzadko obserwowano natomiast fazę sekrecyjną, mianowicie neu-

rony wykazujące dużą ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w perikarionie czy wypustkach. W wielu neuronach SO i PV obserwowano obecność kulistych nieoblionionych skupisk materiału ziarnistego o dużej gęstości elektronowej, tzw. ciała jąderkopodobne, opisywanych w naszych poprzednich pracach (Gajkowska, Borowicz 1976; Gajkowska, Kochman 1981) oraz przez innych autorów (Anzil i wsp. 1973; Cohen, Pfaff 1981). Zostały one zidentyfikowane jako rybonukleoproteiny (Takeuchi, Takeuchi 1982). Po raz pierwszy w badanym materiale doświadczalnym zaobserwowano istnienie błony otaczającej tę strukturę. Cytoplazma większości neuronów o prawidłowej budowie wypełniona była neurotubulami i neurofilamentami rozrzuconymi z pewną regularnością w perikarionie oraz w wypustkach. Nieprzypadkowa jest rozbudowa cytoskeletonu w komórkach neurosekrecyjnych. Ostatnio podnosi się rolę mikrofilamentów aktynowych w mechanizmie przenoszenia i wydzielania ziarnistości sekrecyjnych w neuronach SO i PV (Livingston 1978; Alonso i wsp. 1981). W neuronach SO i PV o bogato rozwiniętym cytoskeletonie obecność ziarnistości neurosekrecyjnych jest zmienna, przeważnie mniejsza niż w kontroli.

Można sądzić, że w związku z aktywacją podwzgórzowo-przysadkowego układu antydiuretycznego, spowodowaną kolejnym przegrzaniem i gwałtownym oziębieniem, następuje wzmożona synteza wazopresyny. Według niektórych autorów wazopresyna tylko częściowo tworzy typowe ziarnistości neurosekrecyjne, pewna część hormonu może być także transportowana w postaci wolnych form amorficznych (Kirsch 1980).

Ostatnie badania Mormède (1984) wykazały, że wazopresyna wpływa również na uwalnianie ACTH z przysadki oraz z różnych okolic mózgu zawierających serotoninę, norepinefrynę i dopaminę, co potwierdziły również badania immunocytochemiczne (Romagnano, Joseph 1983). Przypuszcza się więc, że zarówno wazopresyna, jak i oxytocyna wytwarzana w SO i PV — te dwa klasyczne neurohormony — mogą posiadać także funkcję neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym (Buijs, van Heerikhuize 1982). Niektóre neurotransmitery zaś odgrywają doniosłą rolę w kontroli ogólnej ciepłoty ciała (Poole, Stephenson 1979).

Obserwowana reakcja neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego na podwójny stres termiczny (przegrzanie, oziębienie) pozwala przypuszczać, że neurony obydwu jąder sekrecyjnych są zaangażowane w mechanizmie kontrolującym termoregulację ustroju.

РЕАКЦИЯ НАДЗРИТЕЛЬНОГО ЯДРА И ОКОЛОЖЕЛУДОЧКОВОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРОЛИКА НА ГИПЕРТЕРМИЮ И ГИПОТЕРМИЮ ОРГАНИЗМА

Резюме

Автор оценила влияние стресса вызванного одноразовой гипертермией и гипотермией всего организма на ультраструктуру нейросекреторных ядер (О и Р) гипоталамуса кролика. На основании полученных морфологических картин следует считать что как гипертермия

так и гипотермия вызывает активацию большинства нейронов О и Р. Некоторые нейроны проявляют ультраструктурные морфологические аномалии заключающиеся в набухании цитоплазмы агрегации клеточных органелл а также изменения в структуре зернистой внутриплазматической сеточки. Нейросекреционные зернистости в этих нейронах немногочисленны. Интенсивность изменений довольно значительна только в немногочисленных нейронах приводя вероятно к расстройству их секреторного метаболизма. Одиночные нейроны О и Р проявляют дегенеративные изменения. В их окружении наблюдается накопление.

REACTION OF THE SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI OF THE RABBIT HYPOTHALAMUS TO HYPER- AND HYPOTHERMIA

Summary

The influence of stress caused by a single exposure of the whole organism to hyper- and hypothermia on the ultrastructure of the neurosecretive (SO and PV) nuclei of the rabbit hypothalamus was evaluated.

On the basis of the obtained morphological pictures it would seem that both hyper- and hypothermia activate most of the SO and PV neurons. Some neurons exhibit ultrastructural abnormalities consisting in swelling of the cytoplasm, aggregation of cell organelles and changes in the structure of the granular endoplasmic reticulum. The neurosecretory granules in these neurons are not numerous. More pronounced changes leading probably to disturbances in their secretory mechanism are found in only some neurons. Single SO and PV neurons show degenerative changes. They are surrounded by accumulated microglia.

PISMIENNIC TWO

1. Alonso G., Gabrion J., Travers E., Assenmacher J.: Ultrastructural organization of action filaments in neurosecretory axons of the rat. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 214, 323—341.
2. Anzil A., Herrlinger H., Blinzinger K.: Nucleolus-like inclusions in neuronal perikarya and processes: phase and electron microscope observations on the hypothalamus of the mouse. *Z. Zellforsch.*, 1973, 146, 329—337.
3. Bell J., Gruenthal M., Finger S., Mangold R.: Effects of one- and two-stage lesions of the posterior hypothalamus on temperature regulation in the rat. *Brain Res.*, 1981, 219, 451—455.
4. Benedict C., Fillenz M., Stanfors S.: Plasma noradrenaline levels during exposure to cold. *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 269, 47—48.
5. Boulant J.: Hypothalamic control of thermoregulation. *Handbook of the Hypothalamus*. Eds. P. J. Morgane, J. Panksepp. Marcel Dekker, New York 1980, 3A, 1—82.
6. Briesse E.: Heterogeneity of hypothalamic rewarding sites possibly involved in temperature regulation. *Physiology Behavior*, 1983, 30, 529—537.
7. Buijs R. M., van Heerikhuize J. J.: Vasopressin and oxytocin release in the brain — a synaptic event. *Brain Res.*, 1982, 252, 71—76.
8. Cabanac M., Dib B.: Behavioural responses to hypothalamic cooling and heating in rat. *Brain Res.*, 1983, 264, 79—87.
9. Cohen R. S., Pfaff D. W.: Ultrastructure of neurons in ventromedial nucleus

- of the hypothalamus in ovariectomized rats with or without estrogen treatment, *Cell Tiss. Res.*, 1981, 3, 451—470.
10. Ferguson A. V., Veale W. C., Cooper K. E.: Changes in the hypothalamic mechanisms involved in the control of body temperature induced by the early thermal environment. *Brain Res.*, 1984, 290, 297—306.
 11. Freeman W. J., Davis D. D.: Effects on cat of conductive hypothalamic cooling. *Am. J. Physiol.*, 1959, 197, 145—148.
 12. Fregly M. J., Tyler P. E.: Renal response of cold-exposed rats to pitrescin and dehydration. *Am. J. Physiol.*, 1972, 222, 1065—1070.
 13. Gajkowska B.: Wpływ wysokiej temperatury otoczenia na ultrastrukturę układu podwzgórzowo-przysadkowego. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 1—13.
 14. Gajkowska B.: Badania ultrastrukturalne układu podwzgórzowo-przysadkowego mózgu szczura w stresie hipotermicznym. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 21—31.
 15. Gajkowska B., Borowicz J. W.: Electron microscopic observations of supraoptic and paraventricular nuclei of rat brain in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 365—370.
 16. Gajkowska B., Kochman K.: Electron microscopic evidence for stimulation by estradiol of paraventricular nucleus of the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinol. Lett.*, 1981, 3, 179—188.
 17. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: The effect of high ambient temperatures on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55—69.
 18. Guzek J.: Hipotermia doświadczalna a układ dokrewny. *Pol. Tyg. Lek.*, 1956, 11, 1—20.
 19. Johanson D., Hayward J., Jacobs T., Collis M., Ecker J., Williams R.: Plasma norepinephrine responses of man in cold water. *J. App. Physiol.*, 1977, 43, 216—220.
 20. Kirsch B.: Nongranular vasopressin synthesis and transport in early stages of rehydration. *Cell Tiss. Res.*, 1980, 207, 89—107.
 21. Khail H.: Effect of hypothermia on the hypothalamic-pituitary response to stress. *Brit. Med. J.*, 1954, 733, 4890—4893.
 22. Leduc Y.: Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. *Acta Physiol. Scand Suppl.*, 1961, 53, 1—101.
 23. Livingston A.: The internal structure of axons from rat sciatic nerve. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 195, 341—348.
 24. Loesch A., Gajkowska B., Pluta R.: The effect of high ambient temperatures on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 70—81.
 25. Lomax P., Green M.: Histaminergic neurons in the hypothalamic thermoregulatory pathways. *Federation Proc.*, 1981, 40, 2741—2745.
 26. Makara G. B., Kvetnansky R., Jezova D., Kakucska: "Do circulating catecholamines participate in stress-induced release of ACTH?". Regulation of transmitter function. W: *Proc. 5th Meeting Eur. Soc. Neurochem. Red. E. S. Vizi, K. Magyar. Akademiai Kiadó, Budapest 1984*, 317—319.
 27. Metcalf G., Myers R. D.: Precise location within the preoptic area where noradrenaline produces hypothermia. *Europ. J. Pharmacol.*, 1978, 51, 47—53.
 28. Morméde P.: No role of vasopressin in stress-induced ACTH secretion. *Nature*, 1984, 308, 85—86.
 29. Nelson E. L., Fregly M. J., Tyler P. E.: Effect of water temperature on post-cold-exposure drinking response of rat. *Am. J. Physiol.*, 1974, 227, 977—980.
 30. Poole S., Stephenson J. D.: Effects of noradrenaline and carbachol on temperature regulation of rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 1979, 65, 43—51.

31. Romagnano M., Joseph S.: Immunocytochemical localization of ACTH⁽¹⁻⁸⁹⁾ in brain stem of the rat. *Brain Res.*, 1983, 276, 1—16.
32. Satinoff E.: Behavioral thermoregulation in response to local cooling of the rat brain. *Am. J. Physiol.*, 1964, 206, 1385—1394.
33. Szczepańska-Sadowska E.: Fizjologiczne mechanizmy tłumiące pragnienie i wzmagające wydzielanie wazopresyny w hipertermii. *Studia Societatis Scientiarum Torunensis*. Toruń — Polonia, 1977, 8, 1—71.
34. Takeuchi J. K., Takeuchi Y. K.: Ultrastructural and cytochemical studies on nucleolus-like bodies in early postimplantation rat embryos. *Cell Tiss. Res.*, 1982, 226, 257—266.
35. Yukitake Y., Taniguchi Y., Kurosumi K.: Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and formation of ferring bodies in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tiss. Res.*, 1977, 177, 1—8.

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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, JERZY BOROWICZ

EARLY ELECTRON-MICROSCOPIC CHANGES IN HEPATOGENIC
ENCEPHALOPATHY INDUCED BY THIOACETAMIDE
INTOXICATION IN RATS

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

Although primary astrocytic alterations in both spontaneous and experimentally induced hepatogenic encephalopathy are commonly accepted, there exist considerable differences of opinion as far as their electron-microscopic nature is concerned. Descriptions of ultrastructural changes of astrocytes in natural hepatic encephalopathies in man, based on biopsy material are rare and as a rule concern advanced stages of the pathological process (Martinez, 1968; Foncin, Nicolaides 1970). They indicate the appearance of non-specific degeneration of astrocytes, involving both perikarya and processes. In descriptions of animal material, including various experimental models and different stages of hepatogenic encephalopathies, two types of astrocytic abnormalities can be distinguished. The first is represented by an increased cytoplasmic volume concomitant with an enhanced content of cytoplasmic organelles, mostly mitochondria and rough endoplasmic reticulum. On the contrary, the second type consists in remarkable reduction of cellular organelles in watery looking astrocytic cytoplasm, this being accompanied by an increased content of dense bodies and glycogen accumulation (Zamora et al. 1973; Norenberg, Lapham 1974; Ostenda et al. 1976). Norenberg (1981) considers the first group of changes as exponents of metabolic and functional activation of astrocytes, typical for early stages of experimental hepatogenic encephalopathy, while the others are supposed to represent a late degenerative stage of the pathological process. However, this concept does not find confirmation in other observations. In experimental portal-caval encephalopathy Zamora et al. (1973) had noted an entirely opposite sequence of events, namely, swelling of cytoplasm and reduction of subcellular elements in early stages of the process, and reactive changes including proliferation of gliofilaments in

its later phases. Norenberg (1977) observed ultrastructural evidence of astrocytic activation in advanced stages of experimental hepatogenic encephalopathy.

The above mentioned discrepancies inclined us to perform electron-microscopic analysis of the early phase of thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy in rats. This experimental model is characterized by rapid severe liver damage accompanied by biochemical evidence of its insufficiency and morphological and metabolic features typical for hepatogenic encephalopathy (Hilgier, 1983, Hilgier et al. 1983). Our previous studies revealed that electron-microscopic alterations of the brain in the 2nd and 3rd weeks of its development consisted in generalized astrocytic degeneration leading to the formation of typical Alzheimer cells, type II (Mossakowski et al. 1984).

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out on female albinotic Wistar rats, weighing 180–200 g, given two intraperitoneal injections of thioacetamide in doses of 250 mg/kg b. weight, in the interval of 24 h. Control animals received intraperitoneal injections of physiological salt solution. The animals were sacrificed in groups of 3 (2 experimental and 1 control) after 24 h and 7 days following the second injection, by transcardiac perfusion with 2 percent glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.2. The brains taken out of the skull were additionally fixed overnight in the same solution at 4°C. Then they were cut coronally into slices 1 mm thick. For electron microscopy 1 mm³ tissue blocks were taken from the frontal cortex, cortico-subcortical junction of the same region and from the putamen. They were postfixed in 2% osmium tetroxide and processed in a routine way to embedding in Epon 812. Ultrathin sections, counterstained with uranyl acetate and lead citrate were examined in a JEM 7A electron microscope.

RESULTS

The same electron-microscopic abnormalities were present in all examined structures. Although the nature of tissue alteration in animals sacrificed 24 h and 7 days after intoxication was essentially similar, there existed, however, differences in their general pattern which justify their separate description.

Twenty four hours after intoxication neurocytes in both grey formations were well preserved. However, in most of them mitochondria were swollen with damaged or disappearing cristae (Fig. 1). In no case were so-called dark neurons present. Profiles of neuropil, mostly dendrites and both myelinated and unmyelinated axon cylinders showed no

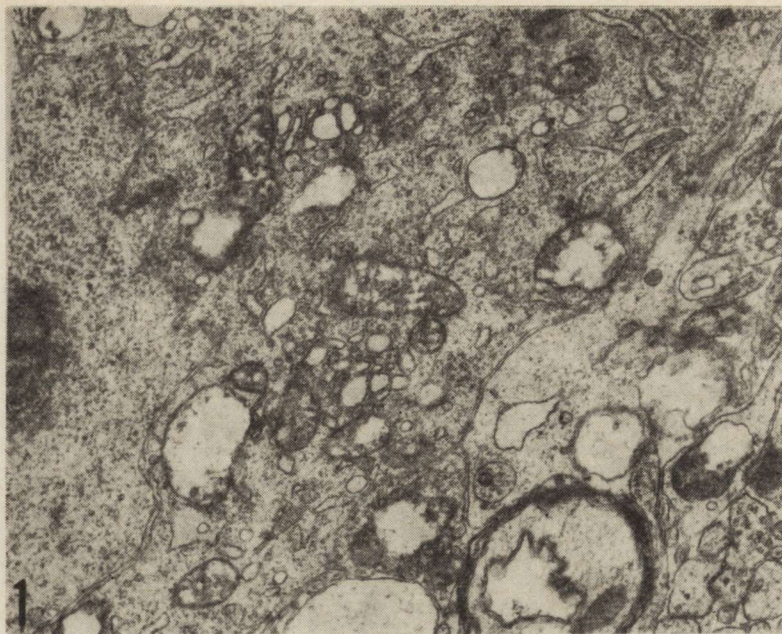


Fig. 1. Fragment of nerve cell with numerous swollen mitochondria and slightly dilated cisterns of Golgi apparatus. E.M. $\times 10\ 125$

Ryc. 1. Fragment komórki nerwowej z licznymi obrzmiałymi mitochondriami i nieznacznie poszerzonymi zbiornikami aparatu Golgiego. M.E. Pow. $10\ 125 \times$

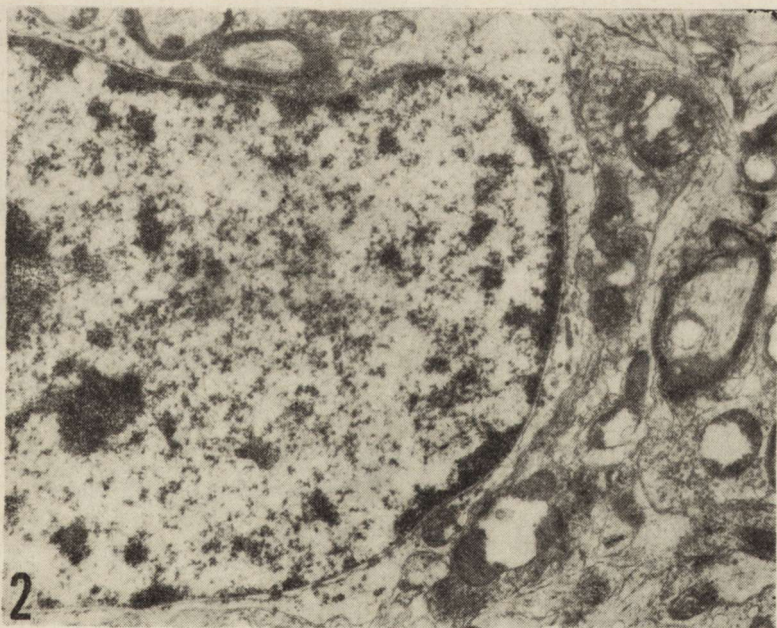


Fig. 2. Fragment of oligodendrocyte with apparently normal ultrastructural features. Neighbouring neuronal processes and axonal terminals with swollen mitochondria. E.M. $\times 10\ 125$

Ryc. 2. Fragment oligodendrocytu o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. W otoczeniu widoczne obrzmiałe mitochondria wypustek nerwowych i zakończeń synaptycznych. M.E. Pow. $10\ 125 \times$

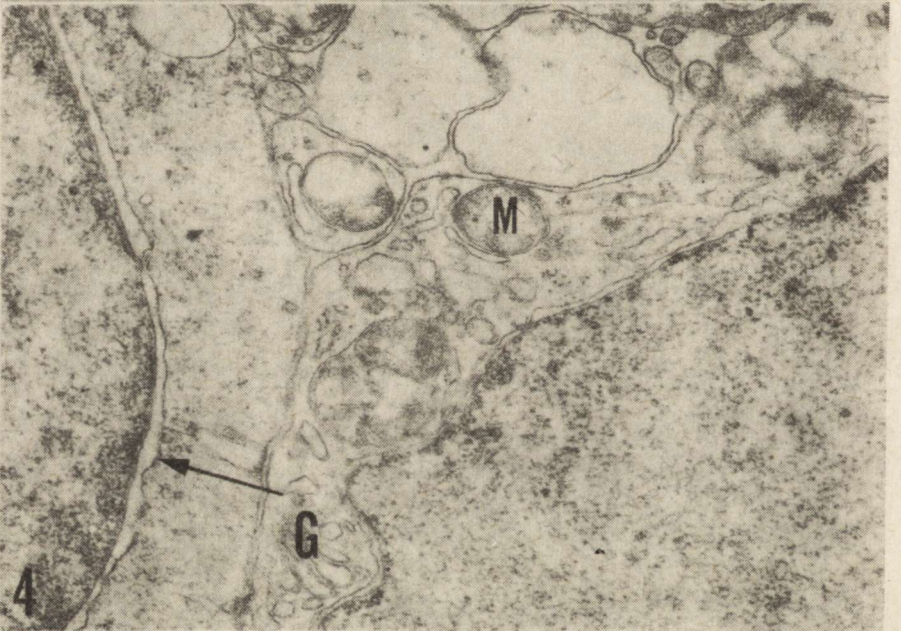
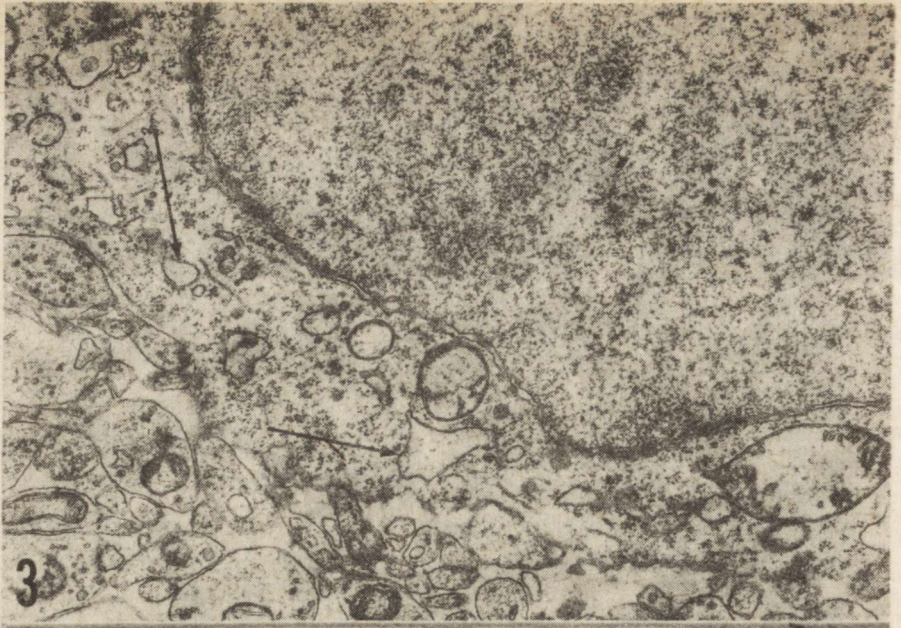


Fig. 3. Fragment of astrocyte with abundant cytoplasm containing swollen mitochondria, dilated channels of endoplasmic reticulum (arrows) and ribosomal aggregations. E.M. $\times 11850$

Ryc. 3. Fragment astrocytu z obfitą cytoplazmą zawierającą obrzmiałe mitochondria, poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej (strzałki) i obfite skupienia rybosomów. M.E. Pow. 11 850 \times

Fig. 4. Fragments of two astrocytes. The right one with remarkably developed cytoplasmic structures. The cell on the left side with with apparently normal cytoplasmic features and slightly dilated perinuclear space. (arrow). M — mitochondria, G — Golgi apparatus. E.M. $\times 28800$

Ryc. 4. Fragmenty dwóch astrocytów. Komórka po prawej stronie zawiera znacznie rozwinięte struktury cytoplazmatyczne. Komórka po stronie lewej z cytoplazmą o typowym obrazie, nieznaczne poszerzenie przestrzeni okołojądrowej (strzałka). M — mitochondrium, G — aparat Golgiego. M.E. Pow. 28 800 \times

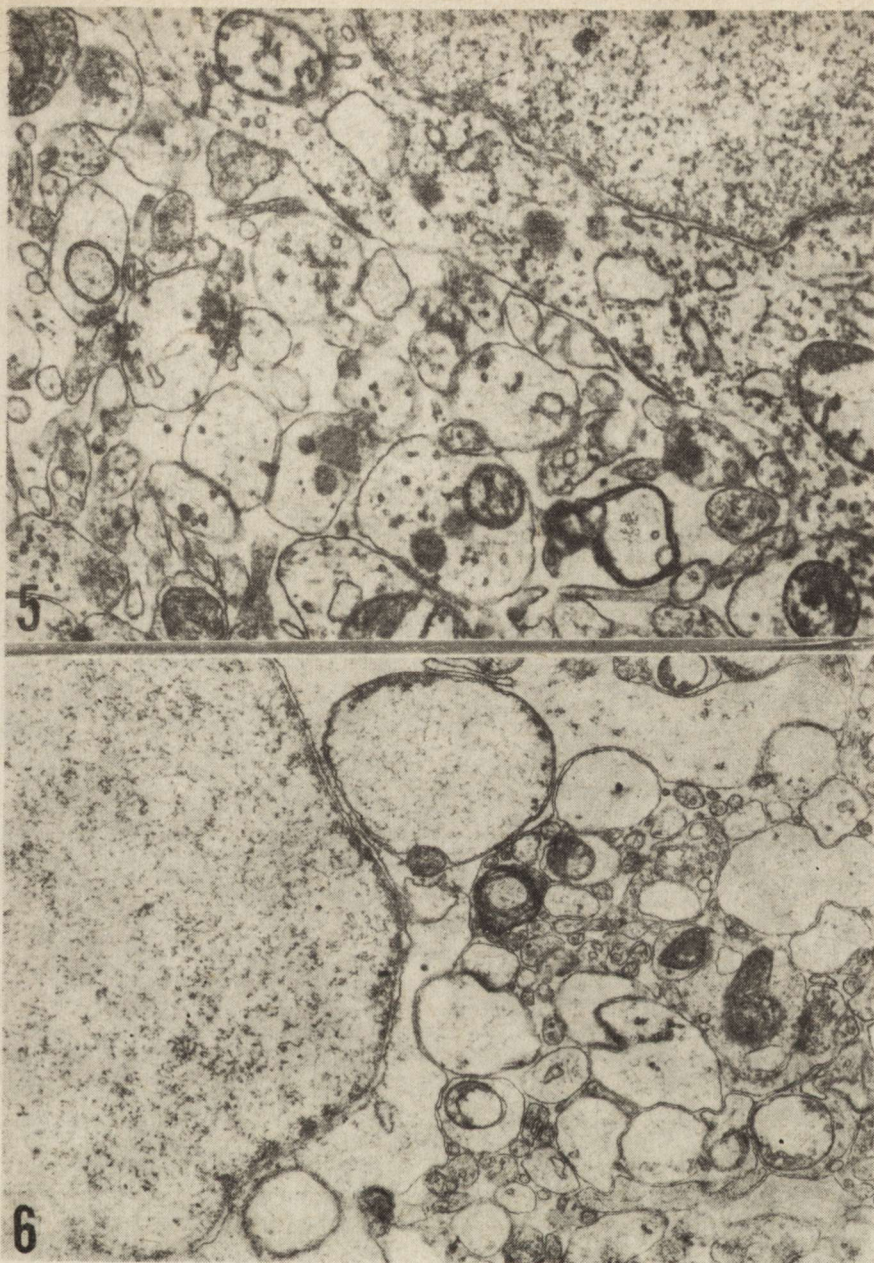


Fig. 5. Fragment of astrocyte with abundant cytoplasm rich in subcellular organelles. Dilated channels of endoplasmic reticulum and small dense bodies are visible. E.M. \times 11 850

Ryc. 5. Fragment astrocytu z obfitą cytoplazmą, bogatą w organelle subkomórkowe. Widoczne poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej oraz pojedyncze ciała gęste. M.E. Pow. 11 850 \times

Fig. 6. Fragment of astrocyte with remarkably swollen cytoplasm, containing single abnormal mitochondria and small ribosomal aggregates. E.M. \times 12 150

Ryc. 6. Fragment astrocytu z obrzmiałą cytoplazmą perykarionalną i wypustkową zawierającą jedynie pojedyncze obrzmiałe mitochondria i drobne skupienia rybosomalne. M.E. Pow. 12 150 \times

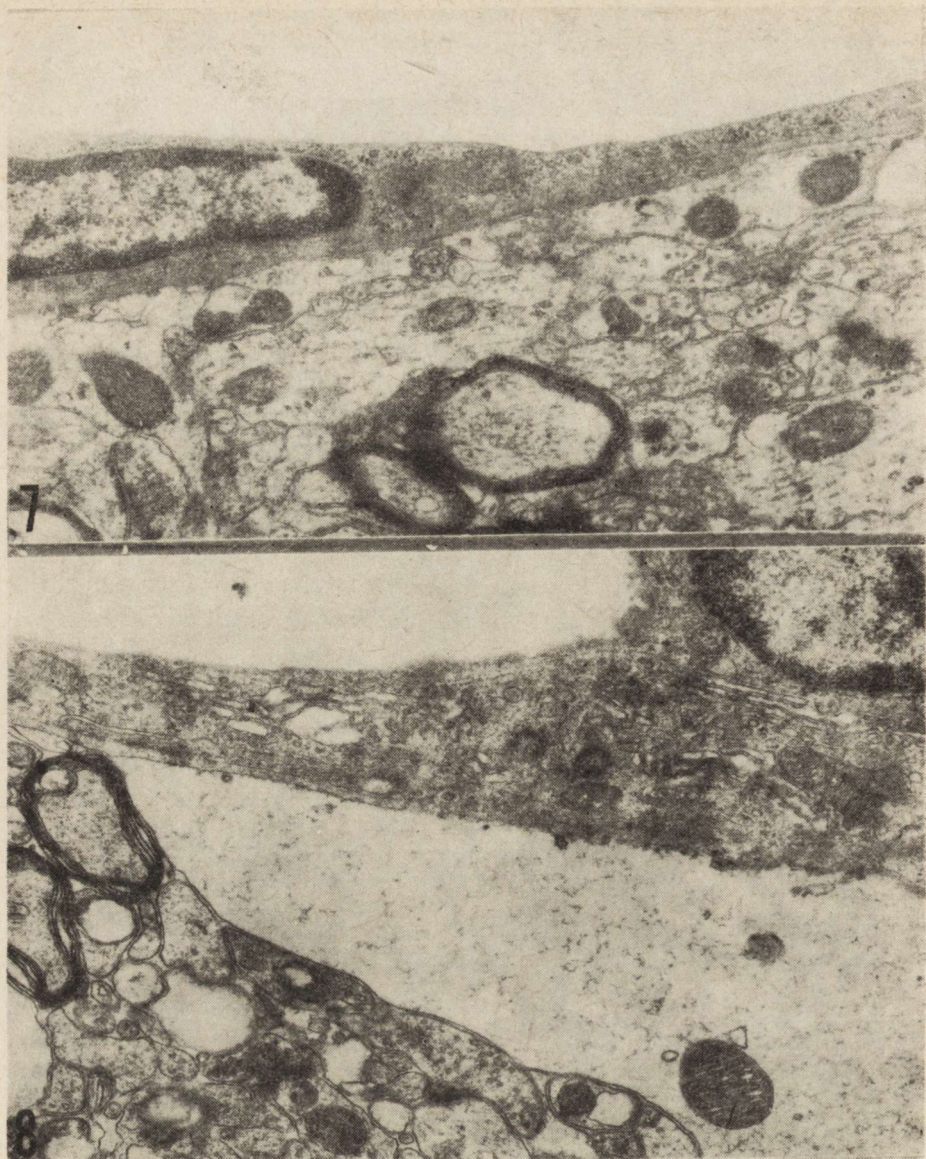


Fig. 7. Fragment of capillary vessel with normal ultrastructure of the wall and unchanged neuropil surroundings. E.M. $\times 10\ 125$

Ryc. 7. Fragment naczyń włosowatego o prawidłowej strukturze ścian i niezmiennym otoczeniu. M.E. Pow. $10\ 125 \times$

Fig. 8. Fragment of capillary vessel with adjacent swollen astrocytic process, containing amorphous floccular material and a single dark mitochondrion. E.M. $\times 12\ 150$

Ryc. 8. Fragment naczyń włosowatego z przylegającą znacznie obrzmiałą wypustką astrocytu, zawierającą wyłącznie bezpostaciowy materiał kłaczkowaty i pojedyncze ciemne mitochondrium. M.E. Pow. $12\ 150 \times$

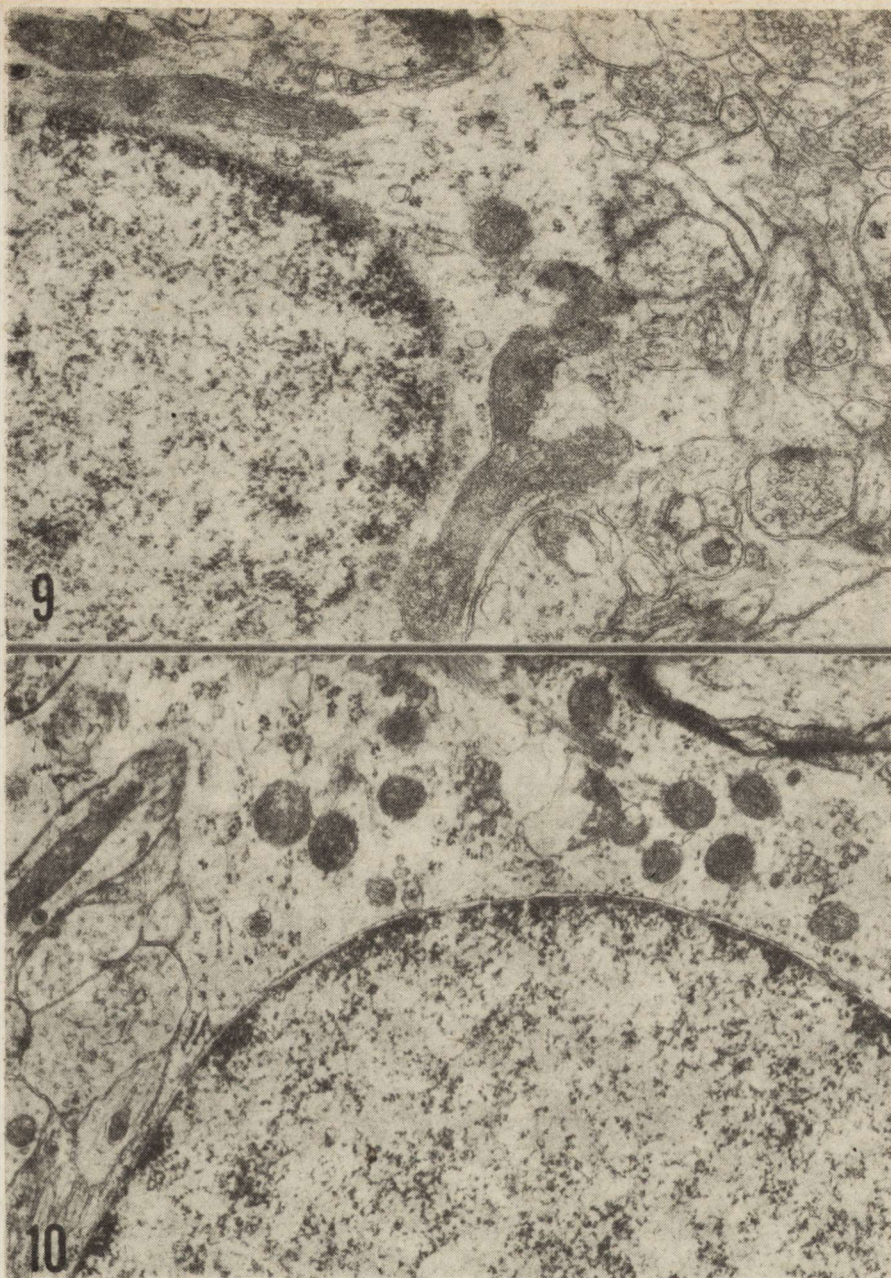


Fig. 9. Fragment of astrocyte. In the cytoplasm numerous elongated or branched mitochondria and scarce endoplasmic reticulum in the form of round and elongated cisterns are seen. Less abundant ribosomal aggregates. E.M. $\times 18\ 000$
Ryc. 9. Fragment astrocytu. W cytoplazmie widoczne liczne, wydłużone lub rozgałęzione mitochondria oraz siateczka śródplazmatyczna w postaci okrągłych lub wydłużonych zbiorników. Mniej obfite skupienia rybozomalne. M.E. Pow. $18\ 000 \times$

Fig. 10. Fragment of astrocyte. Normal nucleus. Light cytoplasm contains numerous small mitochondria, scarce fragments of endoplasmic reticulum, small irregularly distributed ribosomal aggregates and some neurofilaments. E.M. $\times 12\ 150$

Ryc. 10. Fragment astrocytu z prawidłowym jądrem i przejaśnioną cytoplazmą zawierającą liczne drobne mitochondria, skąpe fragmenty siateczki śródplazmatycznej, małe nieregularnie rozrzucone skupienia rybozomalne i pojedyncze neurofilamenty. M.E. Pow. $12\ 150 \times$

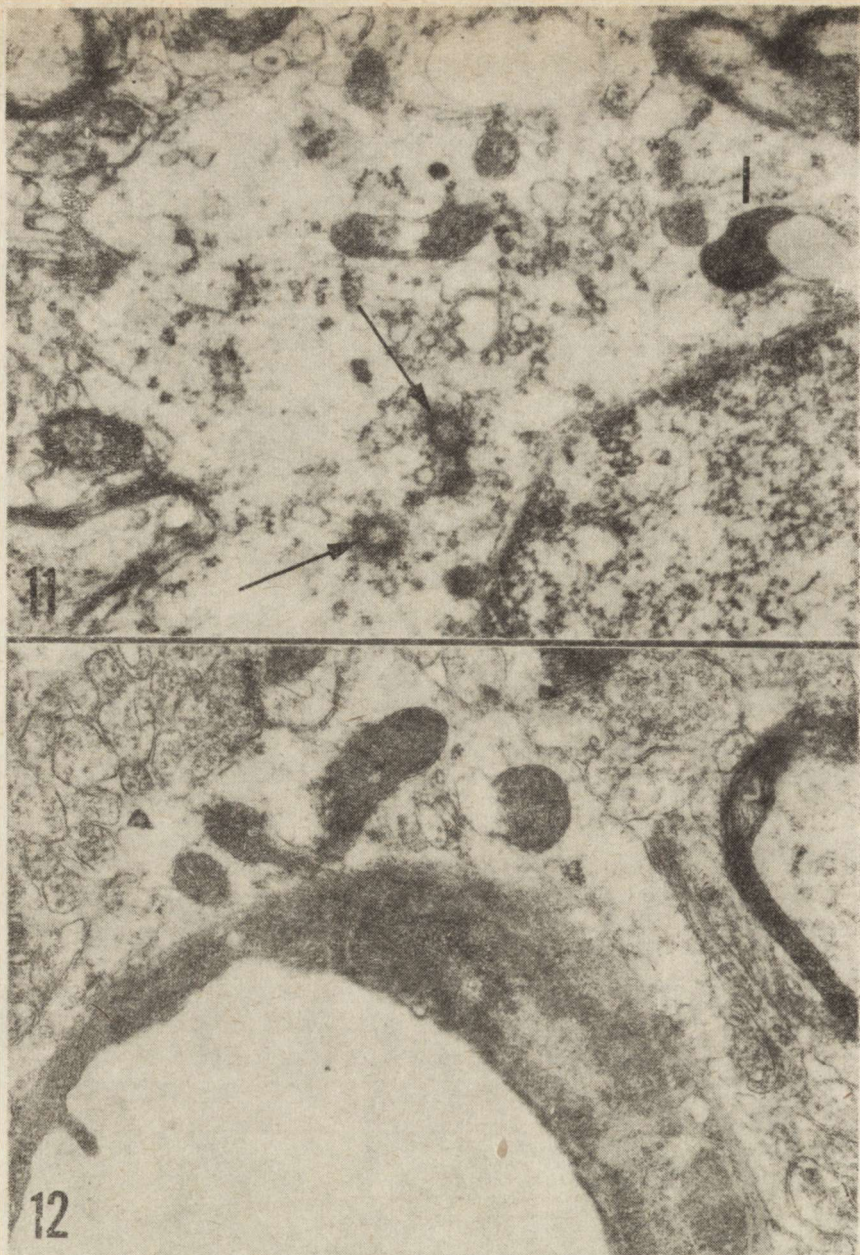


Fig. 11. Fragment of astrocyte with advanced disintegration of cytoplasmic structures. Large areas of cytoplasm are light and deprived of subcellular structures. Some swollen mitochondria and irregular accumulation of endoplasmic reticulum cisterns are seen. L — lysosome, C — centrioles (arrows). E.M. $\times 31\,800$

Ryc. 11. Fragment astrocytu z zaawansowaną dezintegracją struktur cytoplazmatycznych. Przejaśniona na dużych obszarach cytoplazma pozbawiona struktur subkomórkowych. Widoczne są nieliczne obrzmiałe mitochondria, nieregularne skupienia zbiorników siateczki śródplazmatycznej, lizosom (L) i centriole (C) (strzałki). M.E. Pow. 31 800 \times

Fig. 12. Fragment of capillary wall. Adjacent astrocytic process with mostly swollen mitochondria and accumulation of amorphous floccular and vesicular material. E.M. $\times 34\,500$

Ryc. 12. Fragment ściany naczynia włosowatego. Przylegająca wypustka astrocytu zawiera obrzmiałe, częściowo obrzmiałe, oraz bezpostaciowy kłaczkowaty i drobnopęcherzykowy materiał. M.E. Pow. 34 500 \times

pathological changes, except some mitochondrial swelling. Unchanged were oligodendrocytes, both in grey and white matter (Fig. 2). Alterations involved astrocytes in all examined structures. The nuclei revealed a typical ultrastructural pattern. They were light and contained a small amount of fine-granular chromatine evenly distributed with some peripheral condensation. The nuclear envelope was sharply outlined. The cytoplasm of most astrocytes was voluminous and much richer in subcellular organelles as compared with control material. Alongside with typical ribosomal aggregations, numerous large mitochondria, some of them swollen and abundant fragments of granular endoplasmic reticulum were present (Figs 3, 4, 5). Some channels of rough endoplasmic reticulum were distended forming vesicular structures. Sporadically small dense bodies were seen. Golgi apparatus was well developed. In addition to so changed astrocytes dominating the electron microscopic picture, there were cells with entirely normal ultrastructure. In some pictures severely swollen astrocytes were present. The cytoplasm of their perikarya and processes was watery in appearance and contained only a few swollen mitochondria and some small ribosomal aggregations (Fig. 6). The capillary network showed no abnormality. Both endothelial cells and neuropil structures surrounding capillaries, including astrocytic processes were unchanged, (Fig. 7). However, sporadically remarkably swollen perivascular astrocytic processes, containing delicate floccular material and scarce dense mitochondria were present (Fig. 8).

In animals sacrificed 7 days following intoxication ultrastructural abnormalities were limited to astrocytes. Neurons, oligodendrocytes, morphological elements of neuropil and capillary walls were unchanged. Similarly as in the previously described group, hypertrophied astrocytes were numerous. However, the amount of subcellular structures in their cytoplasm was undergoing reduction (Fig. 9). This concerned mostly channels of rough endoplasmic reticulum and free ribosome aggregates (Fig. 10). The next step of abnormalities consisted in cytoplasmic disintegration with total or partial loss of organelles (Fig. 11). The electron-microscopic picture was dominated by astrocytes with watery cytoplasm, containing some remnants of subcellular organelles. Most of the capillaries were surrounded by swollen astrocytic processes, containing a few organelles and both floccular and vesicular material (Fig. 12). Astrocytes revealing normal ultrastructure were very rare.

DISCUSSION

Ultrastructural abnormalities found in experimental material involved almost exclusively astrocytes. This confirms the commonly accepted opinion concerning primary astrocytic damage in hepatogenic encephalopathy (Mossakowski 1966; Seitelberger 1970; Norenberg 1981).

However, the most early electron-microscopic changes of astroglia differ essentially from those described in human material (Martinez 1968; Foncin, Nicolaides 1970) and in most cases of experimental pathology (Zamora et al. 1973, Norenberg, Lapham 1974, Ostenda et al. 1976). They are also different from the ultrastructural abnormalities found in later stages of the same experimental model (Mossakowski, Borowicz 1984). The most essential difference consists in the fact that a great part of astrocytic population in early stage of hepatogenic encephalopathy reveals features of functional and metabolic activation, with only slight participation of degenerative changes. The dominating astrocytic alterations were similar to those described by Norenberg (1979) as well as Laursen and Diemer (1979) in early stages of hepatogenic encephalopathy induced by hyperammonemia accompanying urease application and portal-caval shunt. It is worth mentioning that thioacetamide-induced experimental hepatic lesions are also characterized by a remarkable increase of ammonia content in the blood, with its totally normal level in brain tissue in the stage under study (Albrecht, Hilgier 1984). As astrocytes form the basic cellular compartment of the central nervous system, in which detoxification of ammonia to glutamine takes place (Norenberg 1981), it seems plausible to suggest that their activation evidences compensatory processes, which in turn condition a lack of ammonia level increase in the brain in the course of the pathological process, accompanied by its striking enhancement in the blood. The problem to what extent an enhanced activity of glutamate dehydrogenase and increased glutamate synthetase synthesis, mentioned by Norenberg (1981) in early stages of hepatogenic encephalopathy, be connected with the increased number of astrocytic mitochondria and their enlargement, and activation of rough endoplasmic reticulum observed in our material, remains open owing to the lack of parallel biochemical studies. Nevertheless, this hypothesis suggested by Norenberg (1981) seems both probable and attractive.

A feature, worth mentioning is the fact, that already in the earliest period of experimental hepatogenic encephalopathy with dominating evidence of astrocytic activation, degenerative changes appear in them. In this respect our observations differ from those of Norenberg (1977), who stressed the lack of astrocytic degeneration in early phases of hepatogenic encephalopathy. Basing on the here presented and earlier observations (Mossakowski, Borowicz 1984) it seems possible to suggest a sequence of astrocytic abnormalities in the evolution of experimental hepatogenic encephalopathy. The earliest process is characterized by progressive astrocytic changes, expressed as generalized proliferation and hypertrophy of astroglia. During evolution of the pathological process they are overlapped by astrocytic degeneration. As shown in animals with 7-day survival following intoxication, features of degeneration

appear in previously activated cells. Such a sequence of changes finds confirmation in light-microscopic neuropathology of natural hepatogenic encephalopathy in man and experimental animals, characterized by concomitance of both categories of cellular abnormalities. The question whether subsequent changes are due to the same factor or to additional pathogenic ones remains to be answered.

A distinct feature in the electron microscopic picture of the earliest phase of hepatogenic encephalopathy induced by thioacetamide intoxication as compared to its more advanced stages consists in appearance of neuronal abnormalities, taking the form of mitochondrial swelling and distention of cisterns of the Golgi apparatus. Nerve cell alterations do not belong to the morphological characteristics of hepatogenic encephalopathy. They have not been described in its other experimental models (Mossakowski 1981). Those, found in the presented series of experiments seem to be connected with the direct neurotoxic action of thioacetamide, although its permeability across unchanged cerebral vessels remains unknown. This mechanism seems to be even more probable as neuronal abnormalities occur exclusively in the earliest stage of the pathological process, being absent in the subsequent phase. It has been shown in the experiments performed on organotypic cerebellar cultures, that thioacetamide introduced into the nutrient media, without leading to features of hepatogenic gliopathy, resulted in nonspecific neuronal damage with predominant mitochondrial impairment* (Kraśnicka et al 1983).

WCZESNE ZMIANY MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE W ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ WYWOŁANEJ ZATRUCIEM TIOACETAMIDEM

Streszczenie

Oceniono obraz mikroskopowo-elektronowy mózgow szczerów poddanych dwukrotnemu zatruciu tioacetamidem, podawanym dootrzewnowo w dawce 240 mg/kg masy ciała w odstępach 24-godzinnych. Zwierzęta zabijano aldehydem glutarowym przez przezsercową perfuzję po upływie 24 godzin i 7 dni po drugim podaniu środka toksycznego.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym dominowały nieprawidłowości astrogleju, przy minimalnym nieswoistym zwyrodnieniu neuronów, występującym tylko we wcześniejszej grupie zwierząt i całkowicie niezmiennych pozostałych elementach komórkowych ośrodkowego układu nerwowego. Zmiany astrocytów występowały bądź pod postacią ich aktywizacji, wyrażającej się zwiększeniem objętości cytoplazmy i wzrostem zawartości organelli cytoplazmatycznych, takich jak mitochondria i szorstka siateczka śródplazmatyczna, bądź też jako wykładniki ich zwyrodnienia: zubożenie organelli cytoplazmatycznych i wodnisty wygląd cytoplazmy. Zmiany typu pierwszego dominowały we wczesnym okresie po zatruciu. Po upływie 7 dni przeważały zmiany typu drugiego, bardzo nieliczne u zwierząt grupy wcześniejszej.

Uzyskane wyniki wskazują, iż najwcześniejszą fazę encefalopatii wątrobowej charakteryzuje aktywacja metaboliczna astrocytów, z którą wiązać zapewne należy brak wzrostu poziomu amoniaku w mózgu, mimo jego bardzo znacznego zwiększenia we krwi. W dalszej fazie procesu ewoluują one w kierunku zwyrodnienia astrocytów, stanowiącego charakterystyczny element obrazu neuropatologicznego zaawansowanej encefalopatii wątrobowej.

РАННИЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ВЫЗВАННОЙ ОТРАВЛЕНИЕМ ТИОАЦЕТАМИДОМ

Резюме

Авторы оценили электронно-микроскопную картину головных мозгов крыс подверженных двукратному отравлению тиоацетамидом вводимым внутрибрюшинно в дозе 240 мг/кг массы тела в суточных промежутках. Животные были умерщвлены глутаровым альдегидом при помощи чрезсердечной перфузии после 24 часов и на 7 дню после второго введения токсического средства.

В электронно-микроскопной картине преобладали изменения астроглии при минимальной неспецифической дегенерации нейронов выступающих только в более ранней группе животных и при полностью неизмененных остальных клеточных элементах центральной нервной системы. Изменения астроцитов выступали либо в форме их активизации выражающейся в увеличении объема цитоплазмы и в росте содержания цитоплазматических оргanelл таких как митохондрии и шероховатая внутриплазматическая сеточка либо в форме показателей их дегенерации: обеднение в цитоплазматических оргanelлах и водянистый вид цитоплазмы. Изменения первого типа преобладали в раннем периоде после отравления. По истечении 7 дней преобладали изменения второго типа очень немногочисленные у животных более ранней группы.

Полученные результаты указывают на то что самую раннюю фазу печеночной энцефалопатии характеризует метаболическая активация астроцитов с которой вероятно следует связывать отсутствие роста уровня аммиака в головном мозгу несмотря на его очень значительное увеличение в крови. В дальней фазе процесса они эволюционируют к дегенерации астроцитов составляющей характерный элемент невропатологической картины прогрессирующей печеночной энцефалопатии.

REFERENCES

1. Albrecht J., Hilgier W.: Brain carbonic anhydrase activity in rats in experimental hepatogenic encephalopathy *Neuroscience Letters*, 1984, 45, 7—10.
2. Foncin J. F., Nicolaidis S.: Encephalopathie porto-cave: contribution a la pathologie ultrastructurale de la glie chez l'homme. *Rev. Neurol.*, 1970, 123, 81—87.
3. Hilgier W.: Encefalopatia wątrobowa wywołana podawaniem tioacetamidu. III. Zawartość amoniaku i substratów jego metabolizmu w mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 511—518.
4. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
5. Kraśnicka Z., Albrecht J., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. II. Cytochemical and ultrastructural studies on astrocytes *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 495—510.

6. Laursen H., Diemer N. H.: Morphometric studies of rat glial cell ultrastructure after urease-induced hyperammonaemia. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1979, 5, 345—362.
7. Martinez A.: Electron microscopy in human hepatic encephalopathy. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1968, 11, 82—86.
8. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
9. Mossakowski M. J.: Experimental modelling of hepatogenic encephalopathies. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 261—276.
10. Mossakowski M. J., Borowicz J. W., Hilgier W.: Electron microscopy of hepatogenic encephalopathy in rats induced by tioacetamide intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 185—195.
11. Norenberg M. D.: A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Lab. Invest.*, 1977, 36, 618—627.
12. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. [In:] *Advances in cellular neurobiology*. Eds: S. Fedoroff, L. Hertz. Academic Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco 1981, 2, 303—352.
13. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 422—435.
14. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—384.
15. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia: the concept of glial syndromes. *Proc. VI Intern. Congress Neuropath. Masson, Paris 1970*, 392—403.
16. Zamora A. J., Cavanagh J. B., Kyu M. H.: Ultrastructural responses of the astrocytes to portocaval anastomoses in the rat. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 18, 25—45.

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

HALINA KROH

MULTIFOCAL NEOPLASMS OF THE NERVOUS SYSTEM INDUCED WITH ETHYLNITROSOUREA IN WISTAR RATS

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

Multiple neoplasms of the nervous tissue produced in rats with ethylnitrosourea (ENU) have been observed in nearly all experimental animal series. Besides macro- and microtumors also the early neoplastic proliferations (ENP) are included into the groups of neoplastic foci: all of them are considered consecutive stages of tumor development (Koestner et al. 1971). The coexistent neoplastic foci in various locations of the central and peripheral nervous system prompt us to compare their developmental stage and histology with the aim to find some relationship at the same or at the different sites of the nervous system.

MATERIAL AND METHOD

The investigated tissues originated from 20 non-inbred Wistar rats (12 females, 8 males) selected from an experimental series of 38 offspring rats with singular neoplasms of the nervous system, the mothers of which had been i.v. injected with ENU solution 80 mg/kg b.wt. on the 15th day of pregnancy. ENU was freshly prepared by solution in 0.9 NaCl adjusted with 1% NaH₂PO₄ to pH 4.2—4.4. Dead or decapitated animals were subjected to complete necropsy. Four frontal slices of the brain, slices of the altered spinal cord and of other organs were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. The tissue sections were stained with HE and additionally according to the Klüver-Barrera, Gridley and Cajal method. Some paraffin sections were treated for visualization of glial fibrillary acid protein (GFAP) and S 100 protein according to Avidin-Biotin-Complex method (Hsu et al. 1981).

RESULTS

The material was divided into 3 groups depending on the tumors localization (Tables 1—3).

Group A consisted of multiple neoplastic foci located exclusively in the brain (4 animals). All rats were decapitated. Altogether 7 macro-, 8 microtumors and 3 ENP were microscopically observed. Most commonly affected area was the subcortical white matter, next the periventricular area (4x) and hippocampal gyrus (4x). Foci in the upper layers of the cortex were observed 4 times (Fig. 1). Oligodendrogliomas, particularly isomorphic ones, were most frequent among macro- and microtumors whereas the ratio of isomorphic to anaplastic forms was 9:2. Two tumors were classified as anaplastic gliomas, another two as mixed astrocytomas — oligodendrogliomas differing by the degree of anaplasia.

The separate foci numbered from two in one hemisphere to six independent foci of various size in both hemispheres. In all cases at least one focus was isomorphic oligodendroglioma. A case presenting many different histological neoplastic foci revealed an anaplastic glioma in the centrum semiovale (Fig. 2a) associated with isomorphic oligodendroglioma infiltration in the subcortical white matter and pyriform cortex of the same hemisphere (Fig. 2b) and two neoplastic foci in the contralateral one: oligodendroglioma of caudatum and mixed glioma of the I—III layer of the entorhinal cortex adjacent to the meningeal infiltration (Fig. 2c).

Another case exhibited unilaterally two oligodendrogliomas of corpus callosum and dorsal parts of hippocampal gyri (Fig. 3 a) and a periventricular anaplastic glioma (Fig. 3b), whereas basal ganglia of the contralateral hemisphere were affected by a mixed anaplastic glioma, partly with a multitude of thin-walled sinusoid angiomatous vessels (Fig. 3c), and partly with mesodermal proliferation (Fig. 3d). Besides, a well delimited isomorphic oligodendroglioma was found.

In group A coexistent tumors of other organs were: sarcoma of the jaw, a mammary tumor and an abdominal one; the size of the latter was $7 \times 7 \times 7$ cm. It was encapsulated and connected with destroyed sacral bone. It was diagnosed as anaplastic neurinoma with dispersed ganglion cells.

Group B comprised multiple neoplasms of the brain and spinal cord in 9 animals. All animals of this group, as in the previous one were decapitated. Spinal neoplasms varied in size from ENP to tumors involving all the length of the spinal cord, frequently as a "Stift Gliom", without preferential site in the particular segment of the cord. Histologically the tumors were either "pure" oligodendrogliomas which displayed various degrees of anaplasia, or in some parts exhibited features of mixed glioma or were totally anaplastic gliomas (Figs 4a, 4b). Macrotumors (11 foci) and microtumors (8) were the most common cerebral foci present in this animal group (Table 2). Early neoplastic proliferations were noticed 5 times (Fig. 5). Independently of the type and size

Table 1. Type and localization of cerebral neoplastic foci in rats of group A
Tabela 1. Rodzaj i lokalizacja ognisk nowotworowych w mózgach szczurów grupy A

Case number Numer przypadku	ENP	Microtumors Mikroguzy	Macrotumors Makroguzy
1.	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa	<i>Oligodendroglioma anapl.</i> periventricular + hippocampus przykomorowo + z. hipokampa
2.	—	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> I-IV cortical layers I-IV warstwa kory <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> periventricular + caudatum przykomorowo + j. ogoniaste <i>Glioma anapl.</i> white matter istota biała
3.	I cortical layer I warstwa kory corpus callosum spoidło wielkie cortex kora	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> I-III cortical layer I-III warstwa kory <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> periventricular + caudatum przykomorowo + j. ogoniaste	—
4.	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus + corpus callosum z. hipokampa + spoidło wielkie <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> corpus callosum spoidło wielkie	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma anapl.</i> caudatum j. ogoniaste <i>Glioma anapl.</i> periventricular przykomorowo <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa <i>Oligodendroglioma anapl.</i> corpus geniculatum laterale ciało kolankowate boczne

of the neoplasms, their localization was mostly periventricular, then in the dorsal part of the hippocampal gyrus and in subcortical white matter. The majority of macro- and microtumors was made up of oligodendrogliomas (13) among which there were also anaplastic ones (4). Mixed astrocytoma-oligodendrogliomas (5) included one anaplastic

Table 2. Type and localization of cerebral and spinal neoplastic foci in rats of group B
 Tabela 2. Rodzaj i lokalizacja ognisk nowotworowych w mózgach i rdzeniach szczurów grupy B

Case number Numer przypadku	Cerebral ENP ENP mózgu	Cerebral microtumors Mikroguzy mózgu	Cerebral macrotumors Makroguzy mózgu	Spinal tumors Guzy rdzenia
1.	—	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> periventricular przykomorowo <i>Glioma</i> periventricular przykomorowo	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa	ENP lumbar odc. lędźwiowy
2.	hippocampus z. hipokampa	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma anapl.</i> corpus geniculatum lat. ciało kolankowate boczne	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> cervical-thoracic odc. szyjno-piersiowy
3.	caudatum j. ogoniaste	—	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> periventricular przykomorowo	<i>Oligodendroglioma</i> cervical odc. szyjny
4.	—	—	<i>Oligodendroglioma anapl.</i> hemisphere półkula <i>Oligodendroglioma anapl.</i> periventricular przykomorowo	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> thoracic-lumbar odc. piersiowo-lędźwiowy
5.	—	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa	<i>Oligodendroglioma polymorph.</i> lumbar odc. lędźwiowy

			<i>Oligodendroglioma polymorph.</i> periventricular przykomorowo	
6.	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa	—	<i>Glioma anapl.</i> cervical-lumbar odc. szyjno-piersiowy
7.	—	—	<i>Oligodendroglioma anapl.</i> lateral ventricles + fissura longit. komory boczne + szczelina podł.	<i>Oligodendroglioma anapl.</i> thoracic-lumbar odc. szyjno-łędźwiowy
8.	area preoptica pole przedwzro- kowe	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> caudatum j. ogoniaste <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hypothalamus podwzgórze	—	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> medulla oblongata rdzeń przedłużony
9.	subependymal podwyściółkowo	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> striatum prążkowie	<i>Astrocytoma-oligodendroglioma</i> cortex kora	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> transitional in glioma anapl. cervical-thoracic odc. szyjno-piersiowy
	cortex kora	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa		

Table 3. Type and localization of cerebral and intracranial neoplastic foci in rats of group C

Tabela 3. Rodzaj i lokalizacja ognisk nowotworowych w mózгах i czaszkach szczurów grupy C

Case number Numer przypadku	Cerebral ENP ENP mózgu	Cerebral microtumors Mikroguzy mózgu	Cerebral macrotumors Makroguzy mózgu	Intracranial tumors Guzy śródczaszkowe
1.	—	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hemisphere półkula	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera
2.	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> n. amygdale j. migdałowate	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hemisphere półkula	Unclassified cranial base, cerebellum podstawa czaszki, mózdzek
3.	subependymal podwyściółkowo	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus + white matter z. hipokampa + istota biała <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> periventricular przykomorowo	— —	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera
4.	commisura ant. spoidło przed.	<i>Oligondroglioma anapl.</i> caudatum j. ogoniaste	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa <i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera
5.	—	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> subcortical white matter istota biała podkorowa <i>Oligodendroglioma anapl.</i> hippocampus z. hipokampa	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera
6.	—	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> caudatum j. ogoniaste	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera
7.	—	<i>Oligodendroglioma isomorph.</i> hippocampus z. hipokampa	<i>Oligodendroglioma polymorph.</i> periventricular + hippocampus przykomorowo + z. hipokampa	<i>Neurinoma anapl.</i> nerve V + Gasser ganglion nerw V + zwój Gassera <i>Neurinoma anapl.</i>

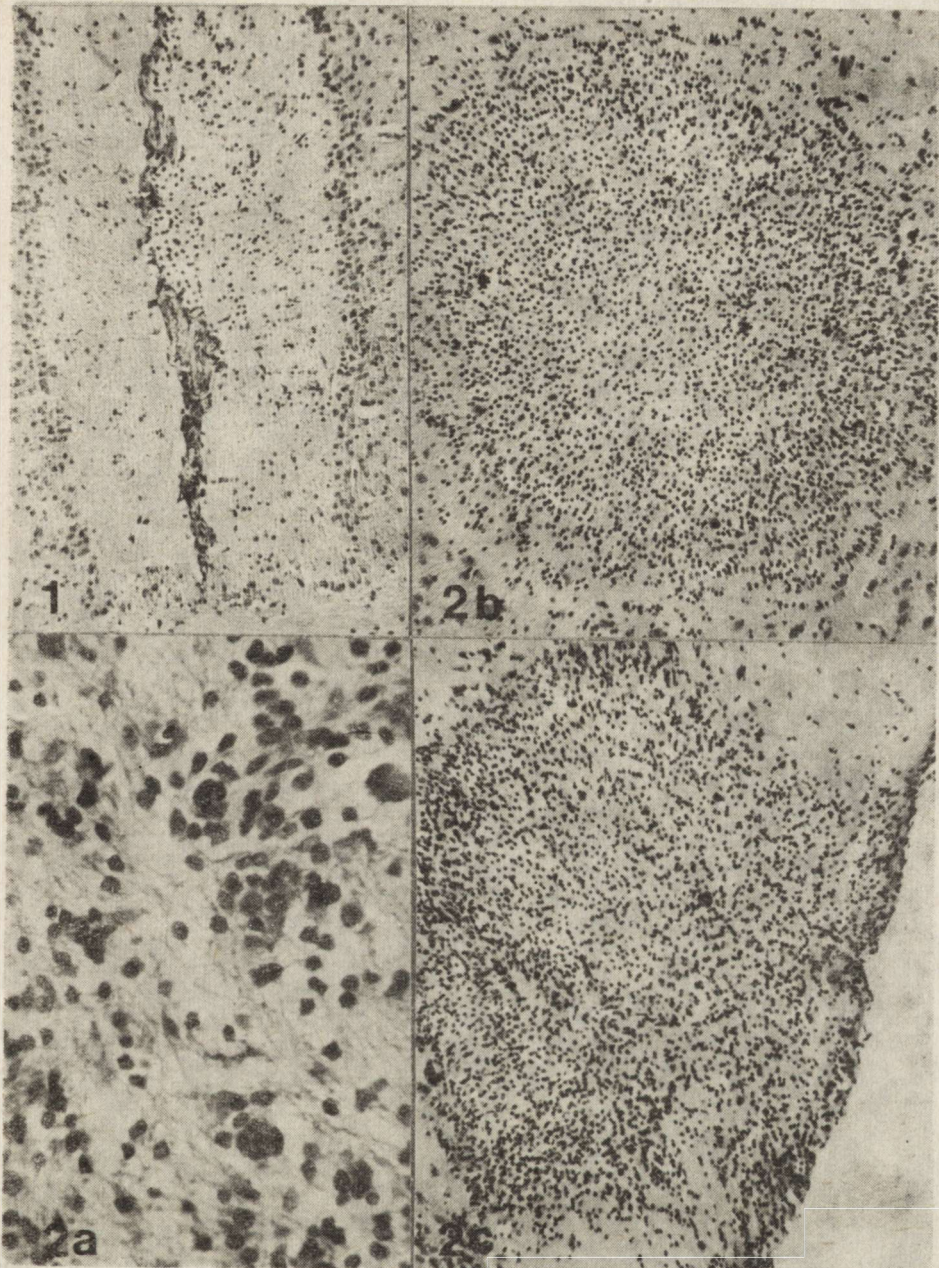


Fig. 1. Group A, case 3. Early neoplastic proliferation in cortical layer I, HE.
Ryc. 1. Grupa A, przyp. 3. Ognisko ENP w I warstwie kory. HE. Pow. 100 ×
 × 100

Fig. 2. Group A, case 2. a) Anaplastic glioma in white matter. HE. × 400;
 b) Isomorphic microoligodendroglioma in subcortical white matter. HE. × 100;
 c) Mixed glial microtumor in cortical layers I—III. HE. × 100

Ryc. 2. Grupa A, przyp. 2. a) Anaplastyczny glejak w istocie białej. HE. Pow.
 400 ×; b) Izomorficzny mikrooligodendrowiak w istocie białej podkorowej. HE.
 Pow. 100 ×; c) Mieszany mikroglejak w I—III warstwie kory. HE. Pow. 100 ×

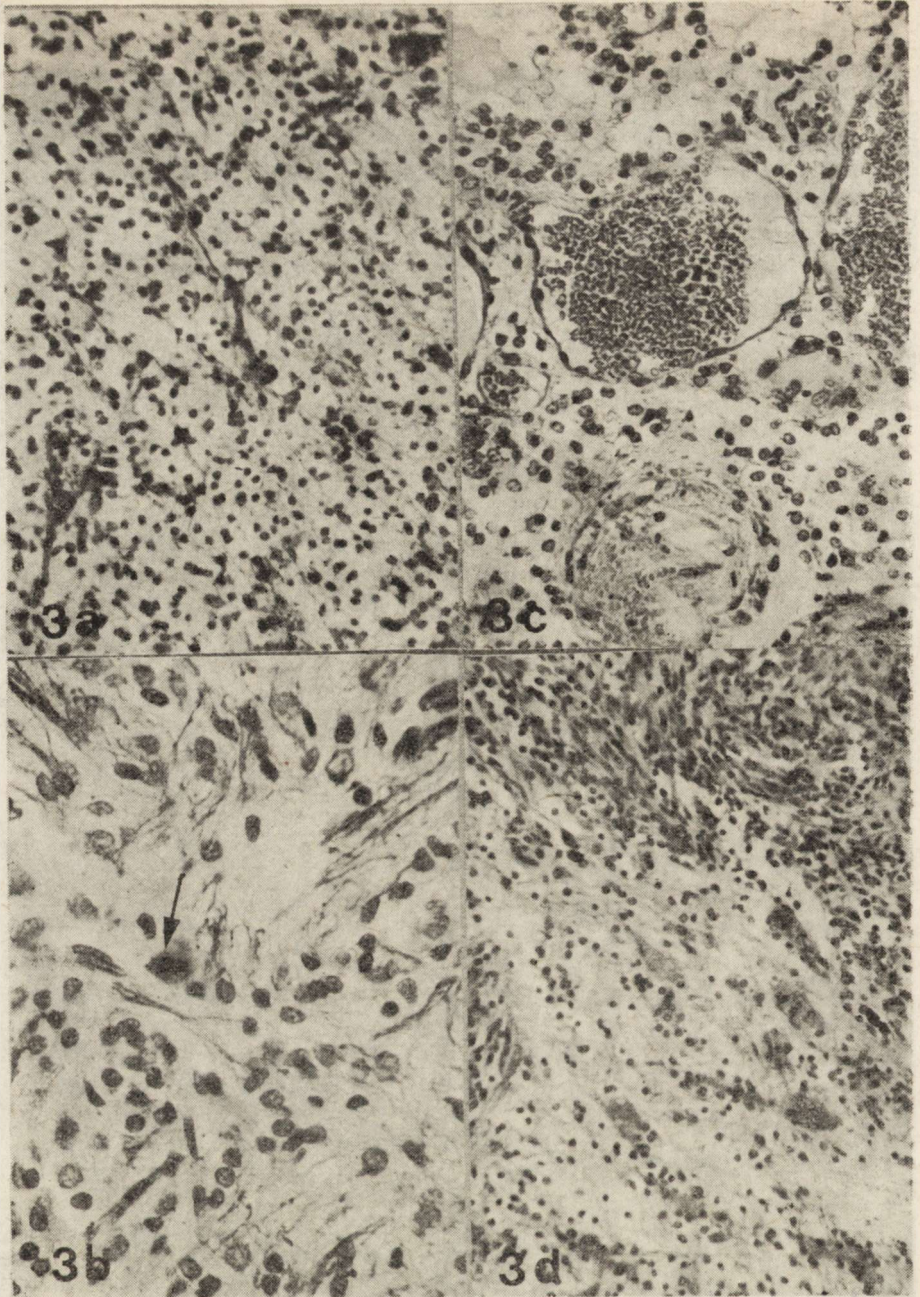


Fig. 3. Group A, case 4. *a)* Isomorphic microoligodendroglioma in hippocampus. HE. $\times 200$; *b)* Anaplastic periventricular glioma, mitosis (arrow) in center. Klüver-Barrera. $\times 400$; *c)* Anaplastic mixed glioma, abnormal vessels in caudatum. HE. $\times 200$; *d)* Other part of the same tumor with proliferating mesodermal cells. HE. $\times 200$

Ryc. 3. Grupa A, przyp. 4. *a)* Izomorficzny mikrokapodrzewiak zakrętu hipokampa. HE. Pow. 200 \times ; *b)* Anaplastyczny glejak przykomorowy, widoczna mitoz (strzałka). Klüver-Barrera. Pow. 400 \times ; *c)* Anaplastyczny glejak mieszany z licznymi nieprawidłowymi naczyniami w jądrze ogoniastym. HE. Pow. 200 \times ; *d)* Inna część tego samego ogniska z obfitym rozplemem komórek mezodermalnych. HE. Pow. 200 \times

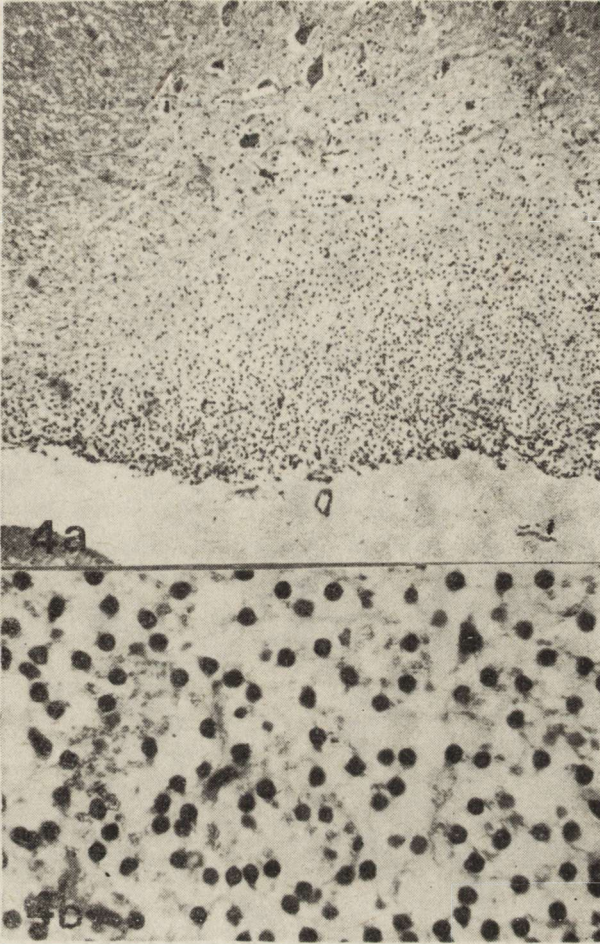


Fig. 4. Group B, case 4. *a)* Isomorphic oligodendroglioma of thoracic-lumbar spinal segments. HE. $\times 60$; *b)* HE. $\times 400$.

Ryc. 4. Grupa B, przyp. 4. *a)* Izomorficzny skąpodrzewiak rdzenia odcinka piersiowo-lędźwiowego. HE. Pow. 60 \times ; *b)* HE. Pow. 400 \times

tumor. Among microtumors there was one glioma. Two animals revealed simultaneous single cerebral and spinal cord growths. In the first case the histological type of the tumors was the same except a higher degree of anaplasia of the oligodendroglial spinal tumor. Neoplastic cells were scattered inside the cerebral ventricles and in the meninges. In the second case the isomorphic oligodendroglioma of the hippocampus was associated with a well-circumscribed mixed anaplastic glioma of the spinal cord (Fig. 6 abc). Other animals of this group presented single spinal cord tumors, but multiple neoplastic involvement of the brain. Separate foci of cerebral oligodendrogliomas developed in two animals, whereas the degree of anaplasia of their spinal cord counterparts differed greatly: in one case anaplastic cerebral tumors were accompanied by

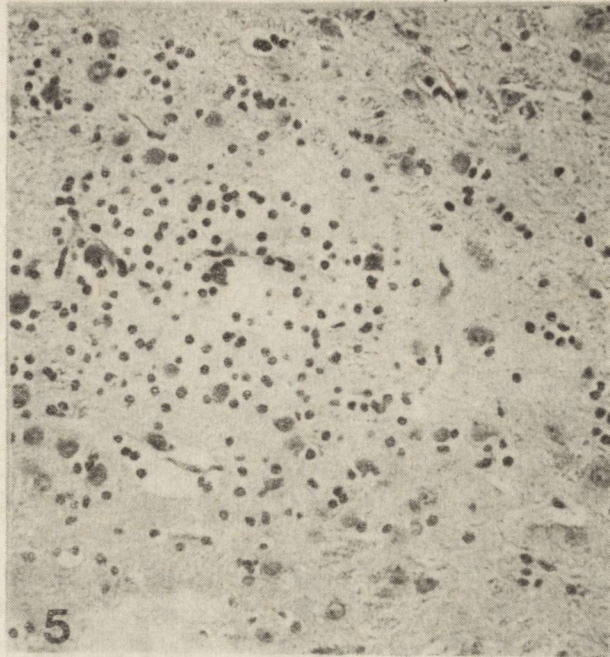


Fig. 5. Group B, case 3. Early neoplastic proliferation in caudatum. HE. $\times 200$

Ryc. 5. Grupa B, przyp. 3. Ognisko ENP w jądrze ogoniastym. HE. Pow. $200 \times$

an isomorphic spinal oligodendroglioma, in the other isomorphic hippocampal oligodendrogliomas and a polymorphic periventricular one co-existed with polymorphic spinal cord oligodendroglioma (Fig. 7 abc). The brains of the remaining rats (5) showed multiple cerebral foci which varied histologically. In each case, beside 1 or 2 oligodendrogliomas there were separate foci of mixed gliomas (astrocytoma-oligodendroglioma). Spinal cord tumors were either oligodendrogliomas (3) of low or high degree of differentiation or mixed gliomas similar to cerebral neoplasms (2). A single ENP in the fasciculus lateralis contacted the meninges.

The GFAP reaction performed in 3 cases was negative in oligodendroglioma cells, while a positive reaction was observed in stellate cells with branching processes scattered through the focus as well as in the narrow zone of surrounding tissue (Fig. 8a). GFAP positive reaction was also visible in cells with scarce processes in the subependymal ENP and microtumors. Short GFAP positive cellular processes were visualised under the adjacent ependymal layer (Fig. 8 bc). The reaction for S 100 protein coincided with the GFAP pattern but its intensity and extent were greater in the reactive astrocytes in the surrounding zone of nervous tissue (Fig. 9 abcd). The pattern of GFAP and S 100 protein in oligodendrogliomas of the brain and spinal cord was identical.



Fig. 6. Group B, case 6. a) Isomorphic microoligodendroglioma in hippocampal gyrus. HE. $\times 400$; b) Tumor of cervico-lumbar segments; involvement of central region except ventral parts of anterior horns. HE. $\times 2.5$; c) Anaplastic glioma of spinal cord. HE. $\times 400$

Ryc. 6. Grupa B, przyp. 6. a) Mikroognisko izomorficznego skąpodrzewiaka w zakręcie hipokampa. HE. Pow. 400 \times ; b) Guz rdzenia odcinka szyjno-lędźwiowego; zaoszczędzone brzuszne części rogów przednich. HE. Pow. 2,5 \times ; c) Anaplastyczny glejak rdzenia. HE. Pow. 400 \times

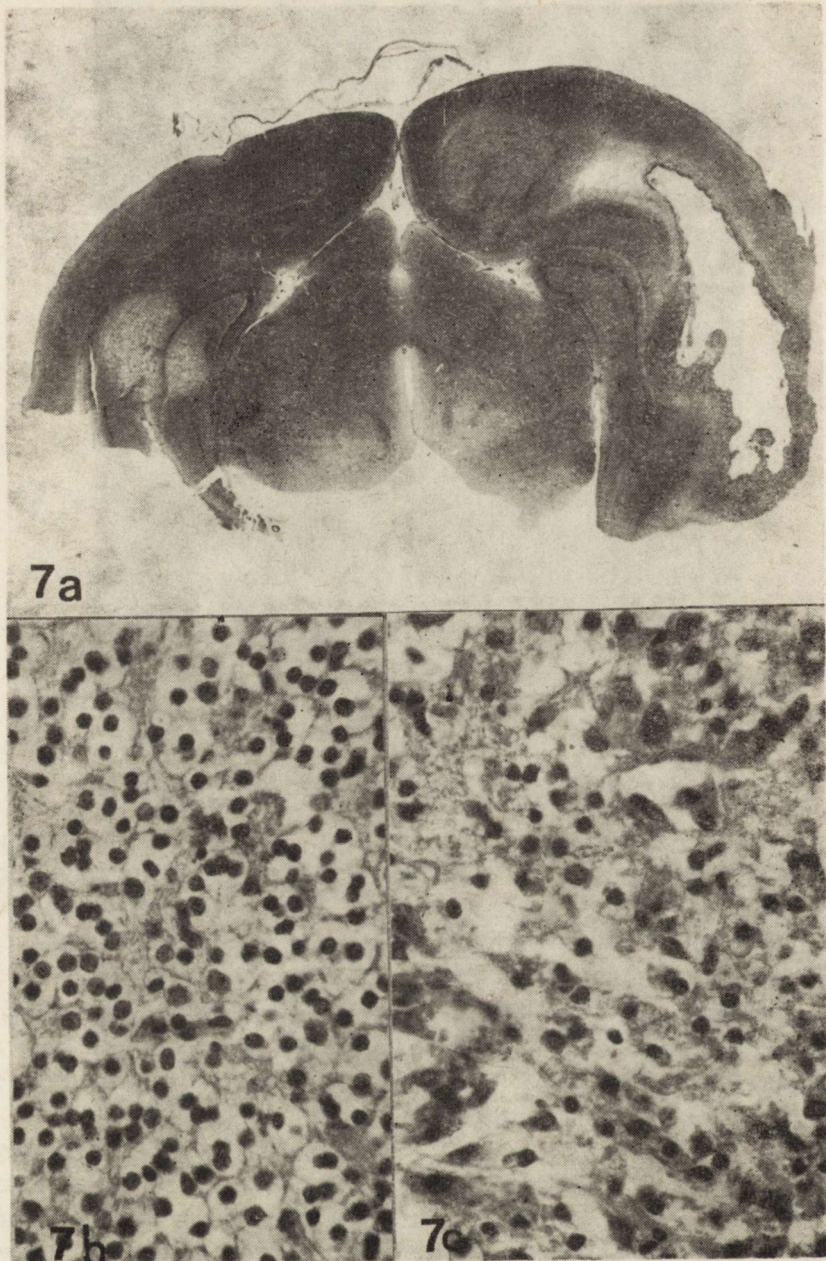


Fig. 7. Group B, case 5. a) Two tumors in hippocampal gyri and one periventricular. HE; b) Isomorphic oligodendroglioma of hippocampus. HE. $\times 400$; c) Polymorphic oligodendroglioma of spinal cord. HE. $\times 400$

Ryc. 7. Grupa B, przyp. 5. a) Dwa ogniska w zakrętach hipokampa i ognisko przykomorowe. HE. Pow. lupowe; b) Izomorficzny skąpodrzewiak zakrętu hipokampa. HE. Pow. 400 \times ; c) Polimorficzny skąpodrzewiak rdzenia. HE. Pow. 400 \times

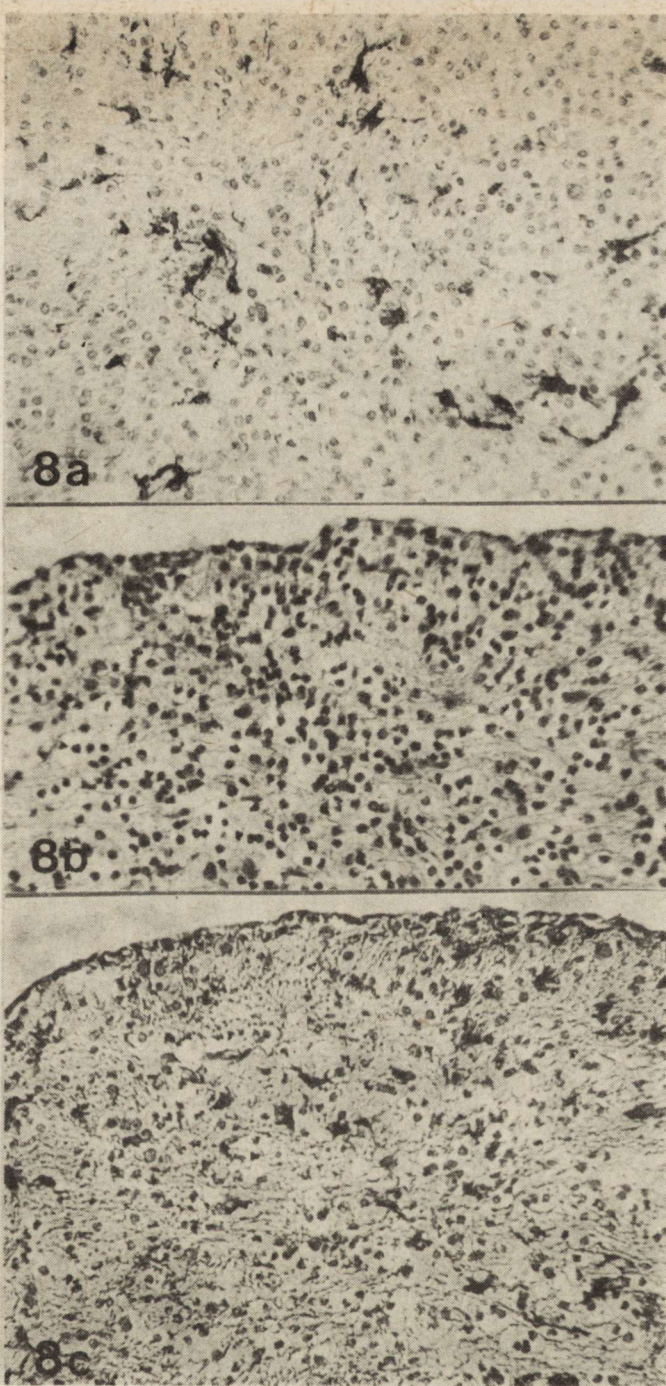


Fig. 8. Group B, case 1. a) GFAP reaction positive only in the stellate cells in isomorphic oligodendroglioma of white matter. $\times 200$; b) Periventricular mixed microglioma. HE. $\times 200$; c) GFAP reaction positive in neoplastic cells with and without processes in mixed periventricular microglioma. $\times 200$

Ryc. 8. Grupa B, przyp. 1. a) Dodatni odczyn GFAP wyłącznie w gwiaździstych komórkach w izomorficznym skąpodrzewiaku istoty białej. Pow. 200 \times ; b) Mieszany mikroglejak przykomorowy. HE. Pow. 200 \times ; c) Dodatni odczyn GFAP w wypustkach i bezwypustkowych komórkach mieszanego glejaka przykomorowego. Pow. 200 \times

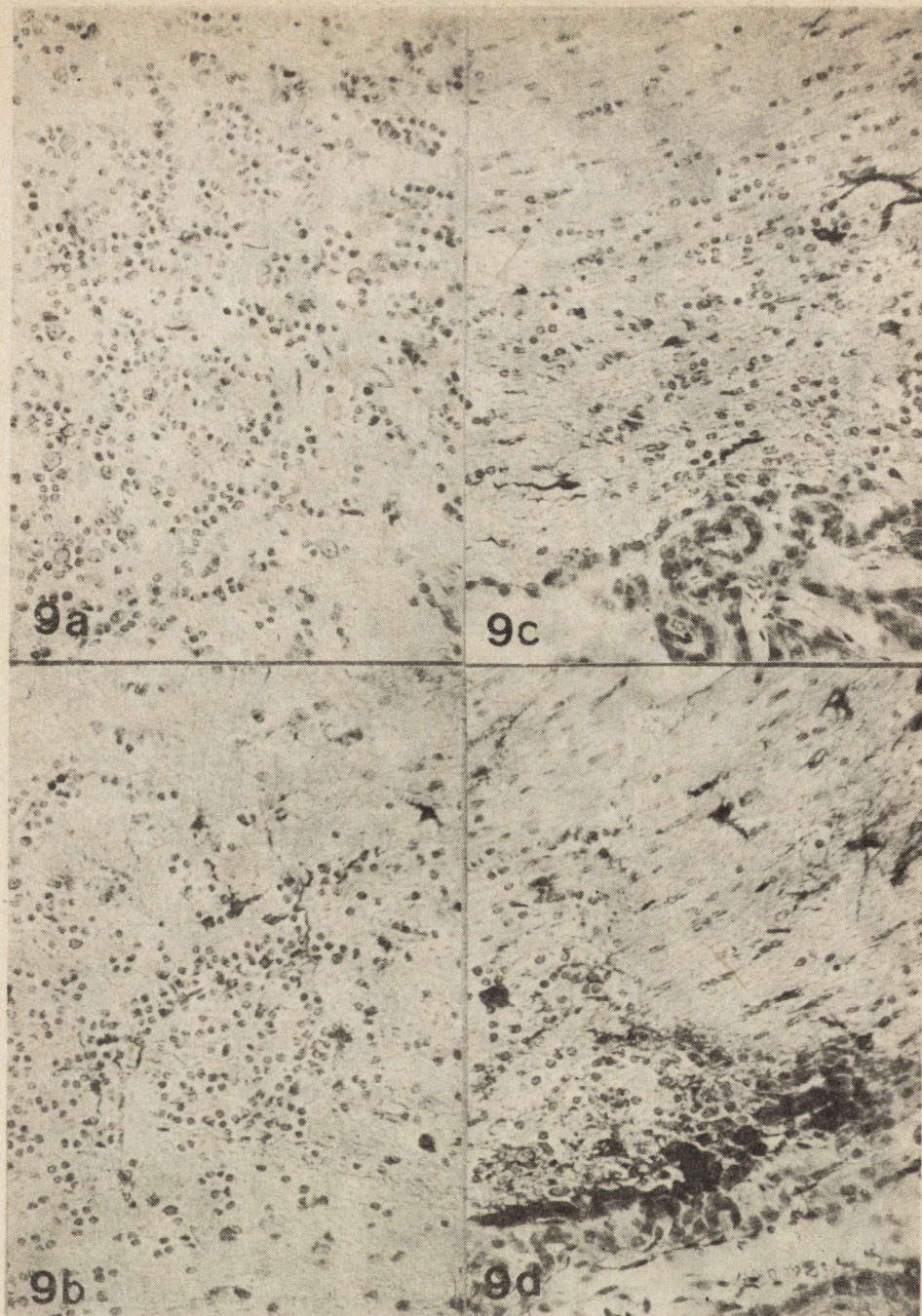


Fig. 9. Group B, case 9. a) Negative GFAP reaction in microoligodendrogloma of striatum. $\times 200$; b) Positive S 100 reaction in astrocytes around microoligodendrogloma of striatum. $\times 200$; c) Moderate GFAP reaction in cells of periventricular ENP. $\times 200$; d) Positive S 100 reaction in astrocytes around periventricular ENP. $\times 200$

Ryc. 9. Grupa B, przyp. 9. a) Ujemny odczyn GFAP w mikroskapodrzewiaku prążkowie. Pow. $200 \times$; b) Dodatni odczyn S 100 w astrocytach wokół mikroogniska skąpodrzewiaka w prążkowie. Pow. $200 \times$; c) Słabo dodatni odczyn GFAP w komórkach przykomorowego ENP. Pow. $200 \times$; d) Dodatni odczyn S 100 w astrocytach wokół przykomorowego ENP. Pow. $200 \times$

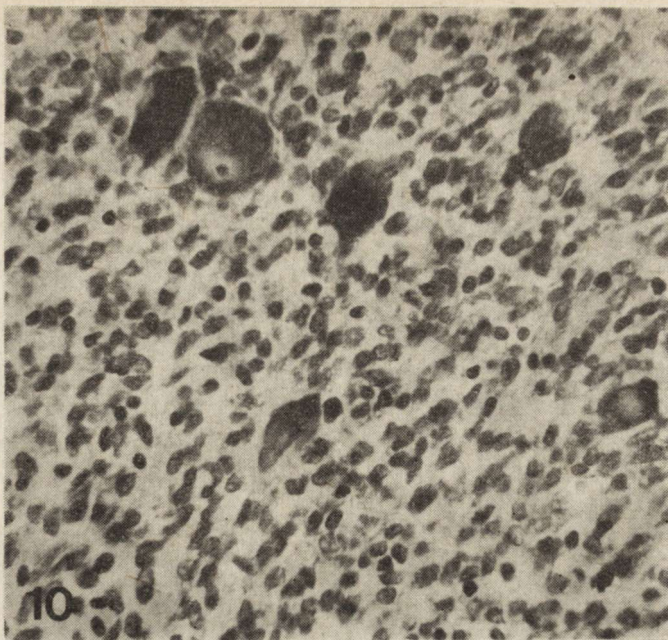


Fig. 10. Group B, case 8. Anaplastic lumbar neurinoma from abdominal cavity. Focus of well preserved ganglion cells. HE. $\times 400$

Ryc. 10. Grupa B, przyp. 8. Anaplastyczny nerwiak jamy brzusznej wychodzący z okolicy lędźwiowej. Grupa dobrze zachowanych komórek zwojowych. HE. Pow. $400 \times$

al. The reaction for GFAP in anaplastic gliomas of the spinal cord was positive in the groups and foci of cells and also in single dispersed cells with poorly developed processes as well as in peripheral reactive astrocytes. The localization of the reaction for S 100 protein in the tumor cells and reactive cells was similar but its intensity less pronounced.

The coincident neoplasms of other organs in the animal group B were: kidney tumor (not examined) and an abdominal cystic tumor, which filled the whole abdomen. It had a granular surface, and was attached to the lumbar vertebral region. It was diagnosed as an anaplastic neurinoma with scattered ganglion cells (Fig. 10).

Group C consisted of 7 rats with cerebral neoplasms associated with intracranial tumors. The majority of rats died, their average survival time was 261 days. Altogether there were 6 macro-, 5 microtumors and 2 ENP in the cerebral hemispheres. All intracranial tumors (13) were oligodendrogliomas, mainly isomorphic (10) localized in one or both hemispheres (Fig. 11 abc). Some tumors were multifocal, unilateral. Prevailing were hippocampal micro- and macrotumors also symmetrical, which spread towards the basal ganglia or cerebral cortex. Isomorphic oligodendrogliomas (10) were observed as both micro- and macrotumors. In the large foci there often appeared sinusoidal vessels or mesodermal

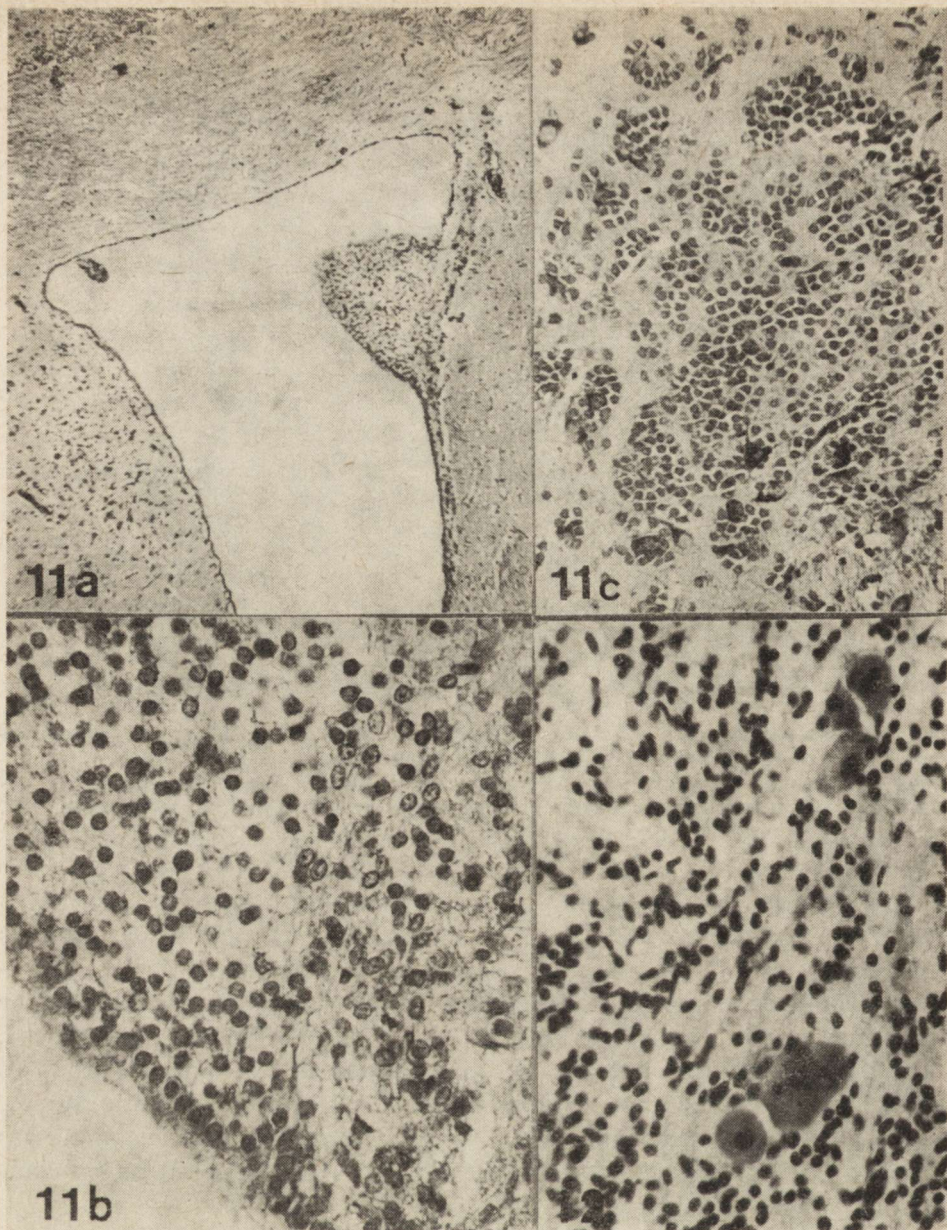


Fig. 11. Group C, case 3. a) Periventricular ENP and subependymal microtumor. HE. $\times 60$; b) Subependymal microoligodendroglioma. HE. $\times 400$; c) Isomorphic microoligodendroglioma in white matter and ventral hippocampus. Some neurons still preserved. Klüver-Barrera. $\times 200$

Ryc. 11. Grupa C, przyp. 3. a) Ognisko ENP i podwyściółkowy mikroguz w ścianach komory bocznej. HE. Pow. $60 \times$; b) Podwyściółkowy mikroskapodrzewiak. HE. Pow. $400 \times$; c) Izomorficzny mikroskapodrzewiak w istocie białej i brzusznej części zakrętu hipokampa. Widoczne komórki nerwowe zakrętu. Klüver-Barrera. Pow. $200 \times$

Fig. 12. Group C, case 6. Anaplastic neurinoma of trigeminal nerve with involvement of ganglion cells. Klüver-Barrera. $\times 400$

Ryc. 12. Grupa C, przyp. 6. Anaplastyczny nerwiak n. trójdzielnego z widocznymi komórkami zwojowymi. Klüver-Barrera. Pow. $400 \times$

proliferation. Vascularization of small oligodendroglial foci was as a rule poor. In six cases intracranial neurinomas were encountered including a bilateral one. They always contained nests of ganglion cells, their localization was that of the trigeminal ganglion. All the tumors were anaplastic densely cellular with hyperchromatic nuclei and with vast necrotic foci (Fig. 12). In the last case the neoplasm remained unclassified; it overgrew olfactory bulbs, infiltrated the meninges and molecular layer of cerebellar cortex.

Two rats presented neoplasms of other organs: sarcoma of the vagina and fibrosarcoma of the auricular area.

DISCUSSION

It has been proved on extensive material that in experimental conditions identical to ours, but in other strains of rats, multiple neoplasms of the nervous tissue are frequently observed (Ivankovic, Druckrey 1968; Druckrey et al. 1970 b) sometimes even in 84% of rats bearing tumors of the central nervous system (Jänisch et al. 1972). Wechsler et al. (1969) express the opinion that the multifocal growth is more common than the singular one. In the presented material the plurality of tumors is likely a consequence of a high dose of the injected carcinogen. The simple relationship between the dose and number of tumors was established during perinatal investigations (Druckrey et al. 1970 a; Swenberg et al. 1972). The strain susceptibility of Wistar rats toward ENU is poorly known since data cover mainly the BD IX strain (Druckrey et al. 1970 b), Sprague-Dawley and Fisher rats (Koestner et al. 1971; Swenberg et al. 1972), less often hooded rats (Jänisch et al. 1972) and WAG (Bosch 1977). Schreiber et al. (1974) stated that it is easier to induce in the Wistar rat tumors of the peripheral than of the central nervous system. Development of multiple tumors is also strictly connected with timing of the ENU action which is most efficient in the last prenatal and first postnatal week of life resulting in a high percent of neoplasms in the group and a multitude of tumors in the individual animal (Druckrey et al. 1970 a; Bosch 1977). According to my own evaluation (Table 4) the subcortical white matter, hippocampal gyrus and subependymal periventricular zone around the lateral ventricles are the privileged locations of micro- and macrotumors. Localization of ENP varied. Our results concerning the localization confirm the data of other authors, though some of their investigations demonstrate another order of the three privileged areas. In etiopathological arguments particular significance is ascribed to periventricular ENP in the subependymal layer which either initiates polymorphic periventricular gliomas or their cells migrate to the subcortical white matter (Lantos 1972, 1977; Lantos, Cox 1976; Schiffer et al. 1978; Lantos, Pil-

Table 4. Number of macro- and microtumors in particular brain structures
 Tabela 4. Liczba makro- i miokrguzów w poszczególnych strukturach mózgu

Localization Lokalizacja	Macrotumors Makroguzy	Microtumors Mikroguzy	Total Razem
Number of tumors Liczba guzów	26	21	47
White matter Istota biała	5	4	9
Hippocampus Z. hipokampa	5	5	10
Periventricular Przykomorowo	4	3	7
Periventricular + hippocampus Przykomorowo + z. hipokampa	2	—	2
Periventricular + caudatum Przykomorowo + j. ogoniaste	1	1	2
Caudatum j. ogoniaste	2	2	4
Cortex Kora	1	2	3
Others Inne	6	4	10

kington 1979; Pilkington, Lantos 1979). The susceptibility of the hippocampal gyrus to neoplastic proliferation was also linked with the different chemical properties of the area (Ivankovic, Druckrey 1968). Gliomas of the spinal cord included in group B do not show any preferential site though other authors regard the lower cervical and upper lumbar segments as the most frequent abode of spinal tumors (Kleihues et al. 1976).

Localization of the tumors from cranial nerves associated with brain tumors of group C endorses the earlier opinion that tumors of the trigeminal nerve and its ganglion are the commonest among cranial nerve tumors induced with ENU (Ivankovic et al. 1966; Wechsler et al. 1969; Koestner et al. 1971; Kleihues et al. 1976).

The majority of cerebral neoplastic foci consist of oligodendrogliomas, both well and poorly differentiated, depending in part on the size of the tumor (Tables 1—3). Microtumors particularly show a direct relationship of size with the type and degree of differentiation as well as tumor localization. Microtumors in the white matter and hippocampal gyrus are isomorphic oligodendrogliomas, periventricular ones are mixed gliomas populated by cells of the astrocytic and oligodendroglial line. In caudatum, striatum and cortex both types of tumors are found. Only one microoligodendroglioma showed anaplastic features. The high degree of differentiation and the isomorphism of oligodendroglioma mi-

crotumors induced with ENU has already been stressed (Zülch, Mennel 1971; Swenberg et al. 1972; Stavrou, Haglid 1973, Bosch 1977; Schiffer et al. 1978).

Other types of microgliomas called here mixed gliomas appear mainly in the periventricular region and, according to Pilkington and Lantos (1979), they are formed of a mixture of cellular components of the subependymal layer, glioblasts and differentiating glial cells with high mitotic index in various proportions, this resulting in marked polymorphism and malignancy. The difference between microtumors of isomorphic oligodendroglioma type and mixed gliomas is confirmed by an additional factor, i.e. the GFAP reaction, negative in the former and positive in the latter, similar to that in human brain tumors (Deck et al. 1978; van der Meulen et al. 1978).

Correlation of localization with histology in macrotumors is more difficult to establish. Results demonstrated in Tables 1, 2, 3 concerning in particular isomorphic oligodendrogliomas, indicate their prevalence in the subcortical white matter and hippocampus, also symmetrically, like in microtumors of the same nature. Anaplastic macrooligodendrogliomas are much more frequent than those in the form of microtumors. The view represented by Koestner et al. (1971) that during progression of the growth the tumors become anaplastic seems only partly justified because there exist also large oligodendrogliomas without anaplastic features which affect hippocampal regions and large areas of the brain. Mixed astrocytoma-oligodendrogliomas are present in the same number and localization as their analogical microtumors, while anaplastic tumors are more often encountered.

The limited histological variety of induced tumors, both cerebral and spinal, and particularly the lack of ependymomas which are 10 percent in Zülch and Mennel's statistics (1971), should be stressed, anaplastic ependymomas being the most common spinal growths (Koestner et al. 1971). The question arises whether the uniform histological pattern of tumors in the spinal and cerebral tissue (Table 2) is not due to metastatic spread. The possibility of a metastatic process is demonstrated by case 3, group A in which minute neoplastic foci were found in atypical sites in the upper cortical layers adjacent to meninges infiltrated by neoplastic cells like those observed by Jänisch and Schreiber (1969). A separate problem is the coexistence of neoplastic foci in various stages of proliferation. Koestner et al. (1971) suggested that this phenomenon is due either to a different onset of neoplastic process or to the various growth rates of separate foci. Our material favors such conclusions but we may also suspect other mechanism which allow the onset of cellular proliferation of cells of the same type, but at different times, exemplified by the concomitance of micro- and macro-oligodendrogliomas. The monotony of the histological pattern in all observed

tumors confirms once more that, in the given experimental conditions, only the target cells undergo proliferation leading to a similar type of cerebral and spinal growths. Of special interest is in this context, group C, in which six intracranial tumors are anaplastic neurinomas, while all the cerebral tumors are oligodendrogliomas. The almost exclusive development of anaplastic neurinomas from the trigeminal nerve and its ganglion and their coexistence with cerebral and spinal tumors due to ENU is well known (Wechsler et al. 1969; Koestner et al. 1971) but their joint appearance with oligodendrogliomas only, has not been observed as yet and thus might be of etiopathological value.

The author wishes to express her gratitude to dr R. Maunoury, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Paris, for advice and help in immunohistochemical investigations.

MNOGIE NOWOTWORY TKANKI NERWOWEJ SZCZURA WYWOŁANE ETYLONITROZOMOCZNIKIEM

Streszczenie

Ocena morfologiczna układu nerwowego wykazała w 20 przypadkach, wybranych z większej serii szczurów, mnogie nowotwory tkanki nerwowej u potomstwa samic po jednorazowym wstrzyknięciu dożylnym etylnitrozomocznika (80 mg/kg wagi ciała) w 15 dniu ciąży. Badania miały za zadanie ustalenie obrazu histologicznego i stopnia zróżnicowania poszczególnych ognisk nowotworowych. Nowotwory występowały wielogniskowo tylko w mózgu, w mózgu i rdzeniu kręgowym oraz w mózgu i nn. trójdzielnych. Ogniska te miały postać wczesnej proliferacji nowotworowej (ENP) oraz mikro- i makroguzów. W ośrodkowym układzie nerwowym obserwowano tylko dwa typy nowotworów: skąpodrzewiaki i gwiazdziako-skąpodrzewiaki; pierwsze przeważały liczebnie. Zjawisko anaplazji występowało głównie w makroguzach. Typ nowotworu w znacznej mierze zależał od lokalizacji. Zależność ta uwidoczniła się przede wszystkim w makroguzach. Skąpodrzewiaki były najliczniejsze w podkorowej istocie białej, natomiast gwiazdziako-skąpodrzewiaki występowały głównie przykomorowo. Guzy nerwów czaszkowych były wyłącznie anaplastycznymi nerwiakami i towarzyszyły jedynie skąpodrzewiakom mózgu. Nie stwierdzono zależności obrazu histologicznego ani stopnia zróżnicowania między guzami mózgu i rdzenia, chociaż większość tych ostatnich stanowiły również skąpodrzewiaki.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫСЫ ВЫЗВАННЫЕ ЭТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ

Резюме

Морфологическая оценка нервной системы обнаружила в 20 случаях выбранных из большей серии крыс множественные опухоли нервной ткани у потомства самок после разовой внутривенной инъекции этилнитрозомочевины (80 мг/кг веса тела) на 15 дню беременности. Целью исследований было определение гистологической картины и степени дифференциации отдельных опухолевых очагов. Опухоли выступали многоочагово только в головном мозгу

в головном мозгу и в спинном мозгу а также в головном мозгу и в тройничных нервах. Эти очаги имели форму ранней опухолевой пролиферации (ENP) а также микро- и макроопухолей. В центральной нервной системе автор наблюдала только два типа опухолей: олигодендроглиомы и астроцитомо-олигодендроглиомы: первые имели численный перевес. Явление анаплазии выступало главным образом в макроопухолях. Тип опухоли в значительной мере зависел от локализации. Эта зависимость обнаруживалась прежде всего в микроопухолях. Олигодендроглиомы были наиболее многочисленны в подкорковом белом веществе зато астроцитомо-олигодендроглиомы выступали главным образом прижелудочково. Опухоли черепных нервов были исключительно анапластическими невромами и сопутствовали только хлигодендроглиомам головного мозга. Не констатировано зависимости гистологической картины ни степени дифференциации между опухолями головного мозга и спинного мозга хотя большинство этих последних составляли также олигодендроглиомы.

REFERENCES

1. Bosch D. A.: Short and long term effects of methyl- and ethylnitrosourea (MNU and ENU) on the developing nervous system of the rat. I. Long term effects: the induction of (multiple) gliomas. *Acta Neurol. Scand.*, 1977, 55, 85—105.
2. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbee J., Woodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1978, 42, 183—190.
3. Druckrey H., Landschütz Ch., Ivankovic S.: Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II. Äthylnitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. *Z. Krebsforsch.*, 1970 a, 73, 371—386.
4. Druckrey H., Schagen B., Ivankovic S.: Erzeugung neurogener Malignoma durch einmalige Gabe von Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborene und junge BD-IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 1970 b, 74, 141—161.
5. Hsu S. M., Raine L., Fanger H.: The use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, 29, 577—580.
6. Ivankovic S., Druckrey H.: Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH) an BD-IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 1968, 71, 320—360.
7. Ivankovic S., Druckrey H., Preussmann R.: Erzeugung neurogener Tumoren bei den Nachkommen nach einmaliger Injektion von Äthylnitrosoharnstoff an schwangere Ratten. *Die Naturwsh.*, 1966, 53, 410.
8. Jänisch W., Schreiber D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems. VEB. G. Fischer Verlag, Jena 1969.
9. Jänisch W., Schreiber D., Warzok R., Schneider J.: Die transplazentare Induktion von Geschwülsten des Nervensystems. Vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit von Methyl- und Äthylnitrosoharnstoff. *Geschwulstforsch.*, 1972, 39, 99—106.
10. Kleihues P., Lantos P. L., Magee P. N.: Chemical carcinogenesis in the nervous system. [In:] *International Review of Experimental Pathology*. Ed. M. A. Epstein. Vol. 15, G. W. Richter, Academic Press, New York—San Francisco—London 1976, 153—232.
11. Koestner A., Swenberg J. A., Wechsler W.: Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system of Sprague-Dawley rats. *Am. J. Path.*, 1971, 63, 37—50.

12. Lantos P. L.: The fine structure of periventricular pleomorphic gliomas induced transplacentally by N-ethyl-N-nitrosourea in BD-IX rats. *J. Neurol. Sci.*, 1972, 17, 443—460.
13. Lantos P. L., Cox D. J.: The origin of experimental brain tumors: A sequential study. *Experientia*, 1976, 32, 1467—1468.
14. Lantos P. L.: The role of the subependymal plate in the origin of gliomas induced by ethylnitrosourea in the rat brain. *Experientia*, 1977, 33, 521—522.
15. Lantos P. L., Pilkington G. J.: The development of experimental brain tumors. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. I. Early lesions. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1979, 45, 167—175.
16. Pilkington G. J., Lantos P. L.: The development of experimental brain tumours. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. II. Microtumours. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1979, 45, 177—185.
17. Schiffer D., Giordana M., Pezotta S., Lechner C., Paoletti P.: Cerebral tumours induced by transplacental ENU: study of the different tumoral stages, particularly of early proliferations. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1978, 41, 27—31.
18. Schreiber D., Jänisch W., Felicetti D.: Das Wirkungsspektrum neurotroper chemischer Kanzerogene. [In:] *Experimentelle Neuroonkologie*. Eds.: D. Schreiber, W. Jänisch, J. A. Barth, VEB G. Fischer Verlag, Leipzig 1974, 22—43.
19. Stavrou D., Haglid K. G.: Morphologische und immunologische Untersuchungen zur Histogenese experimenteller Hirntumoren. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 20, 39—50.
20. Swenberg J. A., Koestner A., Wechsler W., Denlinger R. H.: Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats. *Cancer Res.*, 1972, 32, 2656—2660.
21. Van der Meulen J. D. M., Houthoff H. J., Ebels E. J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1978, 4, 177—190.
22. Wechsler W., Kleihues P., Matsumoto S., Zülch K. J., Ivankovic S., Preussmann R., Druckrey H.: Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 1969, 159, 360—408.
23. Zülch K. J., Mennel H. D.: Die Morphologie der durch alkylierende Substanzen erzeugten Tumoren des Nervensystems. *Zbl. Neurochir.*, 1971, 32, 225—243.

Author's address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, 3, Dworkowa St., 00-784 Warszawa, Poland

HALINA WEINRAUDER

LOKALIZACJA SYNTETAZY GLUTAMINOWEJ W ASTROCYTACH *IN VITRO*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Swoiste markery komórkowe, w tym także astrocytarne, są obecnie powszechnie stosowane do identyfikacji komórek w warunkach hodowli *in vitro* i w badaniach nad rozwojem i różnicowaniem tkanek układu nerwowego. Coraz częściej myśli się także o ich stosowaniu przy charakterystyce astrocytów w stanach patologicznych. Jednym z takich markerów jest syntetaza glutaminowa (ligaza L-glutaminian: amoniak (ADP) — E.C. 6.3.1.2), kluczowy enzym małej puli glutaminianowej, katalizujący amidację glutaminianu do glutaminy.

Martinez-Hernandez i wsp. (1977) zlokalizowali syntetazę glutaminową w komórkach glejowych mózgu dorosłego szczura, a następnie Norenberg i Martinez-Hernandez (1979) wykazali jej występowanie wyłącznie w astrocytach. Wyniki ostatnich badań Hallermayera i Hamprechta (1984) wskazują na znaczną przydatność immunocytochemicznej lokalizacji syntetazy w badaniach nad heterogennością komórek w pierwotnych hodowlach z mózgu. Różnice w występowaniu syntetazy glutaminowej w poszczególnych typach astrogleju (Schousboe, Divac 1979; Petel i wsp. 1983), zróżnicowanie lokalizacji w warunkach *in vivo* i *in vitro*, a także przydatność modelu hodowli tkankowej w badaniach procesów patologicznych uzasadniają przeprowadzenie badań lokalizacji enzymu w warunkach *in vitro*.

Celem niniejszej pracy było określenie swoistości i zastosowanie do odczynu histochemicznego surowicy odpornościowej przeciwko syntetazie glutaminowej, otrzymanej w naszym laboratorium.

MATERIAŁ I METODY

Otrzymywanie surowicy odpornościowej. Króliki albinotyczne, samce, uodporniano wielokrotnie, w tygodniowych odstępach, handlowym preparatem syntetazy glutaminowej z mózgu owcy (Sigma, L-glutamine synthetase type III, 182 units/mg). Króliki otrzy-

mywały podskórne iniekcje 0,1 mg enzymu rozpuszczonego w PBS o pH 7,4, zemulgowanego z równą obojętnością pełnego adjuwantu Freund'a (Difco). Przed rozpoczęciem wstrzykiwania od wszystkich królików pobierano krew w celu skontrolowania surowicy na obecność ewentualnych nieswoistych przeciwciał (próba 0). Po kilkakrotnym podaniu syntetazy, od królików pobierano co tydzień krew z żyły usznej brzeżnej; surowice przechowywano w -20°C .

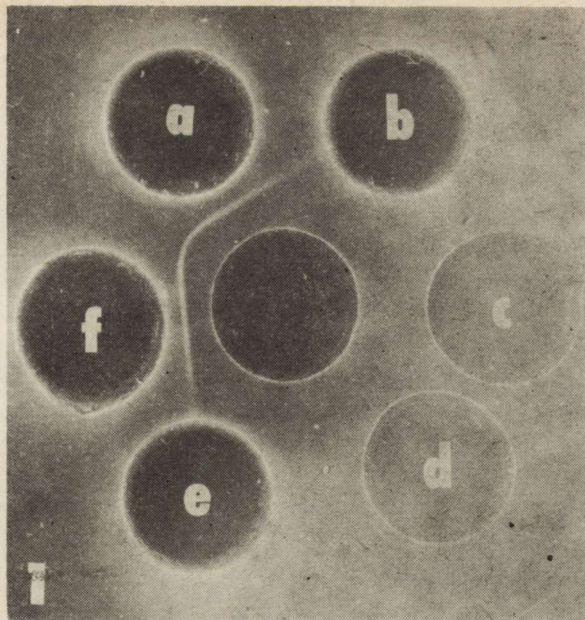
Immunodyfuzja (ID). Odczyn podwójnej immunodyfuzji wykonywano według rutynowej metody Ouchterlony'ego, używając 1% agar (Special Agar Noble, Difco), w buforze fosforanowym, pH 7,2. Płytki agarowe z pasmami precypitacyjnymi płukano w kilku zmianach PBS i w wodzie destylowanej, suszono i barwiono w czerni amidowej 10B. Syntetazę glutaminową rozpuszczano w PBS i stosowano w stężeniach 20, 10, 5, 2,5 i 1,25 mg/ml. Wyciąg z mózgu szczura przygotowany na drodze wirowania przy 40 000 g przez 1 godzinę pełnego homogenatu zawierającego 1% Triton X-100 (Sigma).

Hodowle. Hodowle organotypowe z mózdzku 1-dniowych noworodków szczurzych zakładano i prowadzono według metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Szkiełka z hodowlami płukano trzykrotnie w ciepłym PBS (37°C), suszono, utrwalano w zimnym (-20°C) acetonie przez 4 min i przechowywano w -20°C .

Immunofluorescencja (IF). Stosowano odczyn immunofluorescencji pośredniej, przy użyciu króliczej surowicy odpornościowej przeciwko syntetazie glutaminowej w rozcieńczeniu 1:10 jako pierwszej warstwy i surowicy koziej przeciwko gammaglobulinom króliczym, koniugowanej z izotiocjanianem fluoresceiny (Biomed, Warszawa), w rozcieńczeniu 1:10 — jako drugiej warstwy. Odczynnik fluorescencyjny absorbowano polimerem z gammaglobulin ludzkich i pudrem acetonowym z wątrób mysich. Szczegóły metody opisano uprzednio (Weinrauder, Krajewski 1979).

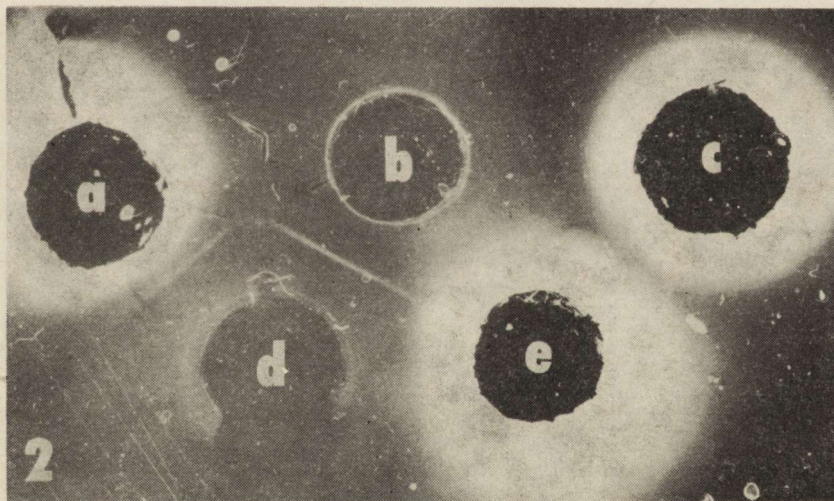
WYNIKI

Z czterech uodpornianych królików (1 padł przed zakończeniem cyklu szczepień) tylko dwa (nr 116 i 119) wytworzyły przeciwciała precypitujące, dające widoczną reakcję w odczynie ID z syntetazą w stężeniu 10 mg/ml (ryc. 1). Reakcja była dodatnia z antygenem w stężeniach 20, 10 i 5 mg/ml, przy użyciu większych rozcieńczeń reakcji nie używano. Obie surowice reagowały także z wyciągiem z mózgu szczura, a otrzymane linie precypitacyjne dawały reakcję całkowitej identyczności (ryc. 2). Wynik ten wskazuje na identyczność antygenową syntetazy glutaminowej z mózgu owcy i szczura, a pojedyncze pasmo w reakcji z pełnym wyciągiem z mózgu jest potwierdzeniem wysokiej swoistości i monowalentności otrzymanej surowicy odpornościowej.



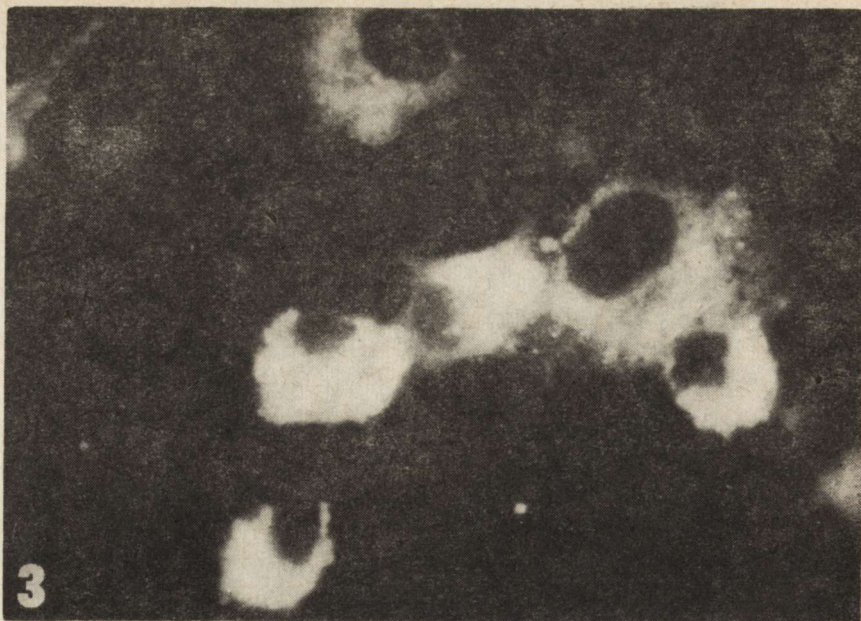
Ryc. 1. Odczyn ID. Reakcja surowic odpornościowych z syntetazą glutaminową (5 mg/ml) — otwór środkowy. a, b, e, f, — surowice odpornościowe od 4 królików. c, d — otwory puste

Fig. 1. ID test. Reaction of immune sera with glutamine synthetase (5 mg/ml) — central well. a, b, e, f — immune sera from 4 rabbits. c, d — empty wells



Ryc. 2. Odczyn ID. a — wyciąg z mózgu szczura, b — syntetaza glutaminowa (20 mg/ml), c — wyciąg z mózgu szczura, d — surowica przeciwko syntetazie glutaminowej, e — surowica przeciwko wyciągowi z mózgu szczura, absorbowana homogenatami z wątroby, śledziony i nerki

Fig. 2. ID test. a — rat brain extract, b — glutamine synthetase (20 mg/ml), c — rat brain extract, d — anti glutamine synthetase serum, e — immune serum against rat brain extract after absorption with homogenates of liver, spleen and kidneys



Ryc. 3. Trzytygodniowa hodowla z mózdzku noworodka szczura. Reakcja IF z surowicą przeciwko syntetazie glutaminowej (1:10). Grupa komórek z silnie dodatnią fluorescencją w cytoplazmie. Pow. 600 ×

Fig. 3. Three-week culture of newborn rat cerebellum. IF reaction with anti glutamine synthetase serum (1:10). Group of cells with strong fluorescence in cytoplasm. × 600



Ryc. 4. Trzytygodniowa hodowla mózdzku. Reakcja IF z surowicą przeciwko syntetazie. Widoczna pojedyncza komórka z bardzo silnym, homogennym świeceniem cytoplazmy i z ujemnymi wypustkami. Pow. 600 ×

Fig. 4. Three-week culture of cerebellum. IF reaction with anti glutamine synthetase serum. (1:10). Single cell with very strong and homogeneous fluorescence in the cytoplasm and with negative processes. × 600

W odczynie IF, w trzytygodniowych hodowlach z mózdzku stwierdzono występowanie dodatnich komórek. Odczyn był zlokalizowany w cytoplazmie, miał charakter ziarnisty lub dyfuzyjny (w komórkach z najsilniejszym świeceniem), wypustki komórkowe były słabo zaznaczone (ryc. 3). Zwraçały uwagę różnice intensywności odczynu. Spotykano ugrupowania komórek o różnym nasileniu świecenia, a także pojedyncze astrocyty z bardzo intensywnym odczynem w cytoplazmie, leżące wśród komórek z odczynem znacznie słabszym lub negatywnym (ryc. 4).

OMÓWIENIE

Uodporniając króliki handlowym preparatem syntetazy glutaminowej z mózgu owcy, uzyskano wysoce swoistą surowicę precypitującą, aktywną także w odczynie immunofluorescencji. Odczyn immunodyfuzji wykazał identyczność antygenową enzymu z mózgu owcy i szczura. Wynik ten jest zgodny z danymi uzyskanymi przez Martinezę-Hernandezę i wsp. (1977) i wskazuje na brak swoistości gatunkowej syntetazy glutaminowej, co także sugerują w swojej pracy Hallermayer i Hamprecht (1984). Prac, dotyczących analizy immunochemicznej stosowanych surowic odpornościowych, w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono. Można jedynie, na podstawie danych różnych autorów posługujących się metodami immunohistochemicznymi, przypuszczać, że syntetaza glutaminowa podobnie jak GFAP (glial fibrillary acidic protein) — inny uznany marker astrocytów — nie wykazuje swoistości gatunkowej. Jest to oczywiście korzystne z punktu widzenia zastosowania tego enzymu jako markera w badaniach nad tkanką nerwową różnych gatunków zwierząt i człowieka.

Za pomocą immunofluorescencji zlokalizowano syntetazę glutaminową w komórkach z mózdzku noworodka szczura, rosnących 3 tygodnie *in vitro*. Intensywne świecenie obserwowano w cytoplazmie; wypustki wykazywały reakcję znacznie słabszą lub ujemną.

Syntetazę zlokalizowano immunocytochemicznie w astrocytach mózgu dorosłego szczura (Norenberg, Martinez-Hernandez 1979) oraz w pierwotnych hodowlach z mózgu myszy (Hallermayer, Hamprecht 1984). W astrocytach hodowanych, a pochodzących z mózgu szczura, oznaczano poziom tego enzymu metodami biochemicznymi (Schousboe i wsp. 1977; Schousboe, Divac 1979). Schousboe i wsp. (1980) stwierdzili, że enzym wykazuje podobny wzorzec rozwojowy *in vivo* i *in vitro*, czym różni się od pozostałych enzymów metabolizujących glutaminian. Aktywność syntetazy oznaczana w trzytygodniowych hodowlach osiąga wyższy poziom niż aktywność mierzona *in vivo*. Można zatem wnioskować pośrednio, że intensywna fluorescencja w astrocytach organotypowej hodowli mózdzku, stwierdzona w niniejszej pracy, stanowi odbicie wysokiej aktywności enzymu w warunkach *in vitro*. Porównawczych badań

enzymatycznej aktywności syntetazy i immunohistochemicznie wykrywanego antygeny w hodowli nie prowadzono. Jedyne dane, ustalające ilościową korelację między tymi wartościami i liczbą komórek glejowych, pochodzą z prac wykonanych na siatkówce (Moscona i wsp. 1972; Linser, Moscona 1981). Nie wnikając bliżej w te zależności należy stwierdzić, że syntetaza glutaminowa, coraz szerzej stosowana w badaniach neurobiologicznych, jest dobrym markerem astrocytów, a jak o tym świadczą badania m. in. Hallermayera i Hamprechta (1984) markerem subpopulacji tych komórek stanowiących morfologiczne podłoże „małej puli glutaminianowej”. Wykorzystanie immunohistochemicznej lokalizacji syntetazy w badaniach nad kompartmentalizacją komórkową enzymu (Linser i wsp. 1984) i w charakterystyce biologicznej astrocytów patologicznie zmienionych (Mossakowski, Weinrauder 1984) otwiera szersze perspektywy zastosowania tego enzymu jako swoistego markera.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЛЮТАМИНСИНТЕТАЗЫ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ АСТРОЦИТАХ

Резюме

В работе описаны методы получения иммунной сыворотки, содержащей антитела к глютаминсинтетазе, и ее использование в реакциях иммунодиффузии (ID) и иммунофлюоресценции (IF). Показана моновалентность и высокая специфичность полученной иммунной сыворотки. Результаты опытов, выполненных методом ID, указывают на антигенную идентичность глютаминсинтетазы мозга крысы и овцы. При исследовании культур мозжечка новорожденных крыс (три недели *in vitro*) выявлена интенсивная реакция IF в цитоплазме астроцитов, что указывает на сохранность антигенной формы глютаминсинтетазы в этих клетках при длительном культивировании.

LOCALIZATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN ASTROCYTES IN VITRO

Summary

The method of production of anti-glutamine synthetase serum and its application in immunodiffusion (ID) and immunofluorescence (IF) tests is described. Evidence for the high specificity and monovalency of the serum is presented. The results of ID test are indicative of the antigenic identity of sheep and rat brain synthetase. Strong IF reaction in the cytoplasm of a 3-week culture of newborn rat cerebellum confirms the presence of the antigenic form of the enzyme also in astrocytes cultured *in vitro*.

PIŚMIENNICTWO

1. Hallermayer K., Hamprecht B.: Cellular heterogeneity in primary cultures of brain cells revealed by immunocytochemical localization of glutamine synthetase. *Brain Res.*, 1984, 295, 1—11.

2. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
3. Linser P. J., Moscona A. A.: Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the glia-toxic agent alfa-aminoadipic acid. *Brain Res.*, 1981, 1, 103—119.
4. Linser P. J., Sorrentino M., Moscona A. A.: Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Develop. Brain Res.*, 1984, 13, 65—71.
5. Martinez-Hernandez A., Bell K. P., Norenberg M. D.: Glutamine synthetase: glial cell localization in brain. *Science*, 1977, 195, 1356—1358.
6. Moscona M., Frenkel N., Moscona A. A.: Regulatory mechanisms in the induction of glutamine synthetase in the embryonic retina; immunochemical studies. *Develop. Biol.*, 1972, 28, 229—241.
7. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 161—178.
8. Norenberg M. D., Martinez-Hernandez A.: Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 1979, 161, 303—310.
9. Patel A. J., Hunt A., Tahourdin C. S. M.: Regional development of glutamine synthetase activity in the rat brain and its association with the differentiation of astrocytes. *Develop. Brain Res.*, 1983, 8, 31—37.
10. Schousboe A., Divac I.: Differences in glutamate uptake in astrocytes cultured from different brain regions. *Brain Res.*, 1979, 177, 407—409.
11. Schousboe A., Svenneby G., Hertz L.: Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J. Neurochem.*, 1979, 29, 999—1005.
12. Schousboe A., Nissen C., Bock E., Sapirstein V. S., Juurlink B. H. J., Hertz L.: Biochemical development of rodent astrocytes in primary cultures. [W:] *Tissue culture in neurobiology*. Red. E. Giacobini, A. Vernadakis, A. Shahar. Raven Press, New York 1980, 397—409.
13. Weinrauder H., Krajewski S.: Immunofluorescencyjna lokalizacja narządowo-swoistych antygenów w mózgu przy użyciu surowic homo- i heterologicznych *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 273—285.

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

IZABELA KLIMOWICZ-MŁODZIK, WŁODZIMIERZ PISARSKI,
MAŁGORZATA SASINOWSKA, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

POZIOM KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA)
I KWASU HOMOWANILINOWEGO (HVA) W PŁYNIE
MÓZGOWO-RDZENIOWYM CHORYCH Z PADACZKĄ

Klinika Neurologiczna II Wydziału Lekarskiego AM, Warszawa
Zakład Farmakologii Instytutu Nauk Fizjologicznych AM, Warszawa
Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Procesy prowadzące do wystąpienia napadów drgawkowych i mechanizm działań przeciwpadaczkowych są powszechnie wiązane z działaniem takich neuroprzekaźników, jak acetylocholina, glicyna, GABA, kwasy dwukarboksyłowe i serotonina (Meldrum 1978). Przyjmuje się przy tym, że układ GABAergiczny odgrywa istotną rolę w patogenezie padaczki (Kelly, Beart 1975). Badania doświadczalne potwierdzają, że w ogniskach padaczkowych dochodzi do obniżenia poziomu GABA (Seidel i wsp. 1981). Natomiast wyniki badań stężenia GABA w wycinkach ognisk padaczkowych pobranych w czasie zabiegów chirurgicznych u ludzi są zróżnicowane. Yamamoto i wsp. (1961) oraz van Gelder i wsp. (1972) zanotowali obniżenie zawartości GABA, podczas gdy Perry i wsp. (1975) nie uzyskali istotnych zmian poziomu neuroprzekaźnika. Rozbieżności uzyskanych wyników tłumaczono wpływem innych układów neuroprzekaźnikowych na proces powstawania napadów drgawkowych.

Rola układu dopaminergicznego w patogenezie padaczki jest stosunkowo mało poznana zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. U człowieka dane dotyczą głównie drgawkorodnego działania leków, których punktem uchwytu farmakologicznego są aminy biogenne (Jeri 1957, Steward 1957). W padaczce doświadczalnej potwierdzono wpływ niektórych leków na poziom GABA i dopaminy oraz jej metabolitu HVA (Horton i wsp. 1977, Anlezark i wsp. 1978). Wyniki badań sugerują ponadto, że istota czarna, struktura związana z funkcją układu dopaminergicznego i GABAergicznego, stanowi znaczący ośrodek działania przeciwdrgawkowego zależnego od GABA (Iadarola, Gale 1982). Na poziom neuroprzekaźników wpływa szereg leków, rodzaj pożywienia, wysiłek fizyczny. Stęże-

nie neuroprzebiegów podlega również wahaniom dobowym, a według niektórych autorów zależne jest również od płci i wieku chorych (Johansson, Roos 1967; Gottfries i wsp. 1971; Manyam, Hare 1983). Obserwacje na zwierzętach wykazały różnice w stężeniach amin katecholowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w zależności od czasu badania po wystąpieniu napadu (Kohsaka i wsp. 1978).

Znany jest pogląd, że jakkolwiek poziom GABA i HVA, który może stanowić wykładnik układu dopaminergicznego, w płynie mózgowo-rdzeniowym (m—rdz) nie odzwierciedlają ich stężeń w poszczególnych strukturach OUN, stanowią jednak cenną informację o zawartości tych substancji w OUN w warunkach obserwacji klinicznej chorego (Garelis, Sourkes 1974; Bohlen i wsp. 1979; Manyam, Hare 1983). Celem szerszego poznania roli układu GABAergicznego i dopaminergicznego w patogenezie napadów padaczkowych postanowiono określić poziom GABA i HVA w płynie m-rdz chorych z padaczką w zależności od płci, wieku, rodzaju napadów i ich częstotliwości, czasu trwania choroby, czasu wykonania badania po ostatnim napadzie oraz zastosowanego leczenia.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 44 chorych w wieku od 17 do 72 lat (średnia wieku 34,9). W grupie tej było 34 mężczyzn i 10 kobiet. Wszyscy chorzy przebywali w Klinice Neurologicznej II Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie, gdzie przeprowadzono badania neurologiczne, internistyczne, rutynowe testy laboratoryjne (m. in. morfologia z rozmazem, liczba płytek krwi, próby wątrobowe, poziom cukru i mocznika w surowicy krwi, badanie ogólne moczu), badanie płynu m-rdz oraz badania elektroencefalograficzne, w wybranych przypadkach również po aktywacji. U wszystkich chorych wykonano ponadto badania psychologiczne. W trakcie obserwacji 20 chorym nie podawano żadnych leków przeciwpadaczkowych. Pozostali pacjenci przyjmowali leki przeciwdrgawkowe: luminal i mizodin (7 chorych) oraz hydantoinal, hydantoinal i amizepin, mizodin i amizepin, clonazepam i hydantoinal, hydantoinal i amizepin, mizodin i amizepin — w mniej liczbych 5 grupach. Wszyscy chorzy przyjmujący leki przeciwdrgawkowe otrzymywali dodatkowo witaminę B₆.

Materiał podzielono na grupy według płci, wieku, charakteru napadów, częstości ich występowania, czasu trwania choroby, czasu badania płynu m-rdz od ostatniego napadu i zastosowanych leków przeciwdrgawkowych. Grupę kontrolną stanowiło 11 osób w wieku od 19 do 26 lat (średnia wieku 22 lata), które pozostawały w obserwacji szpitalnej. W grupie tej było 8 mężczyzn i 3 kobiety.

Płyn m-rdz pobierano z nakłucia lędźwiowego w pozycji leżącej na boku, zawsze w godzinach rannych (pomiędzy 10—11). Oznaczenia bio-

chemiczne wykonano z pierwszych 10 ml płynu. Dla oznaczeń poziomu GABA i HVA natychmiast po pobraniu płyn zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem, a następnie poddawano procesowi liofilizacji.

Oznaczanie poziomu GABA wykonano metodą Love i wsp. (1958) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974). Liofilizat z 1 ml płynu m-rdz uzupełniano do objętości 1 ml roztworem 0,01 mol/l NH_4Cl . Pobierano 200 μl płynu i dodawano 20 μl 10% roztworu kwasu trójchlorooctowego (TCA). Wytrącone białko usuwano przez wirowanie w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ przy 900 g przez 20 minut. Otrzymany nadsącz inkubowano przez 30 minut w temperaturze 60°C po dodaniu 20 μl 50 mmol/l kwasu glutaminowego i 200 μl 14 mmol/l ninhydryny. Następnie dodawano 5 ml odczynnika miedziowego (winian miedziowy z węglanem sodu). Fluorescencję odczytywano w spektrofлуorymetrze Aminco-Bowmana przy długościach fal 380—450 nm.

Oznaczanie poziomu GABA wykonano metodą Love i wsp. (1958) diniusa (1965) w modyfikacji Farleya i wsp. (1977). Zliofilizowany materiał otrzymany z 1 ml płynu m-rdz rozpuszczano w 0,3 ml 0,05 mol/l buforu Trizma, pH 8,5. Dodawano 1 ml 0,4 mol/l kwasu nadchlorowego (PCA) z cysteiną (150 ml PCA + 25 mg cysteiny + 0,4 g KCl). Wytrząsano 15 sekund w wytrząsarce, a następnie ręcznie przez 5 minut. Osad odwirowywano w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ przy 3600 g przez 10 minut. Do nadsączu dodawano 4 ml octanu butylu oraz kilka kryształków KCl. Wytrząsano dwukrotnie po 1 minucie. Do 3,5 ml fazy organicznej dodawano 1,2 ml 0,05 mol/l buforu Trizma, pH 8,5 i wytrząsano przez 1,5 minuty. Odrzucano fazę z octanem butylu, a fazę wodną w objętości 1 ml uzupełniano o 0,1 ml 0,05 mol/l buforu Trizma, pH 8,5, 0,1 ml 2 mol/l NH_4OH , 50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a po 4 minutach 50 μl 1% cysteiny. Równocześnie do każdej serii badań wykonano krzywą standardową oraz oznaczono kontrolnie standard wewnętrzny i ślepą próbę. Wyniki odczytywano przy użyciu spektrofлуorymetru Aminco-Bowmana przy długościach fal 318 i 420 nm.

Poziom GABA i HVA obliczano w nmol/l. Otrzymane wyniki analizowano statystycznie przy zastosowaniu testu t Studenta oraz testu Dixon.

WYNIKI

Wyniki badań klinicznych

U 20 chorych nie ustalono przyczyny napadów padaczkowych. W 12 przypadkach przyczyną napadów były przebyte urazy czaszkowo-mózgowe, w 4 przypadkach — przebyte urazy okołoporodowe, w 6 — prawdopodobnie przewlekły alkoholizm i w 2 przypadkach — choroby naczyń mózgu. U żadnego z badanych chorych nie stwierdzono istot-

nych odchyień w stanie internistycznym i neurologicznym. Natomiast u 4 osób obserwowano przejściowe objawy neurotoksycznego działania leków przeciwpadaczkowych pod postacią zespołu mózdkowego. Wyniki badań biochemicznych płynu m-rdz tych chorych nie wykorzystano do obliczeń statystycznych. Wyniki rutynowych badań laboratoryjnych oraz badanie płynu m-rdz nie wykazały istotnych zmian.

Pierwotnie uogólnione maksymalne napady występowały w 27 przypadkach, napady częściowe — u 2 chorych, u 15 pacjentów — napady częściowe wtórnie uogólnione. U 16 chorych napady występowały od roku, u 8 — od 2 lat, u 5 — od 5 lat, u pozostałych chorych — więcej niż 5 lat. Napady bardzo częste (od kilku dziennie do 1 w tygodniu) występowały u 8 osób, napady częste (rzadziej niż jeden napad w tygodniu, do jednego w miesiącu) u 12 pacjentów. U pozostałych 24 chorych napady występowały rzadko (mniej niż 1 napad drgawkowy w miesiącu). W wywiadzie u 2 chorych stwierdzono występowanie napadów gromadnych, a u 1 stan padaczkowy.

Wyniki badań biochemicznych

Wyniki badania zawartości GABA i HVA w płynie m-rdz u badanej populacji oraz w zależności od płci zawarto w tabeli 1. U wszystkich chorych z padaczką stwierdzono znamienne statystycznie obniżenie poziomu GABA o 32,4%. U mężczyzn spadek ten wynosił 34%, a u kobiet 27,4%, przy czym nie uzyskano znaczących różnic między grupą kobiet i grupą mężczyzn. Poziom HVA nie wykazywał istotnych różnic zależnych od płci w porównaniu z grupą kontrolną. W całym materiale stwierdzono przyrost HVA o 17,6%, w grupie mężczyzn — o 19,3%, w grupie kobiet — o 9,2%.

Poziomy GABA i HVA w poszczególnych grupach wieku zestawiono w tabeli 2. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w zawartości GABA i HVA w płynie m-rdz chorych z padaczką pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów.

Ocenę zależności pomiędzy stężeniem GABA i HVA a rodzajem napadów drgawkowych przedstawiono w tabeli 3. W porównaniu z kontrolą znamienne obniżenie poziomu GABA (o 33,5%) stwierdzono w grupie chorych z pierwotnie uogólnionymi maksymalnymi napadami padaczkowymi oraz w grupie chorych z częściowymi, wtórnie uogólnionymi napadami (o 33,2%). Obniżenia poziomu GABA u pacjentów z częściowymi napadami nie analizowano statystycznie. Ocena statystyczna stężeń GABA w grupie chorych z maksymalnymi pierwotnie uogólnionymi napadami i grupie z częściowymi wtórnie uogólnionymi napadami nie wykazała istotnych różnic.

Przyrost stężenia HVA o 19,8% w grupie chorych z napadami maksymalnymi pierwotnie uogólnionymi oraz o 35% u chorych z napada-

Tabela 1. Poziom GABA i HVA (n. mole/l), w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od płci

Table 1. Sex depending differences of GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients

	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Mężczyźni i kobiety								
Men and women								
Kontrola Control	10	236,7± 6,9	—	—	9	299,5±40,1	—	—
Chorzy na padaczkę Epileptic patients	38	159,9± 8,4	<0,001	—	38	352,2±23,6	>0,05	—
Mężczyźni Men								
Kontrola Control	7	238,5± 6,5	—	—	6	302,7± 4,7	—	—
Chorzy Patients	30	157,3± 9,7	<0,001	>0,05	30	361,0±29,1	>0,05	>0,05
Kobiety Women								
Kontrola Control	3	232,8± 7,7	—	—	3	292,9±84,6	—	—
Chore Patients	8	169,0±16,1	<0,001	>0,05	8	319,8±33,0	>0,05	>0,05

P_k — prawdopodobieństwo między badanymi grupami i grupą kontrolną obliczone według testu t Studenta.

probability between control and groups of epileptic patients calculated according to t Student's test.

P_b — prawdopodobieństwo między badanymi grupami chorych.

probability between the groups of patients.

n — liczba chorych.

number of patients.

mi częściowymi wtórnymi uogólnionymi nie wykazał znamienności statystycznej w stosunku do normy. Nie stwierdzono również istotnych różnic pomiędzy obu wyżej wymienionymi grupami pacjentów.

Porównanie poziomu GABA i HVA w płynie m-rdz w zależności od czasu trwania choroby zawarto w tabeli 4. Znaczące obniżenie poziomu GABA w porównaniu do kontroli stwierdzono we wszystkich badanych grupach, przy czym przy chorobie trwającej do roku o 33,5%, do 2 lat — o 36,6%, do 5 lat — o 25,1% oraz powyżej 5 lat o 31,5%. Poziom HVA w porównaniu z grupą kontrolną wykazywał przyrost

Tabela 2. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od wieku

Table 2. Age depending differences in GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients

Wiek (lata) Age (years)	n	GABA	P _b	n	HVA	P _b
17-30	22	150,9±9,5	p>0,05	26	322,4±29,6	p>0,05
31-50	6	160,0±26,3	p>0,05	4	436,8±89,0	p>0,05
51-60	5	185,4±32,6	p>0,05	5	325,8±65,4	p>0,05
powyżej 60 above	3	132,1±31,5	p>0,05	3	313,7±92,9	p>0,05

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Tabela 3. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od rodzaju napadów

Table 3. GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients depending on the character of seizures

Rodzaj napadów Character of seizure	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Kontrola Control	10	236,7±6,9			9	299,5±40,1		
Pierwotnie uogólnione, maksymalne Maximal primary generalized	24	157,4±9,7	<0,001	>0,05	22	358,8±33,0	>0,05	>0,05
Częściowe, wtórnie uogólnione Partial, secondary generalized	12	158,1±4,5	<0,001	>0,05	14	309,9±42,8	>0,05	>0,05
Częściowe Partial	2	100,4±5,4	—	—	2	323,1±47,5	—	—

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

o 31,3% u chorych z czasem trwania padaczki do 1 roku, do 2 lat — o 24% do 5 lat — o 15% i powyżej 5 lat — 12,8%, przy czym różnice były statystycznie nieznamienne zarówno w stosunku do normy, jak i pomiędzy poszczególnymi grupami chorych.

Poziom GABA i HVA w płynie m-rdz chorych w zależności od częstotliwości napadów zestawiono w tabeli 5. Znamienne obniżenie poziomu

Tabela 4. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od czasu trwania choroby

Table 4. GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients depending on the disease duration

Czas trwania choroby Duration of disease	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Kontrola Control	10	236,7 ± 6,9			9	299,5 ± 40,1		
Do 1 roku To 1 year	14	157,4 ± 20,5	<0,001	>0,05	11	393,4 ± 41,2	>0,05	>0,05
Do 2 lat To 2 yrs	6	150,0 ± 16,9	<0,001	>0,05	8	371,4 ± 62,7	>0,05	>0,05
Do 5 lat To 5 yrs	3	177,2 ± 29,9	<0,001	>0,05	5	344,5 ± 97,8	>0,05	>0,05
Powyżej 5 lat Above 5 yrs	15	162,2 ± 12,3	<0,001	>0,05	14	337,9 ± 63,7	>0,05	>0,05

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

GABA o 29,2% w porównaniu z kontrolą uzyskano u chorych z napadami występującymi rzadko i o 32,5% w grupie pacjentów z napadami bardzo częstymi. Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych między grupami chorych o różnej częstotliwości napadów padaczkowych. Poziom HVA w tych samych grupach chorych nie różnił się znamienne od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. U chorych z napadami występującymi rzadko przyrost poziomu HVA wynosił 22,1%, u chorych z napadami częstymi 28,8%, a w grupie chorych z napadami bardzo częstymi był on obniżony o 21,8%. Różnica stężeń HVA między grupą chorych z napadami częstymi i bardzo częstymi była statystycznie znamienne. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą chorych z napadami występującymi rzadko a grupą chorych z napadami częstymi i bardzo częstymi.

Zawartość GABA i HVA w płynie m-rdz w zależności od odstępu czasu pomiędzy ostatnim napadem i wykonanym badaniem zestawiono w tabeli 6. We wszystkich grupach stwierdzono znamienne obniżony poziom GABA w porównaniu z kontrolą: w pierwszym dniu po ostatnim napadzie o 31,0%, między 2 a 7 dniem — o 23,8%, między 8 a 30 dniem o 36,3% i po więcej niż 30 dniach od ostatniego napadu o 39,6%. Nie stwierdzono znamienności różnic między poszczególnymi grupami chorych z padaczką. Statystyczna ocena różnic stężeń HVA w porównaniu z grupą kontrolną po 1 dniu od ostatniego napadu wykazała nieznamienne przyrost o 3,1% i po 2—7 dniach przyrost o 24,9%. Istotny

Tabela 5. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od częstości napadów

Table 5. GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients depending on frequency of seizures

Częstość napadów Frequency of seizures	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Kontrola Control	10	236,7± 6,9			9	299,5±40,1		
Rzadkie Rare	19	167,7±12,0	<0,001	>0,05	18	365,9±53,0	>0,05	>0,05
Częste Frequent	9	159,8±17,9	<0,001	>0,05	12	385,7±33,8	>0,05	<0,05
Bardzo częste Very frequent	8	147,0±29,0	<0,001	>0,05	8	234,1±32,5	>0,05	<0,05

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Tabela 6. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od odstępu czasu pomiędzy ostatnim napadem i wykonaniem badania

Table 6. GABA and HVA levels in cerebrospinal fluid of epileptic patients depending on the time interval between last fit and CSF examination (nmoles/l)

Odstęp czasu Time interval	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Kontrola Control	10	236,7± 6,9			9	299,5±40,1		
Grupa A – 1 dzień Group A – 1 day	8	163,3±20,0	<0,001	>0,05	9	308,8±24,9	>0,05	<0,05 C >0,05B, D
Grupa B – 7 dni Group B – 7 days	12	180,3±16,7	<0,001	>0,05	13	374±65,4	>0,05	>0,05
Grupa C – 8–30 dni Group C – 8–30 days	12	150,7±15,4	<0,001	>0,05	11	402,2±30,5	<0,05	<0,05 A >0,05 B, D
Grupa D – pow. 30 dni Group D – above 30 days	6	142,9± 9,8	<0,001	>0,05	6	347,3±81,3	>0,05	>0,05

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

wzrost stężenia HVA o 34,2% stwierdzono po 8—30 dniach, a po okresie dłuższym niż 30 dni nieznaczący przyrost o 15%. Uzyskano także znamienne różnicę poziomów HVA w płynie m-rdz od chorych badanych po 1 dniu i w okresie 8—30 dni po ostatnim napadzie. Obliczenia statystyczne wyników w pozostałych grupach nie wykazały między nimi istotnych różnic.

Poziom GABA i HVA u chorych z padaczką w zależności od zastosowanego leczenia przedstawiono w tabeli 7. Stwierdzono znamienne obniżenie poziomu GABA w porównaniu z kontrolą u chorych nie leczonych o 27,2%, a w grupie chorych przyjmujących leki o 37,3%, w tym w grupie chorych otrzymujących luminal + mizodin o 38,1%, a u przyjmujących pozostałe leki o 28,9%. Nie zanotowano istotnych różnic w stężeniu GABA pomiędzy grupami chorych nie leczonych i leczonych oraz grupą przyjmującą luminal + mizodin i grupą leczoną innymi lekami przeciwpadaczkowymi.

Tabela 7. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na padaczkę w zależności od zastosowanego leczenia

Table 7. Treatment depending differences in GABA and HVA levels (nmoles/l) in cerebrospinal fluid of epileptic patients

Grupa chorych Group of patients	n	GABA	P _k	P _b	n	HVA	P _k	P _b
Kontrola Control	10	236,7 ± 6,9			9	299,5 ± 40,1		
Nie leczeni Non treated	16	172,2 ± 16,5	<0,001	>0,05	17	371,4 ± 50,5	>0,05	>0,05
Leczeni Treated	23	148,5 ± 9,5	<0,001		20	311,5 ± 28,7	>0,05	
Leczeni luminalem i mizodinem Treated with Lu- minal and Mizodin	6	145,1 ± 18,4	<0,001		6	410,4 ± 31,3	>0,05	
Przyjmujący inne leki Treated with other drugs	17	168,1 ± 16,2	<0,001	>0,05	14	269,2 ± 26,4	>0,05	<0,05

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Przyrost poziomu HVA w stosunku do normy w grupie chorych nie leczonych o 24% i leczonych o 4% był statystycznie nieznamienne, podobnie jak przyrost w grupie przyjmującej luminal + mizodin o 37% i w grupie chorych leczonych innymi lekami przeciwdrgawkowymi o 10,1%. Różnica wyników 2 ostatnich grup była statystycznie znamienne.

OMÓWIENIE

Ocena uzyskanych przez nas wyników musi być bardzo ostrożna ze względu na wpływ wielu czynników na układ GABA- i dopaminergiczny, jak również ze względu na małą liczebność niektórych grup chorych. Staraliśmy się zachować stałe warunki przy pobieraniu płynu m-rdz, jednakże ni zawsze było to możliwe (np. wielogodzinne unieruchomienie pacjenta przed nakłuciem). Nie można ponadto wykluczyć niekontrolowanego przyjęcia leku przez pacjenta, np. pochodnych kwasu acetylosalicylowego, zmieniających stężenie HVA.

Przeprowadzone badania wykazały, że poziom GABA u chorych z padaczką jest znamienne obniżony o 32,4% w porównaniu do ludzi zdrowych, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów (Tower 1976; Meldrum 1978; Wood i wsp. 1979; Manyam i wsp. 1980). Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem GABA a płcią i wiekiem chorych, rodzajem i częstością napadów, czasem trwania choroby, okresem, jaki upłynął od ostatniego napadu do pobrania płynu m-rdz oraz podanych leków. Obserwacje te mogą sugerować istotną rolę GABA w patogenezie padaczki i możliwość istnienia stałego defektu układu GABA-ergicznego u chorych z padaczką. Może on mieć miejsce na różnych etapach przemian neuroprzekaznika. Jak wynika z badań doświadczalnych na zwierzętach obniżenie zawartości GABA w OUN może być wywołane zahamowaniem jego syntezy na etapie katalizowanym przez dekarboksylazę glutaminianową w tkance nerwowej i/lub glejowej (Haber i wsp. 1970; Wu, Roberts 1973). Zahamowanie syntezy GABA może występować również przy obniżonym poziomie witaminy B₆ (Tower 1969), czego klinicznym dowodem było występowanie drgawek u dzieci pozbawionych w pożywieniu tej witaminy (Hunt i wsp. 1954). Brak witaminy B₆ ma także znaczenie w procesie rozkładu GABA poprzez wpływ tej witaminy na aktywność aminotransferazy 4-aminomasłan:2-oksoglutaran (Simler i wsp. 1973). Na podstawie badań płynu m-rdz w warunkach obserwacji klinicznej chorego trudno ustalić przyczynę obniżenia poziomu GABA w mózgu, ponieważ na jego stężenie wpływają również procesy związane z uwalnianiem i transportem błonowym (Tower 1976).

Jak wykazały nasze badania, podawanie leków przeciwpadaczkowych nie zmieniało w sposób istotny poziomu GABA w płynie m-rdz. Wobec stwierdzonego zwiększenia puli GABA pod wpływem barbituranów i benzodwuzepin (Ho 1980; Tapia 1980; Loeschner 1981), obserwacja ta jest trudna do wytłumaczenia. Zdaniem Kuriyama i wsp. (1970) niski poziom GABA w płynie m-rdz u chorych leczonych może być związany z lepszą utylizacją i/lub obniżeniem transportu z płynu międzykomórkowego do płynu m-rdz.

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wyraźnych różnic w stężeniu HVA pomiędzy chorymi z padaczką i grupą kontrolną. Nie

znaleziono również istotnych zależności pomiędzy poziomem HVA i szeregiem badanych parametrów klinicznych. Wyjątek stanowił znamienne podwyższony poziom tego metabolitu dopaminy u chorych, u których badanie płynu wykonywano od 8 do 30 dnia po napadzie. Interpretacja tego zjawiska jest trudna. Na podstawie badań Hadwick i wsp. (1975) można przypuszczać, że wynika ono z osiągnięcia poziomu terapeutycznego leków w tym okresie. Za dużą chwiejnością stężenia HVA w płynie m-rdz może przemawiać przyrost tego związku o 174,3% u 4 chorych, u których obserwowano objawy przedawkowania leków w postaci zespołu mózdkowego. Ponadto stwierdzono znaczny przyrost HVA u chorych leczonych luminalem i mizodinem.

Zanotowano również w badanym materiale obniżenie poziomu HVA u chorych z napadami bardzo częstymi w porównaniu do chorych z napadami częstymi. Obserwacja ta znajduje uzasadnienie w stwierdzonym przez Coolsa i wsp. (1975) podwyższeniu pogotowia drgawkowego w wyniku obniżenia poziomu dopaminy. Przedstawione w pracy obserwacje wymagają potwierdzenia na większym materiale, przy czym niezbędnym warunkiem jest rygorystyczne przestrzeganie zasad metodologicznych przy pobieraniu płynu m-rdz.

WNIOSKI

1. U chorych z padaczką stwierdzono w płynie m-rdz znamienne obniżenie poziomu GABA.

2. Nie stwierdzono zależności pomiędzy obniżeniem stężenia GABA a płcią i wiekiem chorych, charakterem i częstością występowania napadów drgawkowych, czasem trwania choroby, okresem, jaki upłynął od ostatniego napadu do dnia badania oraz leczenia preparatami przeciwdrgawkowymi.

3. Stężenie HVA w płynie m-rdz u chorych z padaczką może ulegać zmianie w zależności od częstości napadów oraz okresu badania po ostatnim napadzie.

УРОВЕНЬ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (GABA) И ГОМОВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ (HVA) В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Резюме

Целью работы был анализ роли GABA-эргической и дофаминэргической систем в патогенезе эпилептических припадков на основании оценки уровня GABA и HVA в спинномозговой жидкости в зависимости от пола, возраста, рода припадков, их частоты, продолжительности болезни, времени проведения исследования после последнего припадка и лечения больных эпилепсией.

Исследования были проведены у 44 больных эпилепсией в возрасте от 17 до 72 лет в том числе 34 мужчин и 10 женщин. Определение уровня GABA авторы проводили спектрофлюоро-

метрическим методом (Love и сотр. 1958 в модификации Суттена и Симмондса 1974). Концентрацию HVA исследовано при помощи спектрофлуорометрического метода Корроди и Вердиниуса (1965) в модификации Фарлея и сотр. (1977). В спинномозговой жидкости больных эпилепсией констатировано статистически достоверное снижение уровня GABA на 32,4% в сопоставлении с контрольной группой. Авторы не наблюдали существенных различий в концентрации этого нейротрансмиттера в зависимости от принятых клинических параметров. Статистический анализ групп больных эпилепсией показал что концентрация HVA может подвергаться изменениям в зависимости от частоты припадков периода исследования спинномозговой жидкости после последнего припадка и от рода примененного лечения.

GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) AND HOMOVANILLIC ACID (HVA) LEVELS IN CEREBROSPINAL FLUID OF EPILEPTIC PATIENTS

Summary

The aim in view was analysis of the role of the GABA-ergic and dopaminergic systems in the pathogenesis of epileptic seizures, based on the GABA and HVA levels evaluation in the cerebrospinal fluid, in dependence on sex, age, kind of seizures, their frequency, duration of the disease, time of examination after the last seizure and treatment of epileptic patients.

Forty four patients with epilepsy, aged from 17 to 72 years, including 34 men and 10 women were examined. GABA level was determined by the spectrofluorimetric method (Love et al., 1958, in the modification of Sutton and Simmonds, 1974). HVA concentration was determined by the spectrofluorimetric method of Corrodi and Werdinius (1965) in the modification of Farley et al. (1977). A statistically significant depression of the GABA level by 32.4 percent was noted in the cerebrospinal fluid of epileptic patients as compared with that in the control group. No significant differences in the concentration of this neurotransmitter, dependent on the clinical parameters adopted were observed. Statistical analysis of the epileptic patients according to groups demonstrated that HVA concentration may change in dependence on the frequency of seizures, the time at which the cerebrospinal fluid is examined after the last seizure and the kind of therapy applied.

PIŚMIENNICTWO

1. Anlezark G. M., Horton R. W., Meldrum B. S.: Dopamine agonists and reflex epilepsy. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1978, 19, 383—388.
2. Böhlen P., Huet S., Palfreyman M. G.: The relationships between GABA concentrations in brain and cerebrospinal fluid. *Brain Res.*, 1979, 167, 297—305.
3. Cools A. R., Hendriks G., Corton J.: Acetylcholine, dopamine balance in the basal ganglia of rhesus monkey and their role and dynamics in dystonic and epileptic muscle activity. *J. Neuronal. Transm.*, 1975, 36, 91—105.
4. Corrodi H., Werdinius B.: Oxidative conversion of homovanillic acid to a fluorescent compound. *Acta Chem. Scand.*, 1965, 19, 1854—1858.
5. Farley I. J., Price K. S., Hornykiewicz O.: Dopamine in the limbic regions of the human brain: Normal and abnormal. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1977, 16, 57—64.
6. Garelis E., Sourkes T. L.: Use of cerebrospinal fluid drawn of pneumoencephalography in the study of monoamine metabolism in man. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1974, 37, 704—710.

7. Gottfries C. G., Gottfries I., Johansson H., Olsson R., Persson T., Roas B. E., Sjöström R.: Acid monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid and their relations to age and sex. *Neuropharmacology*, 1971, 10, 665—672.
8. Haber B., Kuriyama K., Roberts E.: L-Glutamic acid decarboxylase. A new type glial cells in human brain gliomas. *Science*, 1970, 168, 598—601.
9. Hadwick D., Jenner I., Raynolds E. H.: Amines, anticonvulsants and epilepsy. *Lancet*, 1975, 1, 473—476.
10. Ho I. K.: Effects of acute and chronic administration of pentobarbital on GABA system. *Brain Res. Bull.*, 1980, 5/Suppl. 2, 873—878.
11. Horton R. W., Anlezark G. M., Sawaya M. C. B., Meldrum B. S.: Monoamine and GABA metabolism and the anticonvulsant action of di-n-propylacetate and etanolamine-O-sulfate. *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 41, 387—397.
12. Hunt A. D., Stokes J., Mc Crory W. W., Stround H. H.: Pyridoxine dependency. Raport of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics*, 1954, 13, 140—145.
13. Iadarola M. J., Gale K.: Substantia nigra: Site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science*, 1982, 218, 1237—1240.
14. Jeri A. P.: The effect of reserpine on the scalp and basal electroencephalogram (Abstr.) *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1957, 9, 427—440.
15. Johansson B., Roos B. E.: 5-hydroxyindoloacetic and homovanillic acid levels in the cerebrospinal fluid of healthy volunteers and patients with Parkinson's syndromes. *Life Sciences*, 1967, 6, 1449—1454.
16. Johansson B., Roos B. E.: Concentrations of monoamine metabolites in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. *Acta Neurol. Scand.*, 1975, 52, 137—144.
17. Kelly J. S., Beart P. M.: Amino acid receptors in CNS. II. GABA in supraspinal regions. [W:] *Handbook of Psychopharmacology*. Red. L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder. Plenum Press, New York 1975, 4, 129—209.
18. Kohsaka M., Hiramatsu M., Mori A.: Brain catecholamine concentrations and convulsions in El Mice. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1978, 19, 389—396.
19. Kuriyama K., Sze P. Y.: Aminoacetic acid and the blood-brain barrier to gamma-aminobutyric acid. *Pharmacologist*, 1970, 12, 207—212.
20. Loeschner W.: Mechanism of action of antiepileptic drugs. Experimental results on the role of neurotransmitters. *Nervenarzt*, 1981, 52, 61—67.
21. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8—15.
22. Manyam N. V. B., Katz L., Hare T. A., Gerber J. C., Grossman M. H.: Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. *Arch. Neurol.*, 1980, 37, 352—355.
23. Manyam N. V. B., Hare T. A.: Cerebrospinal fluid GABA measurements: Basic and clinical considerations. *Clinical Neuropharmacology*. Raven Press, New York 1983, 1, 25—36.
24. Meldrum B. S.: Neurotransmitters and epilepsy. [W:] *Neurotransmitter systems and their clinical disorders*. Red. N. J. Legg. Acad. Press, London, New York, San Francisco 1978, 167—181.
25. Perry T. L., Hansen S., Kennedy J., Wada J. A., Thompson G. B.: Amino acids in human epileptogenic foci. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 752—754.
26. Seidel J., Kästner I., Winkelman E.: A loss of GABAergic hippocampus innervation in rats with cobalt-induced epilepsy demonstrated by Wolman's method. *Acta Histochem.*, 1981, 34, 115—121.
27. Simler S., Ciesielski L., Maitre M., Randranarisoa H., Mandel P.: Effects of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain gamma-aminobutyric acid level. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 1701—1708.

28. Steward L. P.: Chlorpromazine: Use to activate electroencephalographic seizure pattern. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1957, 9, 427—440.
29. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801—1812.
30. Tapia R.: Convulsions and the function of GABAergic synapses. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1980, 39, 123—131.
31. Tower D. B.: Neurochemical mechanisms. [W:] *Basic Mechanisms of Epilepsies*. Red. H. H. Jasper, A. Ward Jr., A. Pope. Little Brown and Co., Boston 1969, 611—638.
32. Tower D. B.: GABA and seizures clinical correlates in man. [W:] *GABA in nervous system function*. Red. E. Roberts, T. W. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976, 461—478.
33. Van Gelder N. M., Sherwin A. L., Rasmussen T.: Amino acid content of epileptogenic human brain: Focal versus surrounding regions. *Brain Res.*, 1972, 40, 385—393.
34. Wood J. M., Hare T. A., Glaeser B. S., Bollenger J. C., Post R. M.: Low cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid content in seizure patients. *Neurology*, 1979, 29, 1203—1208.
35. Wu J. Y., Roberts E.: Comparative studies of L-glutamate decarboxylases from mouse brain and kidney. *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, 1973, 168, 598.
36. Yamamoto Y., Mori A., Jinnai D.: Amino acids in the brain. Alteration of amino acids in rabbit brain caused by acid contents in epileptic and non-epileptic human brain. *J. Biochem.*, 1961, 49, 368—372.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna II Wydziału Lekarskiego AM, ul. Stępińska 19/25, 00-739 Warszawa

ELŻBIETA KIDA, KRYSZYNA RENKAWEK, MIECZYSLAW ŚMIAŁEK

ROZLEGŁE USZKODZENIE STRUKTUR PNIA MÓZGU W PRZYPADKU OSTREJ POSTACI CHOROBY WILSONA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Choroba Wilsona jest spowodowana nadmiernym gromadzeniem w ustroju miedzi na skutek nieprawidłowej funkcji lizosomów hepatocytów (Strickland i wsp. 1972; Sternlieb i wsp. 1973). Miedź z uszkodzonych hepatocytów jest uwalniana do krwiobiegu i wtórnie odkładana w układzie nerwowym, nerkach, kośćcu i rogówce (Dobyns i wsp. 1979). Schorzenie cechuje różnorodność obrazu klinicznego, od tzw. postaci pionunujących, manifestujących się objawami nieodwracalnej niedokrwistości hemolitycznej z uszkodzeniem wątroby (Roche-Sicot, Benhamon 1977; Mc Cullough i wsp. 1983), do bardziej typowego, długotrwałego, postępującego procesu chorobowego, w którym dochodzi do uszkodzenia układu nerwowego (Strickland, Leu 1975; Dobyns i wsp. 1979). Obraz zmian neuropatologicznych odpowiada zazwyczaj przebiegowi klinicznemu choroby. Opisany przypadek ilustruje rzadko spotykany, ostry przebieg choroby Wilsona u dorosłej pacjentki z nasilonymi objawami neurologicznymi, bez cech klinicznych marskości wątroby, który zakończył się niepomyślnie mimo leczenia penicylamina. W obrazie neuropatologicznym uderza rozległość uszkodzeń strukturalnych pomimo krótkiego okresu trwania choroby.

OPIS PRZYPADKU

Chora B. M., lat 24, została przyjęta do Kliniki Neurologicznej ZNK II Wydziału Lekarskiego w Warszawie w dniu 14.01. 1983 r. Pierwsze objawy choroby w postaci drżenia lewej ręki wystąpiły w grudniu 1982 r. Stopniowo drżenie objęło obie kończyny górne, następnie dołączyły się trudności w polykaniu oraz zaburzenia mowy. Początkowo pacjentka była leczona ambulatoryjnie lekami psychotropowymi (thioridazin, mirenil, amitryptylinum), co nasiliło objawy neurologiczne. Do czasu obecnego zachorowania była zdrowa. Nikt w rodzinie chorej nie miał podobnych objawów.

Przy przyjęciu do oddziału w stanie internistycznym nie stwierdzono odchyień. Ciśnienie tętnicze wynosiło 130/80 mm Hg. Wątroba i śledziona nie były powiększone. Badaniem neurologicznym stwierdzono zespół pozapiramidowo-mózdkowy z obecnością ruchów mimowolnych o typie drżenia parkinsonowskiego, pozycyjnego o charakterze trzepotania skrzydeł i drżenia zamiarowego, wzmożone napięcie mięśniowe o typie plastycznym z objawem Stewarta-Holmesa. Lewy odruch skokowy był polikloniczny. Twarz chorej wykazywała nieznaczną maskowatość. Występowały zaburzenia mowy o charakterze mowy skandowanej i nosowej. Pacjentka krztusiła się przy polykaniu. Po kilku dniach pobytu w oddziale wystąpiły nasilone objawy wegetatywne z wybitną potliwością, ślinotokiem, przyśpieszeniem czynności serca oraz znacznym osłabieniem, które po zastosowanych lekach (propranolol, witaminy z grupy B oraz 40% glukoza) ustąpiły. Obserwowano jednak szybki postęp choroby z nasilaniem się drżenia oraz niezwykle wzmożonego napięcia mięśniowego w kończynach górnych z bólami stawowymi oraz przykurczami. Po stwierdzeniu obecności pierścienia Kaysera-Fleischera, obniżonego poziomu ceruloplazminy oraz miedzi radioaktywnej w surowicy rozpoczęto w dniu 31.01. 1983 leczenie penicylamina (cuprenil, Polfa), począwszy od 250 mg dziennie. Pomimo dobrej tolerancji leku stan chorej pogarszał się. Pacjentka gorączkowała, stawała się dementywna, obserwowano stany dysforyczne z okresami nocnego pobudzenia. W dniu 2.03. 1983 r. wystąpiły trudne do opanowania stany niedocukrzenia, spadek ciśnienia tętniczego, hypernatremia. W stanie internistycznym stwierdzono powiększenie wątroby na 2 palce oraz obrzęki całego ciała. Chora zmarła w dniu 11.03. 1983 r. wśród objawów niewydolności oddechowo-krażeniowej po około 3 miesiącach trwania choroby. Badania dodatkowe (odchylenia od normy): niedokrwistość niedobarwliwa w ostatnim okresie życia (Hb — 7,6% g, eryocyty 2 676 000), OB — 67/1 godz., cholesterol — 115 mg⁰%. Próby wątrobowe: bilirubina, transaminazy, próba tymolowa w normie, próba BSP przy przyjęciu 20,5%, następnie 33%. Pod koniec życia pacjentki obserwowano obniżenie poziomu cukru w surowicy do 36 mg⁰% oraz wzrost sodu do 161 mEq/l. Ponadto w ostatnim okresie życia stwierdzono nieznaczny wzrost poziomu mocznika (75 mg⁰%) oraz obniżenie poziomu białka ogólnego (5,4 g⁰%). Badanie moczu było prawidłowe, w posiewie moczu wyhodowano *Proteus species* o mianie 10⁶. Badanie ogólne płynu mózgowo-rdzeniowego było prawidłowe, poziom GABA: 152 nmol/l (norma — 236,7 ± 6,9), poziom HVA — 206,0 nmol/l (norma — 299,5 ± 40,1 nmol/l). Poziom ceruloplazminy w surowicy 8,25 mg⁰% (norma — 13—27 mg⁰%). Poziom miedzi radioaktywnej w surowicy: 24/2 — 0,16 oraz 48/2 — 0,20 (norma 24/2 — 1,32 ± 0,49 oraz 48/2 — 1,35 ± 0,63). W zapisie EEG stwierdzono obecność niedużych uogólnionych zmian pod postacią zwolnienia czynności podstawowej, z przewagą zmian nad prawą półkulą. Tomografia kompu-

terowa mózgu wykazała uogólniony zanik korowo-podkorowy w obrębie mózgowia i mózdzku z następowym poszerzeniem układu komorowego z niskimi zawartościami współczynnika osłabienia dla istoty białej obu półkul. W badaniu EKG wykazano możliwość zmian mięśniowych. Klinicznie rozpoznano chorobę Wilsona oraz posocznicę. Na sekcji ogólnej stwierdzono marskość wielkoguzkową wątroby, zawartość krwi w świetle przewodu pokarmowego, prawdopodobnie z krwawiących żyłaków przelyku, stwardnienie i niedokrwienie nerek oraz obrzęk płuc. Badanie mikroskopowe wykazało w wątrobie obecność nieprawidłowych hepatocytów (ryc. 1) o zmianach zwyrodnieniowych prowadzących do marskości oraz martwicę kanalikową nerek (dr K. Filipowicz).

Badanie neuropatologiczne

Mózg po utrwaleniu w formalinie ważył 1300 g. Makroskopowo stwierdzono zblednięcie całego mózgowia. Na przekrojach widoczne były obustronnie liczne, drobne jamki w skorupie oraz punkcikowate wybro-

Tabela 1. Zawartość miedzi w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (mmol/g suchej tkanki)

Table 1. Copper content in particular structure of the central nervous system (mmol/g dry tissue)

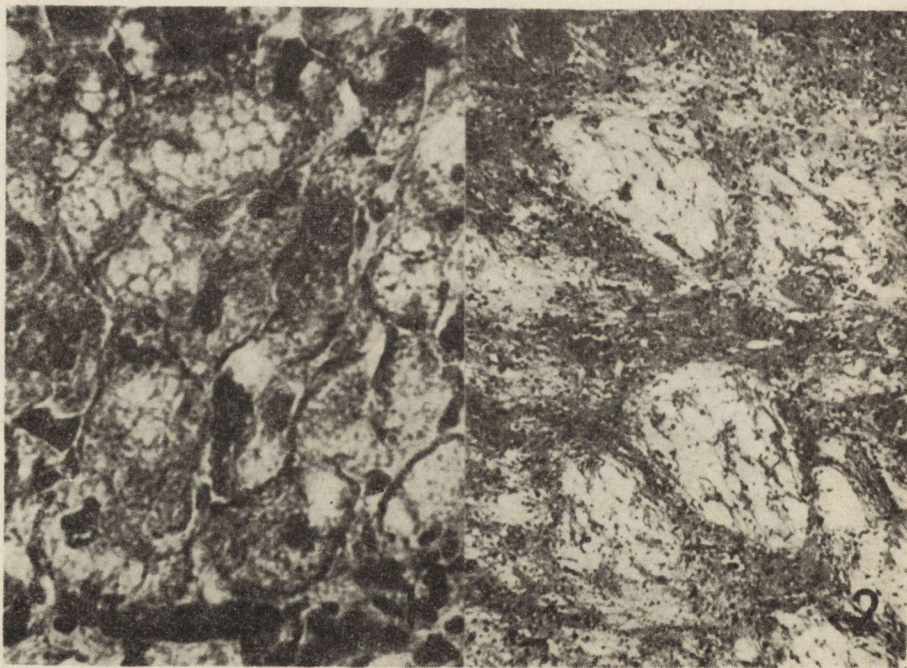
Struktura Structure	Chora Patient	Kontrola Control
1. Kora czołowa Frontal cortex	4,99	0,33
2. Istota biała pł. czołowego Frontal white matter	2,33	0,25
3. Jądro ogoniaste Caudatum	2,30	0,42
4. Gałka biała Pallidum	4,27	0,50
5. Skorupa Putamen	3,68	0,46
6. Wzgórze Thalamus	5,49	0,39
7. Most Pons	3,53	0,49
8. Opuszka Medulla	4,22	0,28
9. Kora potyliczna Occipital cortex	6,61	0,38
10. Istota biała pł. potylicznego Occipital white matter	1,92	0,30
11. Kora mózdzku Cerebellar cortex	6,26	0,54
12. Istota biała mózdzku Cerebellar white matter	2,71	0,44

Kontrolę stanowił mózg 21-letniego mężczyzny, który zmarł w wypadku samochodowym.
Control was the brain of 21 years old man, who succumbed in the traffic accident.

czynny w części podstawnej mostu. Do badania mikroskopowego pobrano skrawki z płata czołowego, zwojów podstawy i wzgórza, śródmózgowia, mostu, opuszki i mózdzku. Materiał barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, metodą Klüvera-Barrery, metodą PAS, sudanem czarnym B i błękitem alejanu. Ponadto pobrano materiał z lewej półkuli mózgu, pnia i mózdzku dla oznaczenia poziomu miedzi metodą spektrograficzną według Edena i Greena (1940). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Badanie mikroskopowe

Najbardziej zaawansowane zmiany w postaci licznych pól bezodcynowej martwicy gąbczastej obejmowały obustronnie skorupę (ryc. 2). Poza polami martwicy stwierdzono ubytki neuronalne, zmiany zwyrodnieniowe zachowanych neurocytów, glejotę astrocytarną oraz obecność komórek Alzheimera typu II i komórek Opalskiego (ryc. 3). Zwracał ponadto uwagę rozplem włóściczek oraz pobudzenie śródbłonka

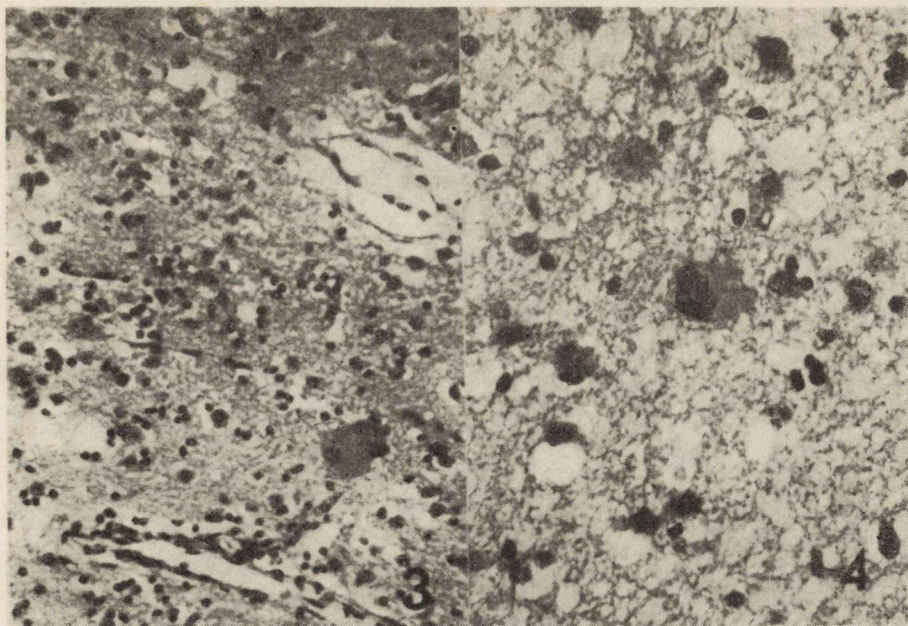


Ryc. 1. Zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe komórek wątroby. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 1. Advanced degenerative changes of hepatocytes. H—E. × 400

Ryc. 2. Skorupa. Pola martwicy gąbczastej. H—E. Pow. 60 ×

Fig. 2. Putamen. Areas of spongy necrosis. H—E. × 60



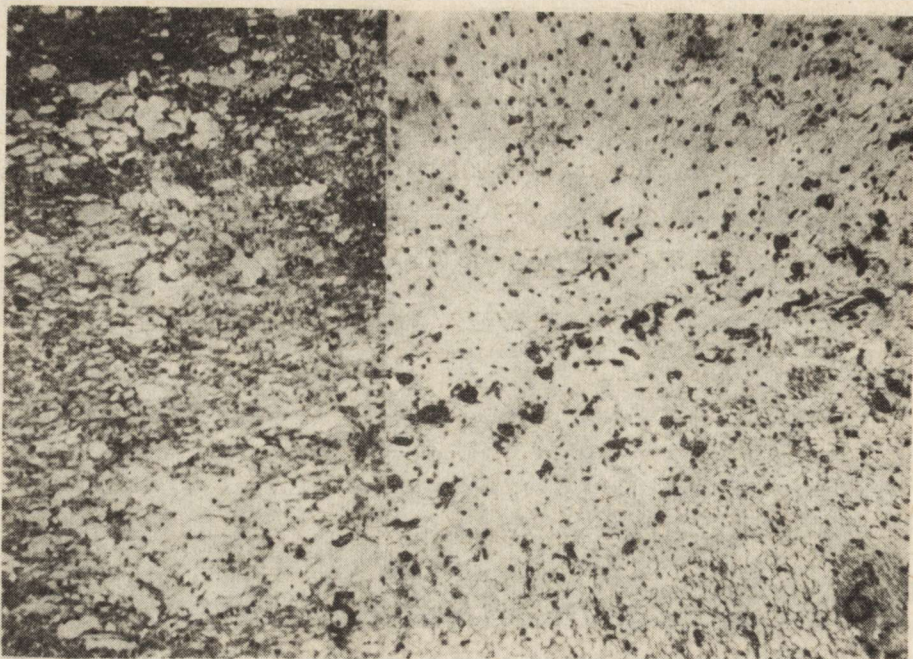
Ryc. 3. Skorupa. Glejoza, ubytki komórkowe i zmiany naczyniowe w tkance otaczającej pola martwicy. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 3. Putamen. Cellular gliosis, loss of neurons and vascular changes in the tissue at the periphery of necrotic areas. H—E. × 100

Ryc. 4. Jądro ogoniaste. Komórka Alzheimera typu I. Zgąbczenie podścieliska. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 4. Caudate nucleus. Alzheimer cell type I. Spongy degeneration of the neuropil. H—E. × 400

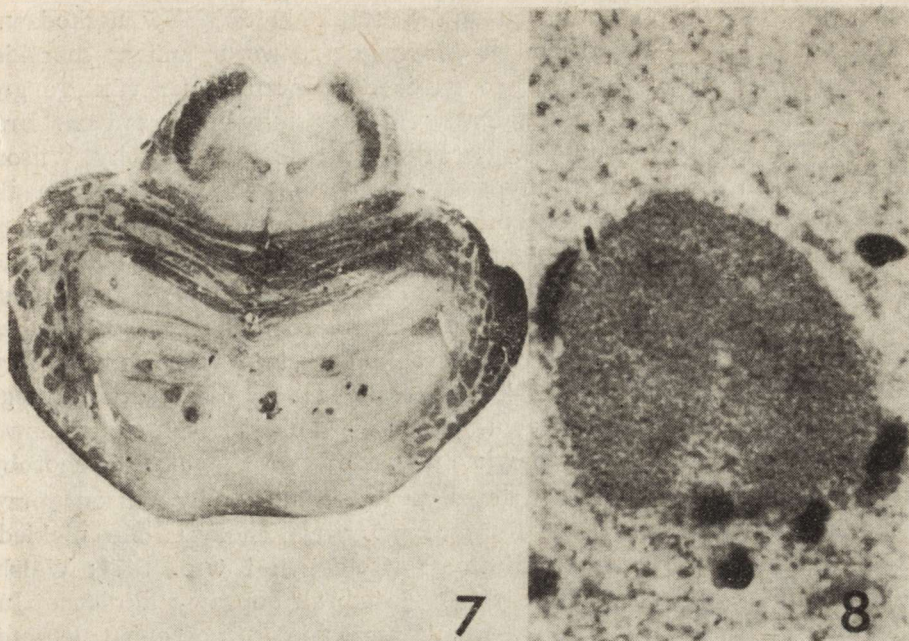
drobnych tętniczek. W jądrze ogoniastym struktura tkanki była wyraźnie rozluźniona z obecnością licznych, drobnych jamek. Neurocyty wykazywały zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe. Obserwowano liczne komórki Alzheimera typu II i komórki Opalskiego; rzadziej spotykano komórki Alzheimera typu I (ryc. 4). We wzgórzu oraz w gałce bladej proces patologiczny ograniczał się do nieswoistych zmian komórkowych o typie schorzenia ischemicznego oraz stłuszczenia. Sporadycznie spotykano komórki Opalskiego, częściej komórki Alzheimera typu II. Kora mózgu miała zachowaną budowę warstwową, nie obserwowano także zmian na pograniczu kory i podkorowej istoty białej. Neurocyty wykazywały zmiany ischemiczne. We wszystkich warstwach widoczny był rozplem włóścików. Ponadto stwierdzono pobudzenie komórek śródbłonna drobnych tętniczek oraz pomnożenie liczby komórek glejowych z występowaniem komórek Alzheimera typu II. W nakrywce śródmózgowia w obrębie skrzyżowania konarów górnych mózdzku oraz w jądrze konarowo-mostowym nakrywki stwierdzono rozległe pole bezodczynowej



Ryc. 5. Nakrywka śródmózgowia. Pole martwicy gąbczastej. H—E. Pow. 60 ×
 Fig. 5. Tectal part of midbrain. Area of spongy necrosis. H—E. × 60

Ryc. 6. Istota czarna. Uszkodzenie komórek barwnikowych warstwy zwartej oraz zmiany gąbczaste w warstwie siatkowatej. H—E. Pow. 100 ×
 Fig. 6. Substantia nigra. Neuronal damage in the compact zone and spongy changes of the reticular zone. H—E. × 100

martwicy gąbczastej (ryc. 5). Na obrzeżu obecne były pojedyncze komórki Opalskiego. W warstwie zwartej istoty czarnej stwierdzono znaczne obkurczenie neuronów oraz zmiany zwyrodnieniowe i rozpad komórek nerwowych z uwalnianiem barwnika, który widoczny był w pobliżu naczyń oraz luźno w tkance. W warstwie siatkowatej stwierdzono znaczne rozluźnienie i zgęszczenie tkanki (ryc. 6). W części podstawnej mostu oraz częściowo we wstędze przysrodkowej widoczne było rozległe pole demielinizacji (ryc. 7) z zachowanymi komórkami nerwowymi. W obrębie ogniska uszkodzenia mieliny odczyn astrogleju był tylko zaznaczony. Wokół kilku drobnych naczyń widoczne były koliste krwotoki, przy czym część wynaczynionych krwinek zawierała zmieniony barwnik krwi. W nakrywce mostu stwierdzono wyraźną glejozę astrocytarną oraz liczne komórki Opalskiego (ryc. 8). W opuszcce uszkodzenie osłonek mieliny ograniczone było do szwu. W jądrze pasma samotnego oraz jądrze grzbietowym nerwu błędnego obserwowano zgęszczenie oraz znaczny ubytek i zmiany zwyrodnieniowe neurocytów. Komórki Opalskiego i komórki Alzheimer'a typu II spotykano rzadziej niż w śródmózgowiu i mo-



Ryc. 7. Most. Pole demielinizacji z drobnymi krwotokami okołonacyniowymi. Klüver-Barrera. Pow. lupowe

Fig. 7. Pons. Area of demyelination with small, perivascular hemorrhages. Klüver-Barrera. Magn. glass

Ryc. 8. Most. Komórka Opalskiego. H.—E. Pow. 800 ×

Fig. 8. Pons. Opalski cell. H.—E. × 800

ście. Jądro zębate mózdzku wykazywało nieznaczne zgębczenie utkania, natomiast licznie występowały komórki Alzheimer'a typu II. W korze mózdzku stwierdzono pomnożenie gleju Bergmana. Opony były zwłókniałe. Wokół naczyń opon spotykano niewielkie skupienia komórek jednojądrzastych.

OMÓWIENIE

Ostra postać choroby Wilsona u osoby dorosłej, z tak znacznie nasilonym zespołem neurologicznym, objawami wegetatywnymi i psychicznymi, bez klinicznych cech marskości wątroby stanowi niezwykle rzadkość kazuistyczną. Według klasyfikacji podanej przez Denny Browna (1962) postaci mózgowie choroby Wilsona można podzielić na dwa główne typy: typ pseudosklerotyczny z drżeniem jako dominującym objawem neurologicznym i glejozą włóknistą w ośrodkowym układzie nerwowym oraz postać sztywnościowo-dystoniczną z martwicą gąbczastą w zwojach podstawy, spotykaną u osób poniżej 20 roku życia. Przedstawiony przypadek reprezentuje postać mieszaną, z równie nasilonym zespołem ruchów mimowolnych, jak też ze sztywnością mięśniową.

W omawianym przypadku już po wystąpieniu objawów uszkodzenia układu nerwowego doszło do gwałtownego rozwoju zmian marskich w wątrobie, co z kolei mogło prowadzić do znacznego i szybkiego gromadzenia miedzi w układzie nerwowym i w innych narządach. Brak zmian marskich w wątrobie w początkowym okresie choroby Wilsona nie należy do rzadkości (Dobyns i wsp. 1979). Natomiast przypadki, w których mimo dyskretnych zmian w wątrobie, możliwych do wykrycia dopiero w badaniu mikroskopowo-elektronowym, dochodzi do uszkodzenia układu nerwowego, spotykane są sporadycznie (Enat i wsp. 1979). Czynnikiem, który spowodował gwałtowny rozwój zmian w układzie nerwowym i zmian marskich w wątrobie pozostaje w opisanym przypadku nieznany. Należy jednak podkreślić możliwość niekorzystnego, dodatkowo obciążającego wpływu leków psychotropowych, przyjmowanych przez chorą w dużych dawkach w początkowym okresie choroby. Zastosowanie związków chelatujących w leczeniu choroby Wilsona przyniosło nie tylko znaczne przedłużenie przeżycia chorych, ale niekiedy także cofanie się objawów klinicznych (Goldstein i wsp. 1971; Walshe 1976). W opisanym przypadku niejasny jest brak poprawy klinicznej lub zahamowania postępu choroby, mimo wcześniej rozpoczętego leczenia i prawidłowej tolerancji leku.

Poza nietypowym dla choroby Wilsona, niezwykle burzliwym i krótkim przebiegiem klinicznym, w obrazie neuropatologicznym oprócz zmian charakterystycznych dla choroby Wilsona stwierdzono nasilone uszkodzenia morfologiczne w śródmózgowiu, moście i opuszcze. Znane z kazuistycznych opisów przypadki choroby Wilsona z zajęciem nakrywki śródmózgowia czy istoty czarnej należą do wyjątków i dotyczą pacjentów o długotrwałym przebiegu choroby (Alajouanine i wsp. 1955; Lichtenstein, Gore 1955). W opisanym przypadku zmiany w istocie czarnej mogły być odpowiedzialne za zespół parkinsonowski. Uszkodzenie istoty czarnej zarówno strukturalne, jak i czynnościowe znalazło u pacjentki wykładnik kliniczny w znamienym obniżeniu poziomu kwasu homowanilinowego (metabolitu dopaminy) w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Kolejną zmianą morfologiczną była rozległa demielinizacja włókien mostu odpowiadająca obrazowi mielinolizy środkowej mostu. Uszkodzenie to, występujące najczęściej w przypadkach marskości wątroby oraz stanach wyniszczenia, obserwowano także w chorobie Wilsona (Seitelberger 1974). Patogeneza tego uszkodzenia wiązana jest ostatnio z zaburzeniami elektrolitowymi, głównie stanami hypernatremii lub szybko wyrównywanej hyponatremii (Laurenco 1983). Według Norenberga (1983) hypernatremia uszkadza na drodze osmotycznej śródbłonek naczyń, co prowadzi do uwolnienia śródbłonkowych czynników mielinotoksycznych, uszkodzenia bariery krew-mózg oraz naczyniopochodnego obrzęku mózgu. Powodować to może, przy udziale towarzyszącej gliopatii, uszkodzenie osłonek mielinowych. Pełne uzasadnienie udziału tych czynników w pa-

togenezie demielinizacji mostu potwierdza przedstawiony przypadek. Przy czym zmiany naczyniowe występujące w chorobie Wilsona (Moszakowski i wsp. 1964; Anzil i wsp. 1974) mogły być dodatkowo nasilone przez niekorzystny wpływ zaburzeń elektrolitowych.

Znaczne nasilenie zmian strukturalnych stwierdzonych zarówno w zwojach podstawy, jak i w pniu mózgu można prawdopodobnie wiązać z szybkim gromadzeniem miedzi w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego, przekraczającej ponad 10-krotnie wartości prawidłowe. Byłoby to zgodne z hipotezą dotyczącą dynamiki rozwoju choroby przedstawioną przez Dobynsa i wsp. (1979) na podstawie przeanalizowanego materiału klinicznego. Brak ścisłej zależności między nasileniem zmian histologicznych i podwyższeniem zawartości miedzi w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego Wiśniewski i wsp. (1967) wiążą ze zmianami martwiczymi. Podobny wniosek można wyciągnąć również w opisanym przypadku.

Objawy kliniczne ostrej postaci mózkowej choroby Wilsona związane z rozległym uszkodzeniem ośrodkowego układu nerwowego mogły być więc z jednej strony wyrazem nadmiernego i szybkiego gromadzenia miedzi, z drugiej zaś uszkodzenia naczyń. Przypuszczalnie występuje tu ten sam bądź podobny mechanizm jak w przypadkach encefalopatii wątrobowych (Moszakowski i wsp. 1978; Laursen 1982). Gwałtowne nagromadzenie miedzi w układzie nerwowym i jej patogenne działanie odpowiedzialne zarówno za obraz kliniczny, jak i rozległość uszkodzeń strukturalnych mózgu można byłoby wówczas wiązać z uszkodzeniem mechanizmów strukturalnych i czynnościowych bariery krew-mózg.

ПРОТЯЖЕННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СТРУКТУР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА В СЛУЧАЕ ОСТРОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА

Резюме

Интенсивные невропатологические изменения в стволе головного мозга составляют редкую картину болезни Вильсона. В описанном случае с острым быстро прогрессирующим клиническим течением кроме изменений типа губчатого некроза в узлах основания констатировано также наличие некроза в покрышке среднего мозга повреждение черного вещества а также срединный миелолиз моста. Степень дальнейшего развития морфологических изменений и их характер можно связывать с очень значительным и быстрым накоплением меди в отдельных структурах центральной нервной системы а также с наличием электролитных расстройств. Авторы дискутируют патогенную роль обоих этих факторов.

BRAIN STEM DAMAGE IN ACUTE FORM OF WILSON'S DISEASE

Summary

Remarkable neuropathological changes in the brain stem constitute an unfrequent element of Wilson's disease. This report deals with a case of rapid progressive clinical course in spite of intensive Penicillamin therapy. Besides the necrotic foci in the basal ganglia, spongy necrosis in the midbrain, degenerative

changes of the substantia nigra and central pontine myelinolysis developed. The peculiar intensity and character of morphological changes may correspond to the very high and rapid accumulation of copper in particular brain structures and to electrolyte disturbances. These pathogenetic factors are discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Alajouanine T., Bertrand J., Boudin G., Pèpin B.: Étude anatomo-clinique et chimique d'un cas de pseudo-sclérose de Westphal-Strumpell. *Rev. Neurol.*, 1955, 93, 701—729.
2. Anzil A. P., Herrlinger H., Blizinger K., Heldrich A.: Ultrastructure of brain and nerve biopsy tissue in Wilson disease. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 94—100.
3. Denny Brown D.: The basal ganglia. *Red. W. R. Russel. Oxford University Press* 1962, 19—23.
4. Dobyns W. B., Goldstein N. P., Gordon H.: Clinical spectrum of Wilson disease (Hepatolenticular Degeneration). *Mayo Clin. Proc.*, 1979, 54, 35—42.
5. Eden A. H., Green H.: Microdetermination of copper in biological material. *Biochem. J.*, 1940, 34, 1202—1209.
6. Enat R., Lichtig C., Segman S., Hemli J. A., Barzilai D.: Ultrastructural pathology with normal light microscopy of liver in Wilson's disease. *Israel J. Med. Sci.*, 1979, 15, 484—489.
7. Goldstein N. P., Tauxe W. N., McCall J. T., Randall R. V., Gross J. B.: Wilson's disease (Hepatolenticular Degeneration). *Arch. Neurol.*, 1971, 24, 391—400.
8. Lauren R.: Central pontine myelinolysis following rapid correction of hyponatremia. *Ann. Neurol.*, 1983, 13, 232—242.
9. Laursen H.: Cerebral vessels and glial cells in liver disease. *Acta neurol. scandinav.*, 1982, 65, 381—412.
10. Lichtenstein B. W., Gore J.: Wilson's disease—chronic form. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1955, 73, 13—21.
11. Mathews T., Moosy J.: Central pontine myelinolysis: lesion evolution and pathology. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1975, 34, 77.
12. Mc Cullough A. J., Fleming C. R., Thistle J. L., Baldus W. P., Ludwig J., Mc Call J. T., Dickson E. R.: Diagnosis of Wilson's disease presenting as fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*, 1983, 84, 161—167.
13. Mossakowski M. J., Kasperek S., Rościńska D.: Zwyródnienie wątrobowo-soczewkowe z przewagą uszkodzeń korowo-podkorowych. *Neuropat. Pol.*, 1964, 2, 145—160.
14. Mossakowski M. J., Ostenda M., Pronaszko-Kurczyńska A.: Obraz mikroskopowo-elektronowy naczyń włosowatych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 327—337.
15. Norenberg M. D.: A hypothesis of osmotic endothelial injury. A pathogenetic mechanism in central pontine myelinolysis. *Arch. Neurol.*, 1983, 40, 66—69.
16. Roche-Sicot J., Benhamon J. P.: Acute intravascular hemolysis and acute liver failure associated as a first manifestation of Wilson's disease. *Ann. Int. Med.*, 1977, 86, 301—303.
17. Seitelberger F.: Central pontine myelinolysis. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 247—251.
18. Sternlied J., Van Den Hamer C. J. A., Morell A. G., Alpert S., Gregoriades G., Scheinberg I. H.: Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Gastroenterology*, 1973, 64, 99—105.

19. Strickland G. T., Beckner W. M., Leu M-L., O'Reilly S.: Turnover studies of copper in homozygotes and heterozygotes for Wilson's disease and controls: isotop tracer studies with 67-Cu . *Clin. Sci.*, 1972, 43, 605—615.
20. Strickland G. T., Leu M-L.: Wilson's Disease. Clinical and laboratory manifestations in 40 patients. *Medicine*, 1975, 54, 113—134.
21. Walshe J. M.: Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). [W:] *Handbook of Clinical Neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North Holland Publishing Company 1976, Vol. 27, 379—414.
22. Wiśniewski H., Śmiałek M., Szydłowska H., Zalewska T.: Quantitative topography of copper in Wilson's disease and in portosystemic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1967, 5, 91—103.

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

BARBARA GAJKOWSKA

KOMPLEKS GOLGIEGO W STYMULOWANYCH NEURONACH SEKRECYJNYCH PODWZGÓRZA SZCZURA

Streszczenie rozprawy habilitacyjnej

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Instytutu Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Zmienność morfologiczna kompleksu Golgiego ma ścisły związek z jego funkcją (Benjamin, Baker 1978; Tartakoff 1980; Locke, Huie 1983; Tokumitsu, Fishman 1983; Ellinger, Pavelka 1984). W miarę gromadzenia na ten temat informacji ustalono, że kompleks Golgiego ma zdolność do:

— koncentracji i otaczania błonami produktów wydzielniczych (Palade 1975; Broadwell i wsp. 1979; Broadwell, Oliver 1981; Farquhar, Palade 1981; Dautry-Versat, Lodish 1983),

— modyfikowania produktów wydzielniczych, między innymi glikozylacji protein i lipidów, ich sulfatacji (Young 1973; Schachter, Roseman 1980; Fleischer 1981; Young 1983) oraz proteolitycznego przetwarzania białek (Gainer i wsp. 1977),

— segregacji białek na białka sekrecyjne, lizosomalne i niektóre błonowe (mechanizmy odpowiedzialne za ten proces są jeszcze niedostatecznie poznane) oraz kierowania tych białek do właściwych im wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych lokalizacji (Farquhar, Palade 1981; Dautry-Versat, Lodish 1983).

Dość charakterystyczną cechą neuronów sekrecyjnych jest znaczne rozprzestrzenianie się kompleksu Golgiego w cytoplazmie oraz obecność w jego polu ziarnistości neurosekrecyjnych, ciał wielopęcherzykowych, lizosomów i różnych struktur włókienkowych należących do cytoskeletonu. Błony gładkie elementów kompleksu Golgiego sąsiadują ze wszystkich stron bezpośrednio z błonami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ER). Błony kompleksu Golgiego pod względem struktury i składu chemicznego stanowią element przejściowy między błonami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej a błoną komórkową. Badania histoenzymatyczne wykazały nieobecność w zbiornikach kompleksu Golgiego enzymów typowych dla ER, takich jak np. oksydoreduktazy zależne od

NADH i NADPH oraz glukozo-6-fosfatazy, a pojawianie się aktywności TPP-azy (Novikoff, Goldfischer 1961; Novikoff i wsp. 1962) i aktywności enzymów swoistych dla kompleksu Golgiego, tj. galaktozyltransferaz i sialyltransferaz (Farquhar, Palade 1981; Goldfischer 1982; Fleischer 1983). Cytochemiczne różnice w rozmieszczeniu enzymów obserwowano w kolejnych zbiornikach, jak również w tym samym zbiorniku. Zauważono także różnice w budowie ultrastrukturalnej błon zbiorników kompleksu Golgiego, które zmieniały progresywnie grubość błony podstawowej od 7 do 10 nm (Yamamoto 1963). Na podstawie tych obserwacji wysunięto hipotezę o funkcjonalnej i morfologicznej polaryzacji kompleksu Golgiego, związanej z transportem materiału sekrecyjnego w komórkach. Dzięki badaniom morfologicznym i histochemicznym rozróżniono dwie różne strony kompleksu Golgiego: tworzenia, tzw. cis, znajdującą się od strony kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER) i stronę dojrzewania (trans), znajdującą się po stronie przeciwnej układu związaną z ziarnami sekrecyjnymi (Palay 1960; Zambrano, de Robertis 1966; Pilgrim 1969). Ten fragment kompleksu Golgiego wykazuje dodatnią reakcję na TPP-azę (Novikoff, Goldfischer 1961; Iijima 1970; Angermüller, Fahimi 1984).

Zmienność morfologiczna i histoenzymatyczna błon kompleksu Golgiego świadczy o jego zróżnicowanej funkcji oraz dynamice. W bliskim sąsiedztwie kompleksu Golgiego, przeważnie po jego stronie wewnętrznej, w pobliżu regionu „trans” znajdują się pojedyncze, opisane przez Novikoffa (1964), zbiorniki zbudowane z błony gładkiej o szczególnym poligonalnym układzie. Zbiorniki wykazują połączenia z pęcherzykami sekrecyjnymi kompleksu Golgiego. Towarzyszą im zwykle pęcherzyki opłaszczone oraz lizosomy. Ten układ ultrastrukturalny Novikoff (1964) określił jako GERL (od pierwszych liter: Golgi — G, endoplasma reticulum — ER, lisosome — L). Według autora GERL stanowi wyspecjalizowaną część siateczki śródplazmatycznej syntetyzującą lizosomy. Kryterium, na podstawie którego odróżnia się GERL od sąsiadujących układów błoniastych, stanowi dodatnia reakcja na fosfatazę kwaśną (Novikoff 1976; Novikoff, Novikoff 1977) przy braku reakcji na TPP-azę (Novikoff 1963, 1965; Novikoff, Yam 1978). Taką interpretację GERL można jednak odnieść tylko do niektórych neuronów i komórek sekrecyjnych (Novikoff 1976; Novikoff, Novikoff 1977; Pino i wsp. 1981). W wielu bowiem neuronach i komórkach sekrecyjnych nie stwierdza się połączeń między kanałami siateczki śródplazmatycznej i GERL. Co więcej badania enzymatyczne wskazują na to, iż rola GERL jako jedyne go prekursora lizosomów jest wątpliwa.

W świetle ostatnich badań histoenzymatycznych, autoradiograficznych i immunologicznych, wskazujących na zmienność rozmieszczenia markerów kompleksu Golgiego i GERL w komórkach sekrecyjnych, można mówić raczej o ścisłym związku GERL z błonami kompleksu

Golgiego niż z siateczką ziarnistą ER (Oliver i wsp. 1979, 1980; Hand 1980; Farquhar, Palade 1981; Oliver, Hand 1983; Broadwell, Oliver 1983; Pavelka, Ellinger 1982, 1983; Hand, Oliver 1984; Ellinger, Pavelka 1984). Ostatnie badania wykazały, że w neuronach podwzgórza produkujących wazopresynę (Dyball 1971; Gainer i wsp. 1977; George 1976; Broadwell, Oliver 1981) oraz w wielu innych komórkach produkujących ziarnistości sekrecyjne (Smith, Farquhar 1970; Oliver i wsp. 1980; Oliver, Hand 1983; Doine i wsp. 1984) w warunkach stymulacji obserwuje się aktywność TPP-azy nie tylko w błonach po stronie „trans” kompleksu Golgiego, lecz również w zbiornikach GERL oraz w pęcherzykach wykazujących połączenia z GERL. W tym samym czasie, kiedy aktywność TPP-azy wzrasta, maleje aktywność fosfatazy kwaśnej w tym regionie. Autorzy sądzą, że fosfataza kwaśna, znajdująca się w GERL, służy raczej do modyfikacji białek sekrecyjnych niż jako enzym lizosomalny w komórkach sekrecyjnych (Brandan, Fleischer 1982). Omawiana powyżej zmienność rozmieszczenia enzymów dostarcza dowodów na to, że zbiorniki GERL wywodzą się i prawdopodobnie mają łączność z błonami „trans” kompleksu Golgiego niż ER.

Wielu autorów nadal stoi na stanowisku, iż podstawową funkcją GERL jest formowanie lizosomów, mimo że ostatnie badania histochemiczne wskazują na większy związek lizosomów pierwotnych z ER niż GERL (Oliver, Hand 1983; Oliver 1984). W komórkach sekrecyjnych niewykluczona jest także produkcja ziarnistości sekrecyjnych przez GERL. Właściwe jednak określenie GERL ze względu na jego unikalną strukturę i cytochemiczną charakterystykę, zwłaszcza w neuronach sekrecyjnych, powinno być definiowane jako: system błon gładkich wywodzących się z błon strony „trans” kompleksu Golgiego (G), którym towarzyszą zmodyfikowane kanały siateczki ziarnistej (ER), z której lizosomy (L) mogą powstawać.

UZASADNIENIE I CEL PRACY

Neurony sekrecyjne jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza produkują hormony białkowe, wazopresynę i oksytocynę równocześnie z towarzyszącymi im nośnikami białkowymi — neurofizynami, somatostatynami oraz endorfinami (Brownstein i wsp. 1980; Schmale, Richter 1981; Ruppert i wsp. 1984). Dane biochemiczne (Sachs i wsp. 1969; Camier i wsp. 1973; Gainer i wsp. 1977; Eipper, Main 1978; Nakanishi i wsp. 1979; Lauber i wsp. 1979), autoradiograficzne (Nishioka i wsp. 1970; Vandesande, Dierickx 1975; Swaab i wsp. 1975) i immunocytochemiczne (Broadwell i wsp. 1979; Swanson, Knypers 1980; Armstrong 1980; Rhodes i wsp. 1981) potwierdzają procesy sekrecyjne wewnątrz neuronów peptyderygicznych układu podwzgorzowo-przysadkowego. Te wszystkie badania nie dostarczają jednak dowodów precyzyjnych jasno

rolę zarówno kompleksu Golgiego, jak i GERL w procesach sekrecji. Do tej pory nie wykazano jednoznacznie, czy zbiornik GERL jest morfologicznie i funkcjonalnie różny od pozostałych zbiorników kompleksu Golgiego oraz jakie ma pochodzenie.

Odpowiedź na różne czynniki stosowane do stymulacji procesów sekrecyjnych neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego wydawały się odpowiednim modelem dla rozważenia związku między kompleksem Golgiego i GERL oraz dla określenia jego roli w procesie powstawania ziarnistości neurosekrecyjnych. Nieprzypadkowo więc zastosowano szeroki wachlarz bodźców, spodziewając się modyfikacji w obrazach morfologicznych kompleksu Golgiego. Zastosowano trzy grupy czynników wywołujących reakcje badanych neuronów: 1) czynniki hormonalne, 2) czynniki chemiczne, 3) czynniki fizyczne.

Stosując czynniki hormonalne wybrano te spośród hormonów, które są bezpośrednio zaangażowane w regulację czynności hormonalnej układu podwzgórzowo-przysadkowego (ACTH, wazopresyna, brak hormonów nadnerczy, estradiol). Stosowanie kolchicyny, cykloheksymidu i alkoholu — czynników chemicznych, których wpływ na odpowiednie struktury komórkowe i ich funkcje jest znany i niewątpliwy (kolchicyna — hamuje przepływ aksonalny, cykloheksymid — inhibitor syntezy białek, alkohol — stymuluje sekrecję w układzie podwzgórzowo-przysadkowym), miało na celu prześledzenie różnic morfologicznych kompleksu Golgiego.

Morfologiczne modulacje kompleksu Golgiego obserwowano również stosując czynniki fizyczne (unieruchomienie, odwodnienie, hipotermia). Czynniki te były niejednokrotnie sumą bodźców stresowych oraz hormonalnych prowokując reakcję badanych neuronów sekrecyjnych.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenia prowadzono na 3-miesięcznych szczurach szczepu Wistar z hodowli losowej, obu płci. Masa ciała zwierząt wynosiła od 200 do 300 g.

Do badań morfologicznych w mikroskopie elektronowym pobierano od zwierząt doświadczalnych, zawsze łącznie ze zwierzętami kontrolnymi, wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego, prowadząc je dalej metodą rutynową odpowiednią dla mikroskopu elektronowego. Preparaty oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A i fotografowano na kliszach ORWO, EU 2. Zdjęcia neuronów sekrecyjnych (SO i PV) wykonywano z 4 kolejno skrawanych preparatów SO i PV (około 24 zdjęć z każdego badanego zwierzęcia).

Zastosowano trzy grupy czynników wpływających na syntezę i sekrecję ziarnistości neurosekrecyjnych w badanych neuronach: A — hormonalne; B — chemiczne; C — fizyczne.

A. Czynniki hormonalne

1. Nadczynność nadnerczy wywoływano podawaniem ACTH. Doświadczenie wykonano na 35 szczurach, które podzielono na dwie grupy: grupa I — zwierzęta zdrowe (10 szczurów); grupa II — zwierzęta zdrowe, którym podano jednorazowo, podskórnie 1 j.m. ACTH (25 szczurów). Tkanekę do badań pobierano po 1, 6, 12, 24 i 48 godzinach po wstrzyknięciu ACTH.

2. Niedoczynność nadnerczy uzyskano wykonując adrenalectomię. Doświadczenie wykonano na 50 szczurach, w trzech grupach: grupa I — 30 zwierząt po obustronnej adrenalectomii. Obustronną adrenalectomię wykonywano zawsze w godzinach rannych w narkozie eterowej z cięć przykręgosłupowych. Tkanekę do badań pobierano po 6, 12, 24 i 48 godzinach oraz 3, 5 i 6 dniach po zabiegu; grupę II stanowiło 10 zwierząt zdrowych (kontrola); grupę III stanowiło 10 zwierząt poddanych operacji pozornej bez usuwania nadnerczy. Badano je po 6, 24 i 48 godzinach oraz 6 dniach po zabiegu.

3. Podanie egzogennej wazopresyny. Badania wykonano na 17 szczurach. U 9 zwierząt wykonano oznaczenia poziomu wazopresyny we krwi metodą biologiczną (wg Szczepańskiej-Sadowskiej i Sadowskiego), w tym u 3 zwierząt w 30 minut po podaniu 50 uU wazopresyny; u 3 — w 90 minut po podaniu 100 uU wazopresyny; oraz u 3 zwierząt kontrolnych.

Do badań mikroskopowo-elektronowych przeznaczono 8 zwierząt, którym podano do żyły ogonowej 50 uU wazopresyny w 0,5 ml fizjologicznego roztworu NaCl. W 30 minut po iniekcji pobierano wycinki z SO i PV.

4. Podawanie estradiolu. Doświadczenie przeprowadzono na 5 samicach zdrowych oraz na 20 samicach pozbawionych operacyjnie obu jajników 21 dni przed eksperymentem, zakładając, iż jest to odpowiedni czas na usunięcie resztek estradiolu produkowanego przez jajniki. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupa I — zwierzęta zdrowe (5 szczurów); grupa II — zwierzęta owarietomizowane (10 szczurów); grupa III — zwierzęta owarietomizowane, którym wstrzyknięto po 21 dniach jednorazowo 0,2 μ g 17-estradiolu (10 szczurów). Iniekcję wykonano w okolicę skrzyżowania nerwów wzrokowych według metody Lindberga i Ernesta (1950). Wycinki z SO i PV pobierane były 4 godziny po iniekcji, równolegle pobierano wycinki z SO i PV od zwierząt zdrowych i owarietomizowanych.

B. Czynniki chemiczne

1. Alkohol. Doświadczenie przeprowadzono na 12 szczurach samcach: 10 szczurom podawano do picia wodny roztwór alkoholu etylowego zamiast wody, 2 stanowiły kontrolę. Stężenie alkoholu w wodzie zwiększane co tydzień, począwszy od 2,5% w pierwszym tygodniu do 25% w os-

tatnim tygodniu doświadczenia. Od 8 do 12 tygodnia poza 25% roztworem alkoholu etylowego podawanego do picia, 3 razy w tygodniu wprowadzano dożołądkowo sondą 42% roztwór alkoholu etylowego w ilości 10 ml/1 kg masy ciała. Po 12 tygodniach szczury dekapitowano i pobierano do badań wycinki z SO i PV.

2. Kolchicina. Doświadczenie przeprowadzono na 25 szczurach samcach, którym w okolicę skrzyżowania nerwów wzrokowych podano jednorazowo 100 µg kolchicyny w 0,05 ml roztworu soli fizjologicznej według metody Lindberga i Ernesta (1950). Materiał do badań pobierano od zwierząt doświadczalnych po 4, 6, 12 i 24 godzinach oraz po 48 godzinach od ostatniej iniekcji, łącznie ze zwierzętami kontrolnymi (5 sztuk), którym podawano według tej samej metody 0,05 ml roztworu soli fizjologicznej.

3. Cycloheksymid. Doświadczenie przeprowadzono na szczurkach owariektomizowanych 21 dni przed eksperymentem. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Grupa I — 5 zwierząt zdrowych; grupa II — 5 zwierząt owariektomizowanych; grupa III — 5 zwierząt owariektomizowanych z iniekcją cycloheksymidu. Antymetabolit chemiczny wstrzyknięto jednorazowo, w okolicę skrzyżowania nerwów wzrokowych według metody Lindberga i Ernesta (1950). Cztery godziny po iniekcji materiał z SO i PV pobierano do badania.

C. Czynniki fizyczne

1. Unieruchomienie. Doświadczenie przeprowadzono na 18 samcach w dwóch grupach. Grupa I — 10 szczurów, każde zwierzę na okres dwóch dni umieszczano w ciasnym drucianym pancerzu, całkowicie eliminującym ruch z wyjątkiem nieznacznych ruchów głowy dla przyjmowania pokarmu. Pozostałe 8 zwierząt — grupa II — stanowiło kontrolę. Do badań pobierano wycinki z SO i PV.

2. Odwodnienie przez niepodawanie wody. Doświadczenie wykonano na 55 szczurach samcach od maja do czerwca przy średniej temperaturze powietrza 24,6°C i średniej wilgotności powietrza 72%. Szczury żywiono mieszanką standardową LSM (Bacutil) oraz pozbawiono całkowicie wody do picia. Szczury dekapitowano w lekkiej narkozie eterowej po 3, 7, 9 i 12—13 (stan agonalny) dobach po zaprzestaniu podawania wody do picia oraz pobierano wycinki z SO i PV.

3. Hipotermia. Doświadczenie wykonano na 20 szczurach samcach w okresie zimowym (grudzień—styczeń). 15 szczurów pozostających normalnie w temperaturze pokojowej (+20°C) poddano nagłemu oziębieniu (-18°C) przez 40 minut. Po 40 minutach wszystkie szczury dekapitowano równocześnie ze szczurami kontrolnymi. Do badań pobrano wycinki z SO i PV.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Na podstawie obserwacji morfologicznych mikroskopowo-elektronowych można sądzić, że w stymulowanych neuronach jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) następuje wzmożona synteza, formowanie i wydzielanie białek sekrecyjnych. Stosowanie czynników wpływających w różny sposób na syntezę neurosekreту oraz jego wydzielanie wydaje się pomocne dla analizy ultrastruktury kompleksu Golgiego w badanych neuronach podwzgórza.

Opierając się na własnych spostrzeżeniach morfologicznych można przypuszczać, że w warunkach stymulacji neuronów SO i PV transport białek sekrecyjnych z siatki śródplazmatycznej ziarnistej (ER) może odbywać się trzema drogami:

— za pomocą pęcherzyków transportujących do zbiorników kompleksu Golgiego;

— bez udziału pęcherzyków transportujących, bezpośrednio kanałami ER do zbiorników kompleksu Golgiego, co zostało zaobserwowane w grupach doświadczalnych z unieruchomieniem i hipotermią;

— bezpośrednio z kanałów ER do cytoplazmy, co zostało zaobserwowane w następujących grupach doświadczalnych: odwodnienie, unieruchomienie, adrenalectomia, estradiol.

Na podstawie własnych obserwacji morfologicznych oraz nielicznych doniesień immunocytochemicznych (Geuze i wsp. 1979; Geuze, Slot 1980; Slot, Geuze 1983) można przypuszczać, że w niektórych neuronach koncentracja białek możliwa jest również po stronie „cis” kompleksu Golgiego, a nie jak dotąd przypuszczano głównie po stronie „trans” kompleksu Golgiego lub w wakuolach kondensujących. W warunkach wzmożonej aktywności neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego w grupach doświadczalnych z odwodnieniem, unieruchomieniem, adrenalectomią i estradiolem obserwowano przechodzenie materiału sekrecyjnego z kanałów ER na zewnątrz w postaci nieobłonionych form amorficznych. Można więc przypuszczać, że w tych neuronach istnieje również transport form sekrecyjnych — nieobłonionych.

Obserwacje własne, a także innych autorów (Zambrano i wsp. 1974; Palade 1975; Benjamin 1978) wykazały olbrzymią proliferację ER w stymulowanych neuronach SO i PV. We wszystkich neuronach obecna była bogato rozwinięta siateczka śródplazmatyczna ziarnista. Liczne jej kanały, gęsto pokryte rybosomami, często wypełnione były substancją homogeną o średniej gęstości elektronowej lub materiałem kłaczkowatym. W warunkach stymulacji neuronów hormonami (estradiol) spotykano koncentryczne układy siateczki zawierające w centrum ziarnistości neurosekrecyjne. Ten rodzaj hipertrofii ER w komórkach sekrecyjnych opisywany był przez wielu autorów (Brawer 1971; Price i wsp.

1976; Nishizuka 1978) i interpretowany jako normalny, związany z intensywnym tworzeniem białek hormonalnych. Oprócz koncentrycznych układów spotykano również w wielu neuronach (w grupach doświadczalnych po adenalektomii, w unieruchomieniu i po odwodnieniu) równoległe układy ER, tzw. ribbon-formation.

Podsumowując wyniki badań własnych w świetle danych z literatury jest jasne, że wewnątrzkomórkowy transport syntetyzowanych białek w stymulowanych neuronach SO i PV zachodzić może dwoma drogami:

1) białka sekrecyjne syntetyzowane na polirybosomach ER są wydzielane w formie amorficznej lub obłonionych pęcherzyków bezpośrednio z kanałów ER z pominięciem zbiorników kompleksu Golgiego;

2) białka sekrecyjne po syntezie transportowane są zwykłą drogą do kompleksu Golgiego, w którym proces dojrzewania i uwalniania ziarnistości jest prawdopodobnie przyspieszony.

Rola kompleksu Golgiego w koncentracji, przetwarzaniu i opakowywaniu białek sekrecyjnych nie przedstawia wątpliwości. Nieznane są natomiast mechanizmy i miejsca, w których następuje sortowanie materiału sekrecyjnego. We wszystkich komórkach sekrecyjnych największym problemem do rozwiązania jest możliwość oddzielenia miejsc syntezy białek sekrecyjnych od białkowych enzymów lizosomalnych.

W 1964 r. Novikoff i wsp. stwierdzili obecność kwaśnej fosfatazy w zbiornikach znajdujących się po stronie „trans” kompleksu Golgiego, zwykle usytuowanej w pewnej od niego odległości; nazwali je GERL. Zbiornik GERL może wykazywać łączność z siateczką śródplazmatyczną ziarnistą. Autorzy ci sądzą, że enzymy lizosomalne tworzone w ER są opakowywane w zbiornikach GERL z pominięciem pozostałych zbiorników kompleksu Golgiego. W ten sposób tworzą się lizosomy pierwotne. Obecnie wiadomo, że fosfataza kwaśna występuje również w zbiornikach po stronie „trans” kompleksu Golgiego, i nawet częściej niż w GERL (Hand 1980). Wiadomo również, że nie zawsze fosfataza kwaśna jest markerem lizosomów (Farquhar 1978). W zbiornikach GERL wykryto także obecność białek sekrecyjnych (Novikoff i wsp. 1971, 1977; Hand, Oliver 1977; Broadwell, Oliver 1981). Według wyżej wymienionej koncepcji białka sekrecyjne pochodziłyby także z ER i przechodziły do GERL z pominięciem kompleksu Golgiego. Ta koncepcja jednak nie była poparta badaniami autoradiograficznymi.

Nigdy też nie udało się stwierdzić, czy GERL jest morfologicznie i funkcjonalnie różna od kompleksu Golgiego (Novikoff 1973, 1976; Novikoff, Novikoff 1977), czy też jest jego częścią (Inone, Kurosumi 1977; Morré i wsp. 1974; Whaley i wsp. 1972; Broadwell, Oliver 1981).

Stymulowane neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego wydawały się dobrym modelem do badania stosunku między GERL a kompleksem Golgiego i ich roli w produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe wykazały co następuje:

- ze zbiornikiem GERL łączą się pęcherzyki transportujące,
- w zbiorniku GERL tworzą się ziarnistości sekrecyjne,
- od zbiornika GERL odrywają się pęcherzyki opłaszczone.

Wcześniej udowodniono, że pęcherzyki opłaszczone przenoszą enzymy hydrolityczne z kompleksu Golgiego do lizosomów (Friend, Farquhar 1967; Nichols i wsp. 1971). Nie istnieje przeto funkcjonalne zróżnicowanie między GERL a kompleksem Golgiego, natomiast istnieje między nimi strukturalny i funkcjonalny związek.

Spostrzeżenia te stanowią potwierdzenie dla badań cytochemicznych (Hand, Oliver 1977; Broadwell, Oliver 1981; Swano, Fuita 1981; Kurosumi, Inone 1983; Oliver, Hand 1983). Przeprowadzone ostatnio badania wykazały w komórkach neurosekrecyjnych podobną funkcję kompleksu Golgiego i GERL oraz ściśle ich powiązanie.

Własne spostrzeżenia morfologiczne potwierdzają również istnienie strukturalnych połączeń GERL z ER (można obserwować je w grupach doświadczalnych w odwodnieniu i hipotermii). Ustalenie ścisłego związku między GERL a lizosomami w stosowanych tu metodach jest niemożliwe. Wydaje się jednak, że GERL jest zaangażowane w tworzenie ziarnistości sekrecyjnych oraz pęcherzyków opłaszczonych.

Pęcherzyki opłaszczone mogą zawierać fosfatazę kwaśną, lecz nie jest jasne, czy są to lizosomy. Przypuszcza się, że w pęcherzykach opłaszczonych fosfataza kwaśna nie działa jako enzym lizosomalny, lecz funkcja jej polega na modyfikacji białek sekrecyjnych (Oliver, Hand 1983; Brandan, Fleischer 1982). Według Oliver (1983), Bainton (1981), Novikoff (1972) małe, opłaszczone pęcherzyki, pochodzące z GERL reprezentują w wielu komórkach lizosomy pierwotne.

W warunkach hipotermii w wielu spotykanych przez nas neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego udało się obserwować bezpośrednie połączenia między ER a lizosomami, co rzuca światło na ich pochodzenie. Podobne, ściśle połączenia między ER i lizosomami opisał Oliver (1983) w komórkach trzustki.

Obserwując neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego stwierdzano przeważnie dużą ilość zarówno lizosomów pierwotnych, jak i wtórnych. Rola tych organelli w neuronach sekrecyjnych jest szczególnie doniosła, są one bowiem ściśle związane z regulacją procesów neurosekrecyjnych (Morris, Nordman 1979; Boudier i wsp. 1979) przez tzw. crinophagy, proces rozpuszczania ziarnistości sekrecyjnych w perikarionach, oraz granulolizę, proces zachodzący w aksonie lub zakończeniach nerwowej części przysadki odbywający się w wakuolach autofagowych. Wydaje się, że w warunkach wzmożonej aktywności sekrecyjnej w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego następuje równolegle z syntezą białek sekrecyjnych wzmożona synteza białek lizosomalnych. Część białek lizosomalnych może bezpośrednio z siateczki śródplazmatycznej formować lizosomy, część zaś przechodzi przez błony

kompleksu Golgiego, gdzie po stronie „cis” markerem ich jest mannosylfosfataza (Pohlmann i wsp. 1982) aż do lizosomów (Sly, Fischer 1982; Slot, Geuze 1983).

W warunkach wzmożonej aktywności neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego może dochodzić do formowania białek sekrecyjnych w każdym zbiorniku kompleksu Golgiego. Na poziomie każdego z nich białka sekrecyjne przyjmują postać ziarnistości obłonionych. Dotyczy to w równej mierze zbiorników GERL. W stanach wzmożonej aktywności neuronów formowanie i wydzielanie białek sekrecyjnych może następować również bezpośrednio z siateczki śródplazmatycznej ziarnistej do cytoplazmy, gdzie białka te występują w postaci nieobłonionej.

WNIOSKI

Obserwacje morfologiczne, mikroskopowo-elektronowe wykazały, że w neuronach jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego w warunkach stymulacji:

1. Cały kompleks Golgiego, tzn. każdy z jego zbiorników bierze udział w formowaniu, opakowywaniu i w wydzielaniu ziarnistości neurosekrecyjnych.

2. Zbiornik GERL wykazujący niekiedy połączenia z siateczką śródplazmatyczną ziarnistą ma te same możliwości; można więc sądzić, że morfologicznie i funkcjonalnie jest jego częścią.

3. Transport białek z siateczki śródplazmatycznej ziarnistej do zbiorników kompleksu Golgiego odbywać się może w dwojaki sposób — za pomocą pęcherzyków transportujących oraz kanałami łączącymi siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą z kompleksem Golgiego.

4. Mimo że zasadniczym elementem cytoplazmy biorącym udział w formowaniu ziarnistości neurosekrecyjnych jest kompleks Golgiego, to jednak przy zwiększonej syntezie neurosekretu można obserwować formowanie się tych ziarnistości również w siateczce śródplazmatycznej ziarnistej z pominięciem kompleksu Golgiego.

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

Изабела Климович-Млодзик, Влодзимеж Писарски, Малгожата Сасиновска, Мечислав Сьмялэк: Уровень гамма-аминомасляной кислоты (GABA) и гомованилиновой кислоты (HVA) в спинномозговой жидкости у больных эпилепсией	419
Эльжбета Кида, Крыстына Ренкавек, Мечислав Сьмялэк: Протяженное повреждение структур ствола головного мозга в случае острой формы болезни Вильсона	433
Барбара Гайковска: Комплекс Гольджи в стилированных секреторных нейронах гипоталамуса крысы (Изложение диссертации на звание доцента)	445

CONTENTS

Urszula Rafałowska, Anna Pastuszko: Carboxymethylation of proteins and their role in the regulation of neurosecretion	273
Jerzy Dymecki, Olgierd Puciłowski, Wanda Dyr, Danuta Markiewicz, Maciej Póltorak, Wojciech Kostowski, Mirosław Hauptmann, Barbara Lipińska: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. III. Results of behavioural and biochemical investigations	287
Grażyna Szumańska, Mirosław J. Mossakowski: Adenylate cyclase and alkaline phosphatase activity in the cerebral blood vessels of the rat in manganese chloride intoxication	297
Barbara Gajkowska, Anna Zaręba-Kowalska: The effect of lithium on cultured nervous tissue	315
Anna Zaręba-Kowalska, Jerzy Borowicz: The effect of hyperthermia on the ultrastructure of the gigantocellular reticular region in the rabbit	335
Barbara Gajkowska: Reaction of the supraoptic and paraventricular nuclei of the rabbit hypothalamus to hyper- and hypothermia	353
Mirosław J. Mossakowski, Jerzy Borowicz: Early electron-microscopic changes in hepatogenic encephalopathy induced by thioacetamide intoxication in rats	375
Halina Kroh: Multifocal neoplasms of the nervous system induced with ethylnitrosourea in Wistar rats	389
Halina Weinrauder: Localization of glutamine synthetase in astrocytes <i>in vitro</i>	411
Izabela Klimowicz-Młodzik, Włodzimierz Pisarski, Małgorzata Sasinowska, Mieczysław Śmiałek: Gamma-aminobutyric acid (GABA) and homovanillic acid (HVA) levels in cerebrospinal fluid of epileptic patients	419
Elżbieta Kida, Krystyna Renkavек, Mieczysław Śmiałek: Brain stem damage in acute form of Wilson's disease	433
Barbara Gajkowska: Golgi Complex in stimulated secretory neurons of the rat hypothalamus	445

SPIS TREŚCI

Urszula Rafałowska, Anna Pastuszko: Karboksymetylacja białek i jej rola w regulacji procesów neurosekrecji	273
Jerzy Dymecki, Olgierd Puciłowski, Wanda Dyr, Danuta Markiewicz, Maciej Póltorak, Wojciech Kostowski, Mirosław Hauptmann, Barbara Lipińska: Wyniki domózgowych transplantacji niedojrzałej istoty czarnej u szczurów z doświadczalnie wywołaną chorobą Parkinsona. III. Badanie zachowania rotacyjnego zwierząt oraz badanie biochemiczne	287
Grażyna Szumańska, Mirosław J. Mossakowski: Aktywność cykazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganawym	297
Barbara Gajkowska, Anna Zaręba-Kowalska: Wpływ litu na tkankę nerwową w hodowli <i>in vitro</i>	315
Anna Zaręba-Kowalska, Jerzy Borowicz: Wpływ hipertermii na ultrastrukturę obszaru olbrzymiokomórkowego w tworze siatkowatym mózgu królika	335
Barbara Gajkowska: Reakcja jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza królika na przegrzanie i oziębienie organizmu	353
Mirosław J. Mossakowski, Jerzy Borowicz: Wczesne zmiany mikroskopowo-elektronowe w encefalopatii wątrobowej wywołanej zatruciem tioacetamidem	375
Halina Kroh: Mnogie nowotwory tkanki nerwowej szczura wywołane etylnitrozomocznikiem	389
Halina Weinrauder: Lokalizacja syntetazy glutaminowej w astrocytach <i>in vitro</i>	411
Izabela Klimowicz-Młodzik, Włodzimierz Pisarski, Małgorzata Sasinowska, Mieczysław Śmiałek: Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i kwasu homowanilionowego (HVA) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z padaczką	419
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Mieczysław Śmiałek: Rozległe uszkodzenie struktur pnia mózgu w przypadku ostrej choroby Wilsona	433
Barbara Gajkowska: Kompleks Golgiego w stymulowanych neuronach sekrecyjnych podwzgórza szczura (Streszczenie pracy habilitacyjnej)	445

СОДЕРЖАНИЕ

Уршуля Рафаловска, Анна Пастушко: Карбоксиметилация белков и ее роль при регуляции процессов нейросекреции	273
Ежи Дымецки, Ольгерд Пуциловски, Ванда Дыр, Данута Маркевич, Мацей Пулторак, Войцех Костовски, Барбара Липиньска: Результаты внутримозговых трансплантаций незрелого черного вещества у крыс с экспериментально вызванной болезнью Паркинсона. III. Исследование ротационного поведения животных и биохимические исследования	287
Гражина Шуманьска, Мирослав Я. Моссаковский: Активность адениловой циклазы и щелочной фосфатазы в сосудах головного мозга крысы в экспериментальном отравлении хлористым марганцем	297
Барбара Гайковска, Анна Заремба-Ковальска: Влияние лития на нервную ткань в культуре	315
Анна Заремба-Ковальска, Ежи Борович: Влияние гипертермии на ультраструктуру гигантоклеточной области в сетевидном образовании головного мозга кролика	335
Барбара Гайковска: Реакция надзрительного ядра и околожелудочкового ядра гипоталамуса кролика на гипертермию организма	353
Мирослав Я. Моссаковский, Ежи Борович: Ранние электронно-микроскопные изменения в печеночной энцефалопатии вызванной отравлением тиоацетамидом	375
Халина Крох: Множественные опухоли нервной ткани крысы вызванные этилнитрозомочевинной	389
Халина Вейнраудер: Локализация глутаминсинтетазы в культивируемых астроцитах	411