

p. 185

422 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 25

248, DWON

1987

ZESZYT 4

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 25

1987

ZESZYT 4

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓLPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mirosław 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, 49-54-10

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo, Wrocław 1988.
Nakład: 600 egz. Objętość: ark. wyd. 15,40; ark. druk. 12,63, ark.
A₁-17. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, B-1. Oddano do składania
1987.09.29. Podpisano do druku 1988.03.20. Druk ukończono w kwiet-
niu 1988. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 486/87. C-12.
Cena zł 180,—



ANNA TARASZEWSKA, IRMINA B. ZELMAN

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF GLIA IN PT RABBIT DURING MYELINATION

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

Our previous study of pt rabbit revealed some differences in the light microscopic pattern of glial cell populations between this mutant and normal rabbits of the same age (Zelman, Taraszewska 1984). These differences are very pronounced in the period of myelination and consist in an increased density of glial cells, protracted myelination gliosis and hypertrophic astrogliosis.

The subject of this study was electron microscopic evaluation of this morphological features of glia in the pt mutant in comparison with the glia in control rabbits in various myelination periods.

The study was undertaken on the same structures as in previous ultrastructural and quantitative investigations of myelination in the pt mutant (Taraszewska 1983; Taraszewska, Zelman 1985, 1986), i.e., on dorsal funiculi of the spinal cord, optic nerves, and corpus callosum. These structures differ in time and rate of myelin development. The earlier myelinating structures are dorsal funiculi of the spinal cord. In normal rabbits myelin appears already 2 days before birth and rapidly increases during two weeks of postnatal life (Dekaban 1956). In optic nerves of normal rabbits myelination occurs in the first postnatal week and is more intensive during the first month of life (Wender et al. 1979; Śniatała-Kamasa 1982; Taraszewska, Zelman 1985). Myelination of corpus callosum begins late in postnatal life, around the 14th day of age and progresses during the second month of life (Dąbbska, Danielewicz-Kotowicz 1978; Taraszewska, Zelman 1986).

In the pt mutant myelination of respective structures develops in the same sequence, but is retarded and prolonged as compared with controls (Zelman, Taraszewska 1984; Taraszewska, Zelman 1985, 1986).

MATERIAL AND METHODS

The study was performed on the pt mutants and control rabbits, at the age of 2, 8, 14, 28, 90 postnatal days and on adults. In each age group at least two pt rabbits and 2 control animals were used for electron microscopic examination.

The animals were perfused through the aorta ascendens with solution of 3.9% glutaraldehyde in 0.4 M phosphate buffer (pH 7.6). Small blocks from the intracranial portion of optic nerves, middle portion of anterior part of corpus callosum and dorsal funiculi of cervical spinal cord were dissected, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol and propylene oxide and embedded in Epon. Semithin Epon sections were stained with toluidine blue for light microscopic survey. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and studied in a JEM 100B electron microscope.

RESULTS

Period prior to the onset of myelination

The glial cells were examined on the cross-section of the optic nerves from 2-day-old and of the corpus callosum from 14-day-old rabbits. In both structures at this time the axons are unmyelinated except for

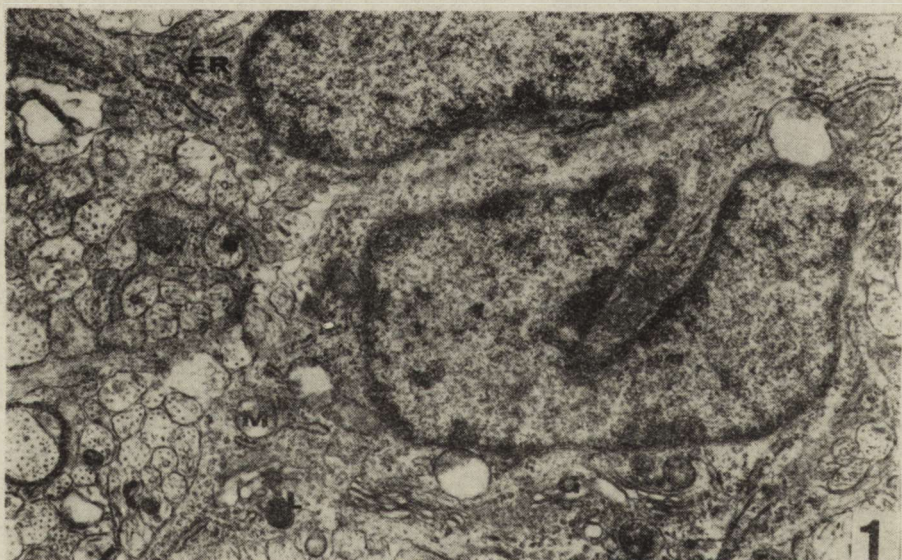


Fig. 1. Optic nerve of 2-day-old control rabbit. Two young astrocytes with light cytoplasm rich in organelles. There are well developed Golgi apparatus (G), long cisternae of granular endoplasmic reticulum (ER), many rosettes of ribosomes, mitochondria (M), lysosomes (L). $\times 12\ 700$

Ryc. 1. Nerw wzrokowy 2-dniowego królika kontrolnego. Dwa młode astrocyty z jasną cytoplazmą bogatą w organelle. Widoczny dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G), długie kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER), liczne rozetki rybosomów, mitochondria (M), lizosomy (L). Pow. 12 700 \times

single myelinated ones with diameter larger than 1 μm . Glial cells in different stages of development, mainly glioblasts, young or immature astrocytes and oligodendroblasts were encountered.

In pt rabbits and in controls, the glioblasts were identified by their oval or elongated nuclei with chromatin aggregates distributed beneath the nuclear envelope and throughout the nucleus. Nucleoli were seldom visible. The cytoplasm appeared rather scanty and contained many free ribosomes, but few other organelles. The glioblasts characterized by the presence of a few wide cisternae of granular endoplasmic reticulum, dense bodies and mitochondria with light matrices seemed to be developing astrocytes. In pt rabbits glioblasts occurred more frequently than in controls.

Young astrocytes in control rabbits were characterized by enlarged perikaryal cytoplasm of lucent appearance extending into processes, with

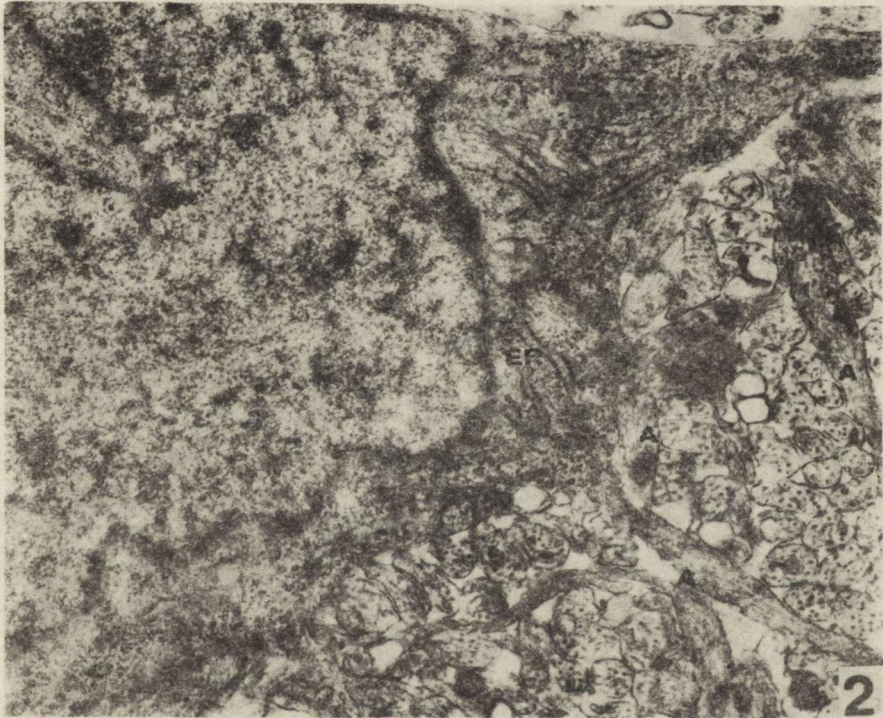


Fig. 2. Optic nerve of 2-day-old pt rabbit. Young astrocyte with cytoplasm of increased electron density containing many free ribosomes. ER — granular endoplasmic reticulum. Nucleus with irregular outline. Numerous astrocytic processes (A) filled with microfilaments and microtubules are seen in the neighbourhood. $\times 17\,400$

Ryc. 2. Nerw wzrokowy 2-dniowego królika pt. Młody astrocyt z cytoplazmą o zwiększonej gęstości elektronowej, zawierającą dużą ilość wolnych rybosomów. ER — ziarnista siateczka śródplazmatyczna. Jądro o nieregularnym kształcie. W otoczeniu widoczne liczne wypustki astrocytarne (A) wypełnione mikrofilamentami i mikrotubulami. Pow. 17 400 \times

loosely scattered glial filaments and microtubules. The cytoplasm contained also Golgi complex, long cisternae of rough endoplasmic reticulum, rosettes of ribosomes, mitochondria with light matrices and a few dense bodies (Fig. 1). The nuclei exhibited a thin rim of condensed chromatin beneath the nuclear envelope and prominent nucleoli. In pt rabbits the astrocytes were distinguished by a relatively higher density of nucleoplasm and cytoplasm. Small clumps of heterochromatin were scattered throughout the nucleus and along the nuclear envelope. Nucleoli were usually present. The most characteristic features of these cells in mutants were an excessive number of branching processes and increased amount of glial filaments in the perikaryal cytoplasm and in processes (Fig. 2).

Oligodendroblasts were observed more frequently in pt rabbits than in controls. The oligodendroblasts were characterized by electron-dense cytoplasm with numerous free ribosomes arranged in rosettes, a few short cisternae of granular endoplasmic reticulum, small mitochondria and few microtubules. The chromatin was more clumped than that in astrocytes and nucleoli were present (Fig. 3).

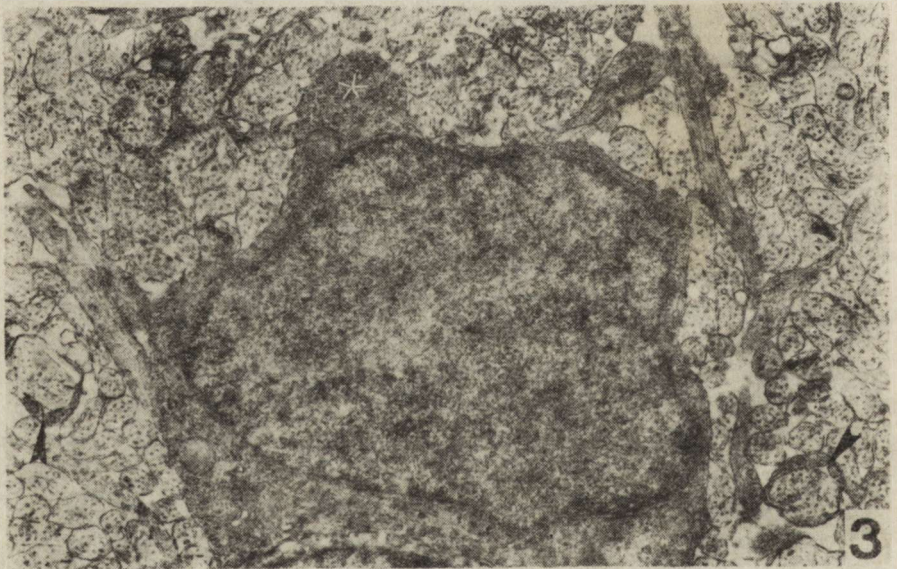


Fig. 3. Optic nerve of 2-day-old pt rabbit. An oligodendroblast. The nucleus with marked condensation of chromatin. The cytoplasm with greater electron density than the axoplasm of surrounding axons. A large cytoplasmic protrusion (asterisk) and few ensheathed axons (arrows) are indicated. $\times 14\ 770$

Ryc. 3. Nerw wzrokowy 2-dniowego królika pt. Oligodendroblast. Jądro o wyraźnie zagęszczonej chromatynie. Cytoplazma o większej gęstości elektronowej niż akso-plazma otaczających aksonów. Widoczne szerokie uwypuklenie cytoplazmy (gwiazdka) oraz kilka aksonów otoczonych cytoplazmatycznymi wypustkami (strzałki).
Pow. 14 770 \times

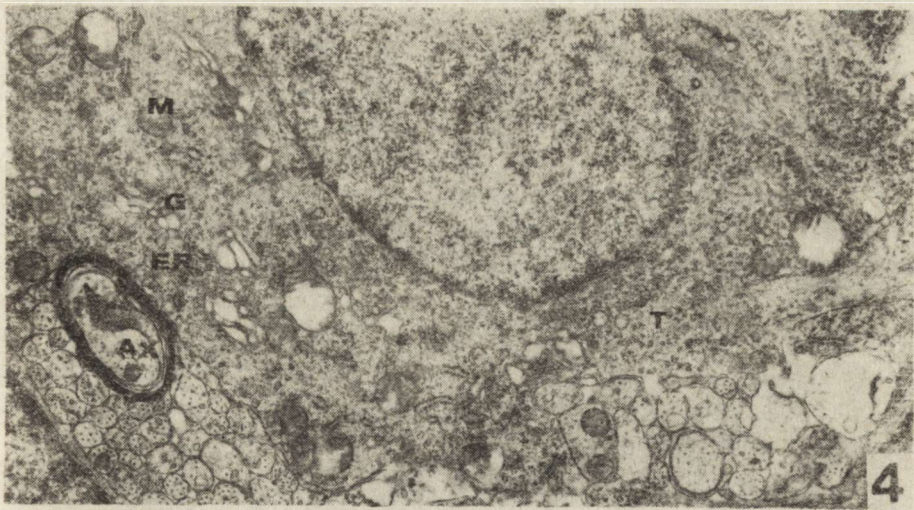


Fig. 4. Optic nerve of 2-day-old control rabbit. Fragment of light oligodendrocyte with abundant cytoplasm containing many polyribosomes, short cisternae of granular endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus (G), small mitochondria (M) and microtubules (T). The nuclear chromatin is dispersed. Ax — myelinated axon.
× 11 300

Ryc. 4. Nerw wzrokowy 2-dniowego królika kontrolnego. Fragment jasnego oligodendrocytu z obfitą cytoplazmą zawierającą liczne polirybosomy, krótkie kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER), aparat Golgiego (G), małe mitochondria (M) oraz mikrotubule (T). Chromatyna jądrowa jest rozproszona. Ax — zmielinizowany akson. Pow. 11 300 ×

More differentiated oligodendroglia with features of light oligodendrocytes were identified in control rabbits (Fig. 4). These cells had voluminous perikaryal cytoplasm rich in organelles such as well developed Golgi apparatus, many ribosomal aggregations, short cisternae of granular endoplasmic reticulum, mitochondria and microtubules. The nuclear chromatin was uniformly dispersed and a large nucleolus was located in the central part of the nucleus. In pt rabbits light oligodendrocytes were not encountered at this time.

Period of active myelination

Optic nerves and dorsal funiculi of spinal cord from animals on days 8, 14 and 28 of age and corpus callosum on day 28 of age were examined. An increasing with age number of myelinated axons was observed in both control and pt rabbits. In the optic nerve and dorsal funiculi nearly all axons, also of less than 1 μm diameter were myelinated in 28-day-old control rabbits; however, in pt mutants numerous unmyelinated axons were still present at this time.

In control material all intermediate forms of differentiated oligodendroglia, i.e., light, medium and dark oligodendrocytes could be recognized. Medium oligodendrocytes occurred most frequently. They displayed increased aggregations of chromatin along the nuclear envelope and rather denser nucleoplasm than in the light type of cells. In the cytoplasm the clusters of free ribosomes were less abundant, granular endoplasmic reticulum showed long, often stacked cisternae and the Golgi complex was prominent (Fig. 5). Dark oligodendrocytes were characterized by electron-dense cytoplasm with well developed profiles of granular endoplasmic reticulum and distended saccules of the Golgi complex. The nuclei showed large clumps of chromatin along the nuclear envelope and also in more central parts and small nucleolus located usually beneath the nuclear envelope.

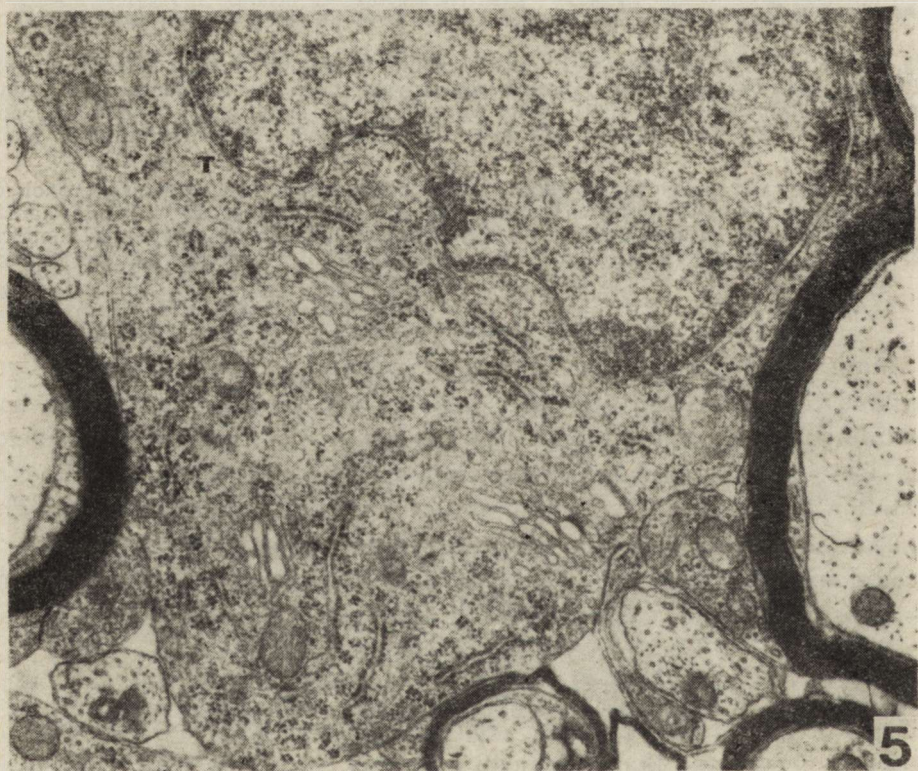


Fig. 5. Spinal cord of 8-day-old control rabbit. Fragment of medium oligodendrocyte. Nucleus with a small clumps of chromatin beneath the nuclear envelope. Cytoplasm with well developed granular endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. T — microtubules. $\times 26\ 800$

Ryc. 5. Rdzeń kręgowy 8-dniowego królika kontrolnego. Fragment pośredniego oligodendrocytu. Jądro z małymi skupieniami chromatyny pod otoczką jądrową. W cytoplazmie dobrze rozwinięta ziarnista siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego. T — mikrotubule. Pow. 26 800 \times

The astrocytes had abundant cytoplasm, rich in organelles and processes extending between the groups of nerve fibres. Loose bundles of glial filaments were scattered in the cytoplasm predominantly along the processes. Besides, small narrow astrocytic projections, surrounding separate unmyelinated axons were seen occasionally in the optic nerve of rabbits at 8—14 days of age, but were never observed in 28-day-old animals.

In the group of pt rabbits, the oligodendrocytes resembling the cells of light type in controls were most common, but usually they exhibited some abnormal features. They were characterized by voluminous cytoplasm with abundance of free dispersed ribosomes and poorly developed profiles of granular endoplasmic reticulum (Fig. 6). The cytoplasm

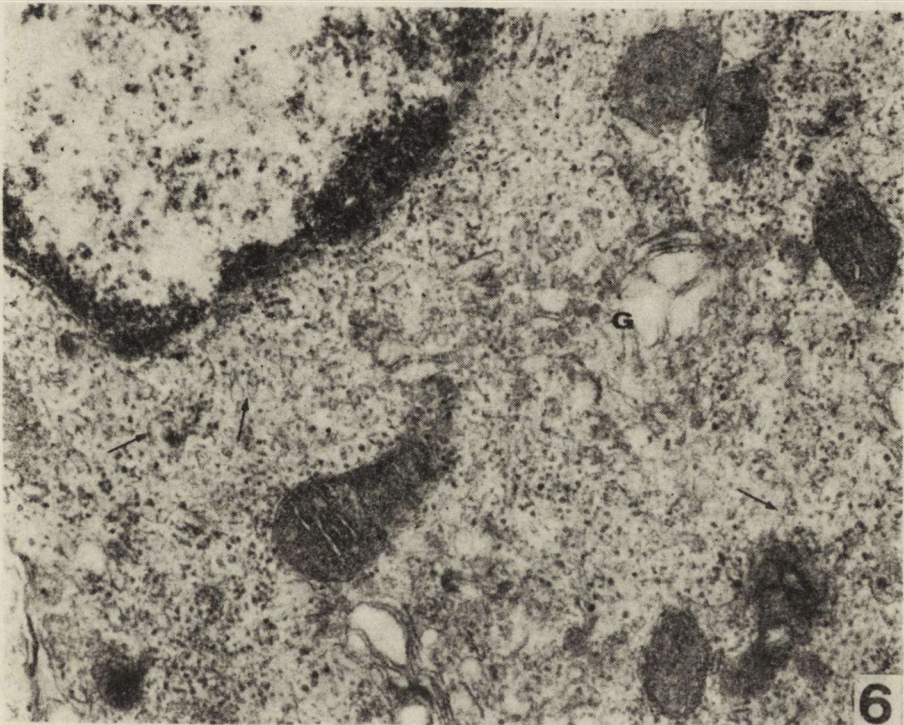


Fig. 6. Spinal cord of 28-day-old pt rabbit. Fragment of oligodendrocyte with abundant cytoplasm containing dispersed free ribosomes, mitochondria with electron-dense matrix, small profiles of smooth endoplasmic reticulum (arrows), Golgi apparatus (G). $\times 33\ 400$

Ryc. 6. Rdzeń kręgowy 28-dniowego królika pt. Fragment oligodendrocytu o obfitej cytoplazmie zawierającej rozproszone wolne rybosomy, mitochondria o elektronowo gęstej macierzy, drobne profile gładkiej siateczki śródplazmatycznej (strzałki), aparat Golgiego (G). Pow. 33 400 \times

also contained short and slender profiles of smooth endoplasmic reticulum, Golgi complex with many vesicles and distended cisternae, prominent dense mitochondria and microtubules. The cytoplasm showed higher electron-density than in normal light oligodendrocytes. The nuclei of these cells displays a variable chromatin pattern. The chromatin was either dispersed uniformly, like in normal light oligodendrocytes or much more clumped.

In the cytoplasm of some oligodendrocytes pronounced accumulation of multiple vesicles, short dilated cisterns and slender tubular profiles were visible (Fig. 7). Often, the nuclei showed large aggregations of chromatin distributed throughout the nucleus and a dilated space between the outer and inner membranes of the nuclear envelope.

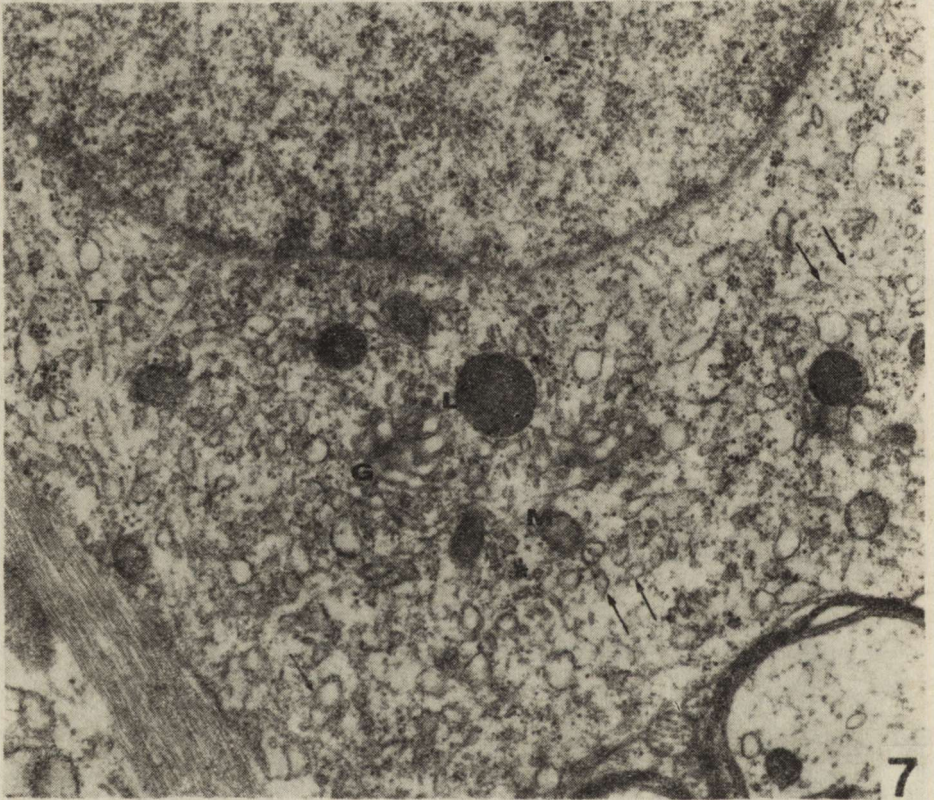


Fig. 7. Spinal cord of 28-day-old pt rabbit. Fragment of oligodendrocyte. The nuclear chromatin is loosely dispersed. Cytoplasm with accumulation of vesicles and minute tubular profiles of smooth endoplasmic reticulum (arrows). Small mitochondria (M), microtubules (T), Golgi apparatus (G) and lysosomes (L) are also present. $\times 13\ 900$

Ryc. 7. Rdzeń kręgowy 28-dniowego królika pt. Fragment oligodendrocytu. Chromatyna jądrowa jest luźno rozproszona. W cytoplazmie widoczne jest nagromadzenie pęcherzyków i drobnych kanalików gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Obecne są także małe mitochondria (M), mikrotubule (T), aparat Golgiego (G) i lizosomy (L). Pow. 13 900 \times

Occasionally, cells bearing ultrastructural features of mitosis were encountered in 14- and 28-day-old mutants. These mitotic cells were identified mostly in prophase and were characterized by an abundance of smooth-membrane vesicular and tubular profiles and dispersed free ribosomes.

The astrocytes in pt rabbits were characterized by multiple cytoplasmic processes forming a prominent network among the nerve fibres as compared with controls. Many of them showed narrow finger-like projections wrapping around unmyelinated or myelinating axons (Fig. 8).

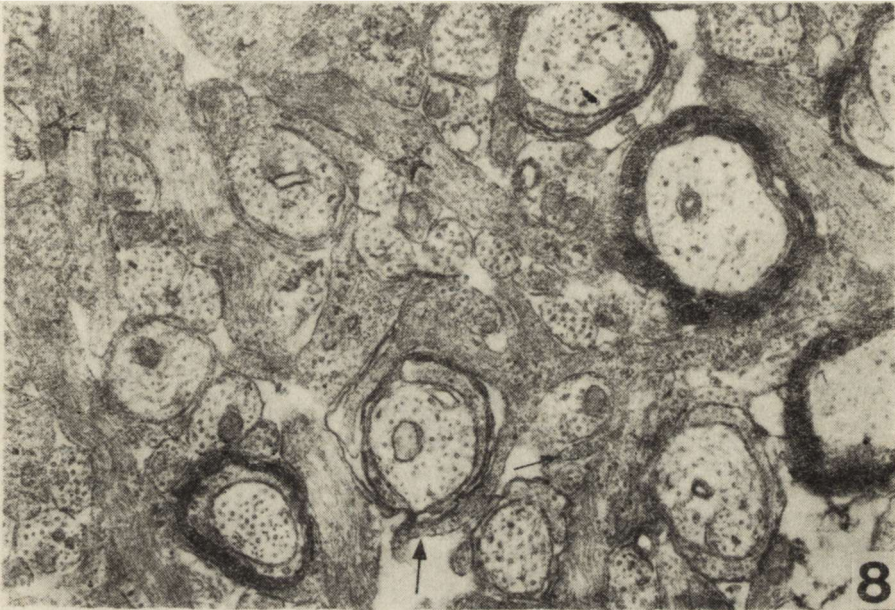


Fig. 8. Optic nerve of 14-day-old pt rabbit. Increased amount of astrocytic processes containing both glial filaments and microtubules (asterisks) are seen between the nerve fibres. Narrow finger-like astrocytic processes with electron-dense cytoplasm (arrows) surround unmyelinated or myelinated axons. $\times 23\ 500$

Ryc. 8. Nerw wzrokowy 14-dniowego królika pt. Pomiędzy włóknami nerwowymi widoczna jest zwiększona ilość wypustek astrocytarnych zawierających zarówno filamenty glejowe jak i mikrotubule (gwiazdki). Wąskie palczaste wypustki z ciemniejszą cytoplazmą okracają się wokół niezmielinizowanych lub zmielinizowanych aksonów (strzałki). Pow. 23 500 \times

Late period of myelination

The dorsal funiculus of spinal cord, optic nerve and corpus callosum of 90-day-old animals were investigated. Specimens from adult rabbits were employed for comparison.

In 90-day-old control rabbits axons of all diameters were myelinated. The oligodendrocytes were represented predominantly by cells of the

dark type like in adult animals. The astrocytes showed fewer bundles of glial filaments than those in younger animals and retracted, straight-running, electron-lucent processes, typical of adult rabbits.

Contrary to controls, in 90-day-old pt mutants considerable numbers of unmyelinated axons were still observed. A very prominent feature in the mutants was the presence of hypertrophied astrocytes with abundant cytoplasm and multiple processes densely packed with glial filaments. Like in younger pt rabbits, the astrocytic processes showed narrow projections surrounding unmyelinated or myelinated axons (Fig. 9). The presence of microtubules was also recognized in astroglial processes.

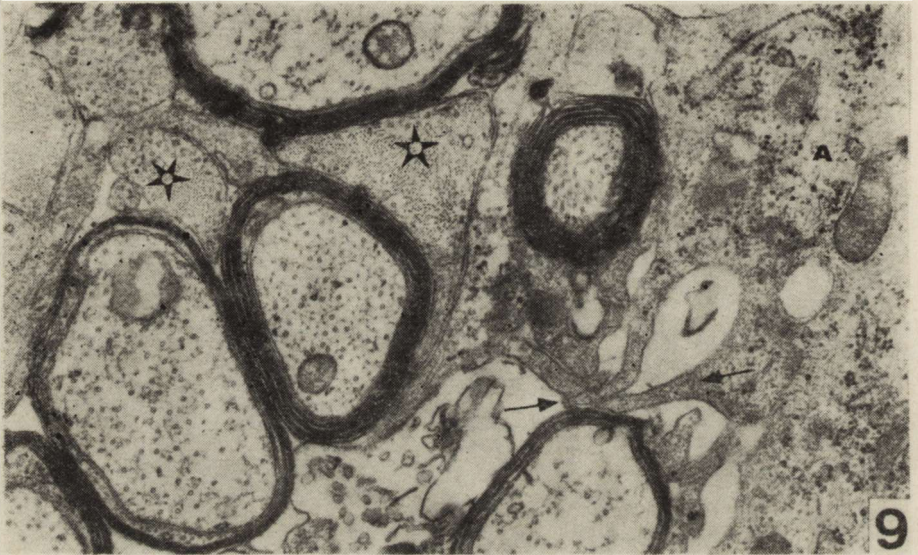


Fig. 9. Optic nerve of 90-day-old pt rabbit. Astrocytic processes contain both glial filaments and microtubules (asterisks). Note also finger-like projections with denser cytoplasm (arrows) emerging from astrocytic cytoplasm (A). $\times 29\,500$

Ryc. 9. Nerw wzrokowy 90-dniowego królika pt. Wypustki astrocytarne zawierają zarówno filamenty glejowe jak i mikrotubule (gwiazdki). Widoczne są także palczaste wypustki z ciemniejszą cytoplazmą (strzałki) wychodzące bezpośrednio z cytoplazmy astrocytu (A). Pow. $29\,500 \times$

The oligodendrocytes with abundant cytoplasm rich in free ribosomes but with scarce granular endoplasmic reticulum were still frequently observed in 90-day-old mutants. A similar pattern of oligodendroglial cytoplasm was also encountered in adult pt rabbits (Fig. 10).

An additional finding in the pt mutant was the occurrence of microglial cells with accumulation of lipid droplets in their cytoplasm (Fig. 11). The microglial cells could be recognized by the characteristic pattern of the nucleus with broad electron-dense chromatin aggregates beneath the

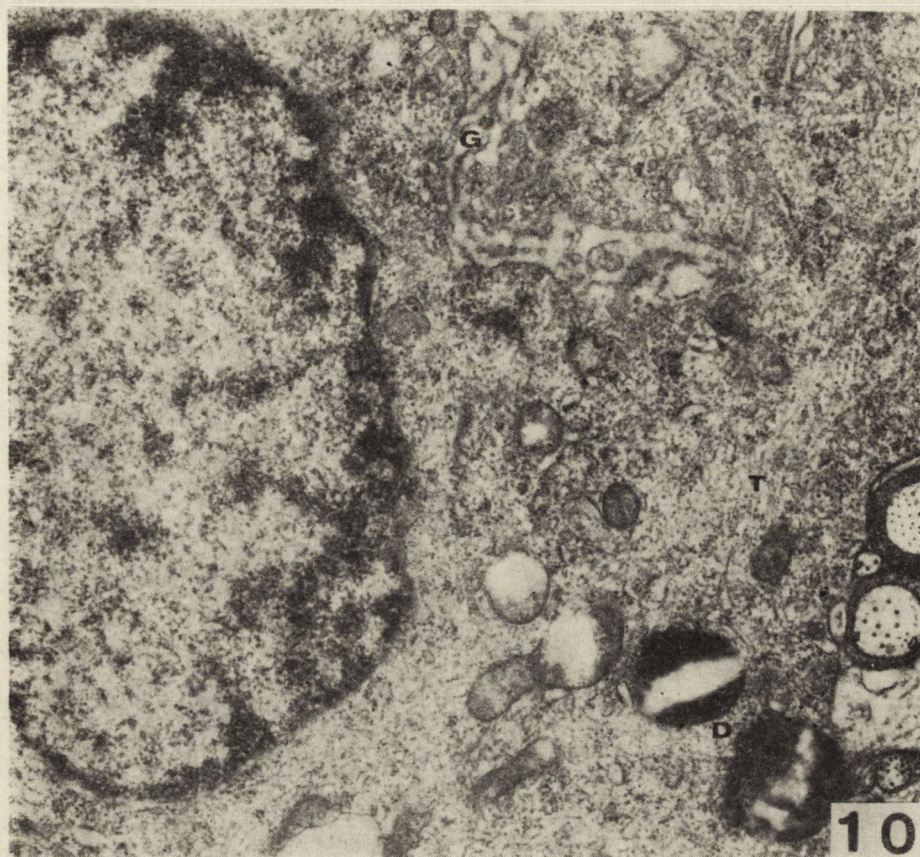


Fig. 10. Spinal cord of adult pt rabbit. Fragment of oligodendrocyte with abundant cytoplasm containing irregular aggregations of free ribosomes, many microtubules (T), prominent Golgi apparatus (G), but very scarce granular endoplasmic reticulum. D — dense bodies. $\times 21\ 100$

Ryc. 10. Rdzeń kręgowy dorosłego królika pt. Fragment oligodendrocytu z obfitą cytoplazmą zawierającą nieregularne skupienia wolnych rybosomów, liczne mikro-tubule (T), dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G) oraz bardzo skąpą ziarnistą siateczką śródplazmatyczną. D — ciała gęste. Pow. 21 100 \times

nuclear envelope. The cytoplasm showed long and narrow cisternae of granular endoplasmic reticulum, small clusters of ribosomes, prominent Golgi complex, frequent granular vesicles and dense bodies. Besides, in pt mutants the cytoplasm often contained multiple, grape-like arranged, electron-lucent vacuoles bounded by a homogeneous, moderately-electron-dense rim (Fig. 11). These lipid-laden cells were most frequently observed in 28- and 90-day-old mutants. In controls at this time, the microglial cells had rather scanty cytoplasm without lipid droplets; however, lipid-laden cells were seen sporadically before myelination onset in corpus callosum of 14-day-old control rabbits.

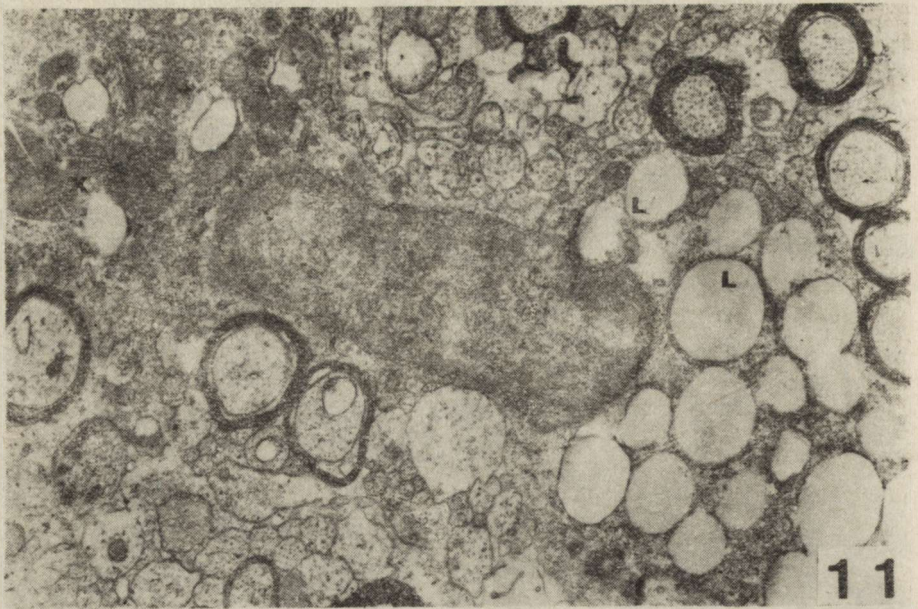


Fig. 11. Corpus callosum of 90-day-old pt rabbit. A microglial cell with intracytoplasmic accumulation of vacuolated lipid droplets (L) and with dense bodies (X).
 × 13 840

Ryc. 11. Spoidło wielkie 90-dniowego królika pt. Komórka mikrogleju ze śródplazmatycznym nagromadzeniem zwakuolizowanych kropli lipidowych (L) i z ciałami gęstymi (X). Pow. 13 840 ×

DISCUSSION

Our observations on the differentiation and maturation of glial cells during myelination in control rabbits are in general agreement with data on normal gliogenesis in mammalian brain (Privat 1975), and especially in rat (Vaughn, Peters 1967; Vaughn 1969; Mori, Leblond 1970; Ling 1976; Kozik 1976; Skoff et al. 1976) as also in rabbit (Dekaban 1956; Robain 1970; Wender et al. 1979).

The present study indicated, that oligodendrocytes appear just before the onset of myelination and their maturation roughly parallels the deposition of myelin. The developmental pattern of the three types of oligodendrocytes, evidenced in our studies of control rabbits, corresponds to the original description of light, medium and dark oligodendrocytes in the rat by Mori and Leblond (1970). The presence of a number of astroglial cells in the premyelination period in the optic nerve and corpus callosum of rabbits agrees also with the statement of many investigators, that astrocytes precede oligodendrocytes and are generated much earlier (Vaughn 1969; Sturrock 1975; Privat 1975; Skoff et al. 1976).

In the pt mutant early morphological changes are observed in immature astrocytes as early as in the premyelination period. These cells show hypertrophy of cytoplasmic processes with an increased content of mi-

crofilaments; on the other hand, they seem to represent rather younger cell forms of developing astroglia than those in controls.

The reaction of astrocytes of pt mutants is very conspicuous in the myelination period; it is much more pronounced than astrogliosis accompanying normal myelination in the control rabbits. Moreover, the hypertrophic astrocytes in the pt mutant exhibit some features of immature cells, such as the presence of microtubules and narrow processes wrapping around unmyelinated or myelinated axons. Vaughn and Peters (1967) and Vaughn (1969) observed in the optic nerve of normal developing rats small finger-like projections of immature astrocytes, which have a tendency to enclose unmyelinated axons. Similar observations in the early postnatal kitten optic nerve (Blunt et al. 1972), in rat spinal cord before the onset of myelination (Nagashima 1979), and in human fetal spinal cord (Choi et al. 1983) have been reported. Choi et al. (1983) described in early gliogenesis the presence of "transitional cells" which possess morphological and immunohistochemical features of both astroglial and oligodendroglial cells.

In our material these peculiar astrocytic processes were also observed in control rabbits, but they occurred infrequently and only in the early stage of myelination, whereas in pt rabbits they were a common feature, observed even in the late period of myelination. It seems, that in the pt mutant astrocytes maintain some enhanced tendency to contact the axons, what in normal development is characteristic only of cells at earlier differentiation stages.

The oligodendrocytes in the pt mutant have features of active myelinating cells characterized by large perikaryal cytoplasm. However, the sparsely developed granular endoplasmic reticulum, and the abundance of free ribosomes in the cytoplasm may be indicative of their immature state. The rare occurrence of mature dark oligodendrocytes in 3-month-old pt rabbits supports the suggestion, that maturation of oligodendrocytes is retarded. The abnormal oligodendrocytes with aggregation of dilated tubular and vesicular profiles are similar in some aspects to the oligodendrocytes described in myelin-deficient (md) mutant rats (Dentinger et al. 1982). In oligodendrocytes of md rats the vacuolar profiles have the appearance of dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum, whereas in oligodendrocytes of pt rabbits they are believed to be rather the proliferating membranes of smooth endoplasmic reticulum. Moreover, these oligodendrocytes of pt rabbits show the presence of mitotic figures during the period of myelination. Presumably, the protracted mitotic activity of oligodendrocytes may be connected with their delayed maturation. A great number of unmyelinated axons could be also a factor stimulating the oligodendrocytes to proliferation. It has to be emphasized that in developmental studies of normal glia, proliferation of oligodendrocytes appears to be limited to immature cells only in the

early stage of myelination (Skoff et al. 1976). Disturbed development and a severely reduced number of oligodendrocytes have been reported in the hypomyelinated Jimpy (jp) mouse mutant (Privat et al. 1972; Kraus-Ruppert, Herschkowitz 1973; Meier et al. 1974; Meier, Bischoff 1975; Privat et al. 1982; Skoff 1982). On the other hand, increased proliferation of the oligodendroglial cell line in jp mice was documented by radioautographic studies; however, the protracted proliferation does not lead to an increase of maturing oligodendrocytes because their differentiation and maturation are interrupted and the death incidence of oligodendroglial cells increases (Privat et al. 1982; Skoff 1982). In pt rabbits the defect in oligodendroglia development is not so severe as in the jp mouse. The number of oligodendrocytes does not seem to be reduced and the increased death rate is not apparent.

The occurrence of oligodendrocytes with features of active myelinating cells in 3-month-old pt rabbits correlates well with the prolonged and slowly progressing myelination process, although the decreased rate of myelin sheaths formation leads to incomplete and defective myelination in adult mutants (Taraszewska, Zelman 1986).

The deficient myelin formation in pt rabbit could be related with the abnormalities in maturation of oligodendroglial cells. On the other hand, the strong hypertrophic reaction of astroglial cells as well as their delayed maturation indicate the more general involvement of neuroglia in the pathomechanism of hypomyelination in the pt mutant. Furthermore, it has been previously reported that in pt rabbits astrocytes show intracytoplasmic accumulation of sudanophilic lipid droplets (Taraszewska 1983, 1986). These fat-laden astrocytes appear selectively in large amounts in the cerebellar white matter during the period of myelination. It has been suggested (Taraszewska 1986) that lipid accumulation in astrocytes is similar to the changes described as "neuroglial fatty metamorphosis" (Schneider et al. 1976) and may be due to some intrinsic metabolic disturbances of astrocytes. Some investigations of Jimpy mice provided evidence for the significant role of astroglia in the process of hypomyelination (Skoff 1976; Omlin, Anders 1983).

The present study revealed that in pt rabbits microglial cells are lipid-laden as well. The presence of lipid droplets in microglia is a normal feature of the phagocytic function of these cells; however, the origin of the phagocytosed material is not clear. It may represent accumulation of components destined for myelin-associated lipids which cannot be utilized in deficient and defective myelin sheaths formation. Another possibility is that secondary degeneration of myelin of some nerve fibres may appear in the course of abnormal myelination and these degradation products are accumulated in microglia cells.

Similar cells occur in corpus callosum of control rabbits before the onset of myelination. Accumulation of lipid droplets has been described in various glial cells also in normally developing rats (Ferrer, Sarmiento

1981) and in humans (Mickel, Gilles 1970). Mickel and Gilles (1970) postulated, that it is a normal phenomenon connected with premyelinic lipidogenesis. In pt mutants lipid-laden microglial cells occur during the period of advanced myelination and presumably they may reflect some events associated with unspecific phagocytosis rather than with myelinogenesis. In other hypomyelinated mutants, lipid-laden microglial cells were reported in Jimpy mouse (Privat et al. 1972; Omlin et al. 1980) and in md rat (Dentinger et al. 1982), but their primary connection with myelin deficit remains also undetermined.

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE GLEJU U KRÓLIKA PT W OKRESIE MIELINIZACJI

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian w ultrastrukturalnym obrazie gleju u mutantu królika pt z hipomielinizacją oun. Badano nerwy wzrokowe, spoidło wielkie i powrózki tylne rdzenia w różnych okresach mielinizacji u królików pt i kontrolnych w wieku 2, 8, 14, 28, 90 dni i dorosłych.

We wczesnym okresie mielinizacji obserwowano częstsze występowanie glioblastów i oligodendroblastów u królików pt niż w kontroli. U królików pt młode astrocyty miały wygląd komórek mniej dojrzałych niż u kontrolnych królików, a równocześnie wykazywały większy rozrost wypustek zawierających dużą ilość filamentów glejowych, jak również mikrotubule. Cechy przerostu astrocytów były szczególnie nasilone w okresie zaawansowanej i późnej mielinizacji. W tym okresie w przerosłych astrocytach obserwowano nadal obecność mikrotubul oraz występowanie cienkich astroglejowych wypustek okręcających się wokół aksonów. Oligodendrocyty u królików pt charakteryzowały się obecnością licznych wolnych rybosomów rozproszonych w cytoplazmie i bardzo skąpą ilością ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Cechy te były typowe dla oligodendrocytów zarówno w okresie mielinizacji, jak i u królików dorosłych. W późnym okresie mielinizacji u 90-dniowych królików pt przeważały oligodendrocyty o wyglądzie dużych jasnych komórek w przeciwieństwie do ciemnych dojrzałych oligodendrocytów u królików kontrolnych. Ponadto u królików pt spotykano oligodendrocyty z cytoplazmą zawierającą liczne gładkobłoniaste struktury pęcherzykowe i tubularne. W okresie zaawansowanej mielinizacji niektóre oligodendrocyty z wielopęcherzykowymi zmianami cytoplazmy wykazywały obrazy kariokinezy, co może sugerować przedłużoną proliferację oligodendrogleju. Przedstawione wyniki wskazują na przedłużoną niedojrzałość oligodendrocytów i astrocytów oraz na wczesne zmiany przerostowe astrogleju w przebiegu opóźnionej i przedłużonej mielinizacji u mutantu pt.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИИ У КРОЛИКА PT ВО ВРЕМЯ МИЕЛИНИЗАЦИИ

Резюме

Целью исследований было определение ультраструктурных изменений глии у мутанта кролика pt с гипомиелинизацией центральной нервной системы. Исследовались зрительные нервы, мозолистое тело и задние канатики спинного мозга в разных периодах миеленизации у кроликов pt и контрольных в возрасте 2, 8, 14, 28, 90 дней и взрослых.

В раннем периоде миелинизации наблюдалось более частое появление глиобластов и олигодендробластов у кролика *pt* чем у контрольных. У кроликов *pt* молодые астроциты казались менее зрелыми чем у контрольных, но одновременно проявляли большее разрастание отростков содержащих большое количество глиозных филаментов а также микротубули. Черты гипертрофии астроцитов были особо интенсивны во время выдвинутой и поздней миелинизации. В этом периоде в гипертрофических астроцитах все еще наблюдались микротубули и тонкие отростки астроглии обвертывающиеся вокруг аксонов. Олигодендроциты у кроликов *pt* характеризовались присутствием многочисленных свободных рибозом рассеянных в цитоплазме и очень недостаточным количеством шероховатой эндоплазматической сетки. Эти черты были характерны для олигодендроцитов как во время миелинизации, так и у взрослых кроликов. В позднем периоде миелинизации у 90-дневных кроликов *pt* преобладали олигодендроциты, которые выглядели как большие светлые клетки, противоположно темным зрелым олигодендроцитам контрольных кроликов. Кроме того у кроликов *pt* встречались олигодендроциты с цитоплазмой содержащей многочисленные гладкомембранные везикулярные и тубулярные структуры. Во время выдвинутой миелинизации некоторые олигодендроциты с множественными везикулярными изменениями цитоплазмы проявляли кариокинезы. Это может внушать продлившую пролиферацию олигодендроглии. Представленные результаты указывают на длительную незрелость олигодендроцитов и астроцитов и на ранние гипертрофические изменения астроглии во время опоздавшей и длительной миелинизации у мутанта *pt*.

REFERENCES

1. Blunt M. J., Baldwin F., Wendell-Smith C. P.: Gliogenesis and myelination in kitten optic nerve. *Z. Zellforsch.*, 1972, 124, 293—310.
2. Choi B. H., Kim R. C., Lapham L. W.: Do radial glia give rise to both astroglial and oligodendroglial cells? *Develop. Brain Res.*, 1983, 8, 119—130.
3. Dąmbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203—209.
4. Dekaban A.: Oligodendroglia and axis cylinders in rabbits before, during, and after myelination. *Anat. Rec.*, 1956, 126, 111—122.
5. Dentinger M. P., Barron K. D., Csiza C. K.: Ultrastructure of the central nervous system in a myelin deficient rat. *J. Neurocytol.* 1982, 11, 671—691.
6. Ferrer L., Sarmiento J.: Lipid inclusions in the telencephalic neuroglia of the developing rat. *J. Hirnforsch.*, 1981, 22, 307—312.
7. Kozik M. B.: The electron-microscopic picture of postnatal development of oligodendroglia. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1976, 14, 99—106.
8. Kraus-Ruppert R., Herschkowitz N.: Morphological studies on neuroglial cells in the corpus callosum of the Jimpy mutant mouse. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1973, 32, 197—202.
9. Ling E. A.: Study in the changes of the proportions and numbers of the various glial cell types in the spinal cord of neonatal and young adult rats. *Acta Anat.*, 1976, 96, 188—195.
10. Meier C., Herschkowitz N., Bischoff A.: Morphological and biochemical observations in the Jimpy spinal cord. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1974, 27, 349—362.
11. Meier C., Bischoff A.: Oligodendroglial cell development in Jimpy mice and controls. *J. Neurol. Sci.*, 1975, 26, 517—528.
12. Mickel H. S., Gilles F. H.: Changes in glial cells during human telencephalic myelinogenesis. *Brain*, 1970, 93, 337—346.

13. Mori S., Leblond C. P.: Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J. comp. Neurol.*, 1970, 139, 1—30.
14. Nagashima K.: Ultrastructural study of myelinating cells and sub-pial astrocytes in developing rat spinal cord. *J. Neurol. Sci.*, 1979, 44, 1—12.
15. Omlin F. X., Bischoff A., Spycher M. A., Wiesmann U. N.: Ultrastructure of lipids in the optic nerve of the mouse mutant „Jimpy”. A study of histochemistry, freeze-etching and thin section technique. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1979, 45, 221—229.
16. Omlin F. X., Anders J. J.: Abnormal cell relationships in Jimpy mice: electron microscopic and immunocytochemical findings. *J. Neurocytol.*, 1983, 12, 767—784.
17. Privat A.: Postnatal gliogenesis in the mammalian brain. *Int. Rev. Cytol.*, 1975, 40, 281—323.
18. Privat A., Robain O., Mandel P.: Aspects ultrastructuraux du corpus calleux chez la souris Jimpy. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1972, 21, 282—295.
19. Privat A., Valat J., Lachapelle F., Baumann N., Fulcrand J.: Radioautographic evidence for the protracted proliferation of glial cells in the central nervous system of jimpy mice. *Develop. Brain Res.*, 1982, 2, 411—416.
20. Robain O.: Gliogenèse post-natale chez le lapin. *J. Neurol. Sci.*, 1970, 11, 445—461.
21. Schneider H., Sperner J., Dröszus J. U., Schachinger H.: Ultrastructure of the neuroglial fatty metamorphosis (Virchow) in the perinatal period. *Virchows Arch. A. Path. Anat. Histol.*, 1976, 372, 183—194.
22. Skoff R. P.: Myelin deficit in the Jimpy mouse may be due to cellular abnormalities in astroglia. *Nature (Lond.)*, 1976, 264, 560—562.
23. Skoff R. P.: Increased proliferation of oligodendrocytes in the hypomyelinated mouse mutant — jimpy. *Brain Res.*, 1982, 248, 19—31.
24. Skoff R. P., Price D. L., Stocks A.: Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I. Cell proliferation. *J. comp. Neurol.*, 1976, 169, 291—312.
25. Sturrock R. R.: A light and electron microscopic study of proliferation and maturation of fibrous astrocytes in the optic nerve of the human embryo. *J. Anat.*, 1975, 119, 223—234.
26. Sniatała-Kamasa M.: Ultrastructural picture of the optic nerve in rabbit during ontogenic development. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 11—23.
27. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt na podstawie badań rdzenia kręgowego w mikroskopie elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327—342.
28. Taraszewska A.: Sudanophilic deposits in astroglial cells in pt rabbit. The 4th Hungarian-Polish Neuropathological Symposium on Astrocyte. Balatonszemes, Hungary, May 8—10, Abst. 1983, 9—10.
29. Taraszewska A.: Morfologiczna charakterystyka złogów sudanofilnych występujących w przebiegu nieprawidłowej mielinizacji u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 183—194.
30. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 219—227.
31. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. II. Spoidło wielkie. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 443—454.
32. Vaughn J. E.: An electron microscopic analysis of gliogenesis in rat optic nerves. *Z. Zellforsch.*, 1969, 94, 293—324.

33. Vaughn J. E., Peters A.: Electron microscopy of the early postnatal development of fibrous astrocytes. *Amer. J. Anat.*, 1967, 121, 131—152.
34. Wender M., Kozik M., Śniatała-Kamasa M., Mularek O., Pankrac J.: Neuroglia of the optic nerve in the course of myelination. *J. Hirnforsch.*, 1979, 20, 191—200.
35. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

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

ANDRZEJ GONCERZEWICZ

THE ROLE OF ASTROGLIA IN PATHOLOGICAL PROCESSES
CHARACTERIZED BY MYELIN DISINTEGRATION.
I. MORPHOLOGY OF ASTROGLIA IN EXPERIMENTAL
INJURY OF WHITE MATTER

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań, Poland

Morphological studies in experimental injury of white matter consist in analysis of changes in axons, their myelin sheaths as well as in vessel walls and neuroglial cells. Recently some trials are undertaken to evaluate how the changes of individual structural elements of white matter are interconnected with each other. This approach seems to be the key for understanding the pathomechanism of white matter injury, which is especially important in the search for the cause of demyelinating diseases.

Up till now, the role of astroglia in the above mentioned processes still remains not fully elucidated. Multiple data have been accumulated, especially in recent years, which speak in favour of the vital function performed by these cells in physiology as well as in pathological conditions within the central nervous system (CNS). The descriptions of astroglial ultrastructural pathology in world literature are consistent with each other (Fernando—Fernando 1973; Nathaniel, Nathaniel 1981) and involve a pattern of progressive changes as depicted by classical neuropathology (Mossakowski 1981). It is generally agreed that these changes constitute an important element of any pathological process taking place within white matter. However, the question still remains open whether the astroglial reaction is primary, or only secondary to the basic pathological phenomenon which in demyelinating processes consists in myelin disintegration.

One of the possible means to settle this problem is a systematic description of the astroglial reaction associated with myelin damage, comprising also the earliest stages of controlled experiment. A description of astroglia ultrastructure in several experimental models of white matter injury is the subject of this publication.

MATERIAL AND METHODS

Investigations were performed on the following experimental models:

1. Myelopathy induced by cerebrospinal fluid "pumping" after Bunge et al. (1960) in cats. The procedure involves repeated withdrawal and reinjection of cerebrospinal fluid through a needle inserted into cisterna magna. Subpially located white matter of the two upper segments of the cervical spinal cord was dissected 6 and 18 days after the experimental procedure (in the early, preparalytic and the late, paralytic period, respectively). Fixation began by 10 minutes *in situ* application of the cold fixative mixture after Karnovsky (1965), containing 3.6% paraformaldehyde and 4.6% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. This was followed by immersion of dissected tissue in the same fixative for 4—6 hours at 4°C. After overnight washing in cold 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), small pieces of material were postfixed for 1 hour in 1% buffered osmium tetroxide and then routinely dehydrated and embedded in Epon 812. Control material derived from cats with the needle surgically inserted into cisterna magna for the time equivalent to that of the "pumping" procedure, but no withdrawal or reinjection of cerebrospinal fluid was performed.

2. Central Wallerian degeneration (cWD) inflicted by unilateral incision of right optic nerve close to the eye bulb in rabbits and rats. In the study part of the optic nerve most proximal to the chiasma was exclusively used 4, 8, 16, 24, 32 and 80 days after surgical removal of eye bulb (details of procedure described by Goncerzewicz 1982). Material from rabbits was fixed *in situ*, dissected, immersed in Karnovsky fixative exactly as described above. Material from rats was taken after 20—30 minutes of transcardiac perfusion with Karnovsky fixative, followed by 2 hours immersion in the same fixative at 4°C. Subsequently, material from both rabbits and rats was washed in cacodylate buffer, pH 7.4, postfixed in osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Epon exactly as described above. The contralateral, uninjured optic nerve served as a control.

3. Encephalopathy in the course of chronic triethyltin (TET) intoxication after Eto and Suzuki (1971). The experiment was performed on young adult Wistar rats. The poison — triethyltin sulfate — was added to the animal's drinking water, accessible *ad libitum*. The concentration of poison varied from 5 mg to 10 mg per liter, depending on the duration of experiment (Wender et al. 1982). Material from optic nerves and corpus callosum was taken in the presymptomatic stage (5

and 24 hours of experimental intoxication) as well as at the onset of clinical improvement (28 and 42 days of experiment). Rats were transcardiacally perfused with Karnovsky fixative for 20—30 minutes, and subsequent handling of material was exactly the same as described above in the group of rats subjected to unilateral eye bulb removal. The control group consisted of healthy young adult Wistar rats.

RESULTS

“Postpumping” myelopathy

In the early period of experimental myelopathy 6 days after “pumping” local splitting of almost all myelin sheaths with disappearance of intraperiod line was observed. At the same time the non-split parts of any sheath retained their normal structure (Fig. 1).



Fig. 1. Pumping myelopathy. Early period. Axoplasm essentially unchanged (Ax_1), in some places condensed (Ax_2) or shrunken (Ax_3). Myelin sheaths retain in some parts their normal structure (arrows). Their split fragments are frequently adjoined by astrocytic processes (Ap). One of the processes near a blood vessel (BV) exhibits swelling. No hematogenous cells within the CNS parenchyma can be seen. $\times 3400$

Ryc. 1. Mielopatia wywołana „pompowaniem” płynu mózgowo-rdzeniowego. Okres wczesny. W części włókien osiowych aksoplazma jest prawidłowa (Ax_1), w innych wykazuje zagęszczenie (Ax_2) lub obkurczenie (Ax_3). Osłonki mielinowe wykazują miejscami prawidłową strukturę (strzałki). Do fragmentów rozszczepionych często przylegają wypustki astrocytów (Ap). Jedna z takich wypustek w pobliżu naczynia (BV) wykazuje cechy obrzmienia. W miększu tkanki nerwowej nie obserwuje się komórek pochodzących z łożyska naczyniowego. Pow. 3400 \times

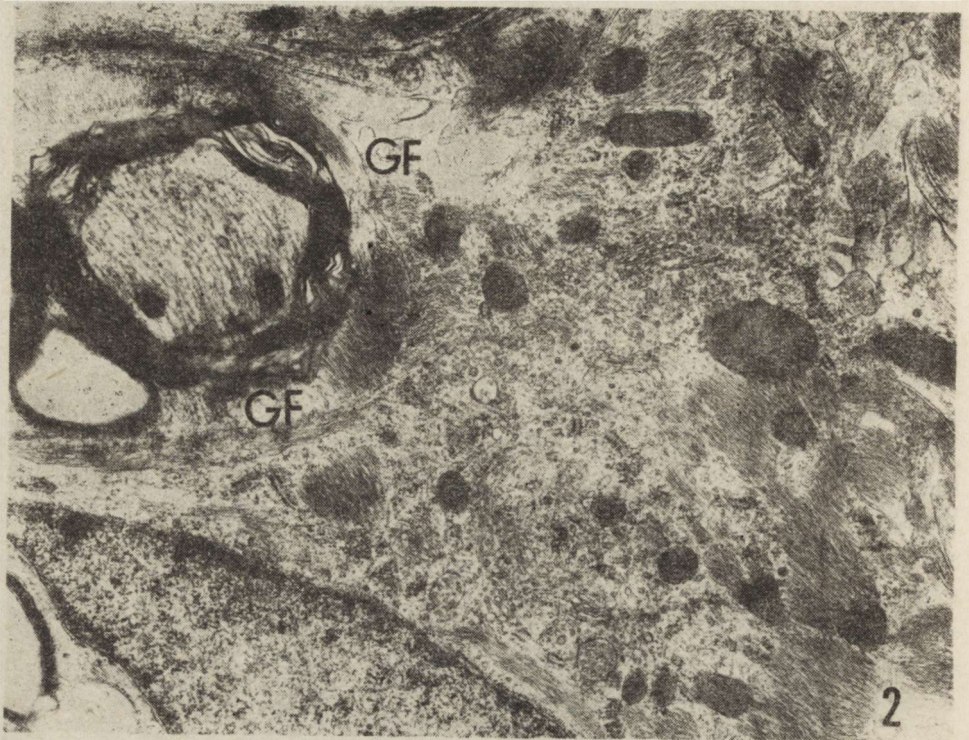


Fig. 2. Pumping myelopathy. Early period. Myelin sheath which begins to split is surrounded by astrocyte processes filled with intermediate filaments (GF) exhibiting voluminous, dense cytoplasm. $\times 21\ 000$

Ryc. 2. Mielopatia wywołana „pompowaniem” płynu mózgowo-rdzeniowego. Okres wczesny. Osłonka mielinowa w początkowej fazie rozszczepienia jest otoczona przez wypustki astrocytarne wypełnione włóknienkami klasy pośredniej (GF). Zwraca uwagę obfita i gęsta cytoplazma okołojądrowa astrocytu. Pow. 21 000 \times

The ultrastructural appearance of axoplasm was generally normal, only occasionally shrinkage or condensation were observed (Fig. 1). Cytoplasmic processes containing intermediate filaments came in close contact with axons, the myelin sheaths of which begun to split (Figs 1, 2). Some of these processes, especially those located perivascularly, revealed some features of swelling (Fig. 1). The perikarya of cells containing intermediate filaments were much larger and more dense as compared with normal conditions. The latter phenomenon was due to an increased content of polyribosomes, rough endoplasmic reticulum channels as well as dense bodies of different size. However, no increase in the content of glycogen granules was noted (Fig. 2). The number of intermediate filaments gathered in bundles in the perikarya as well as in cell processes was especially increased in the later period of myelopathy. Being in close contact with degenerating myelin sheaths the processes contained also numerous osmiophilic structures which partially retained the

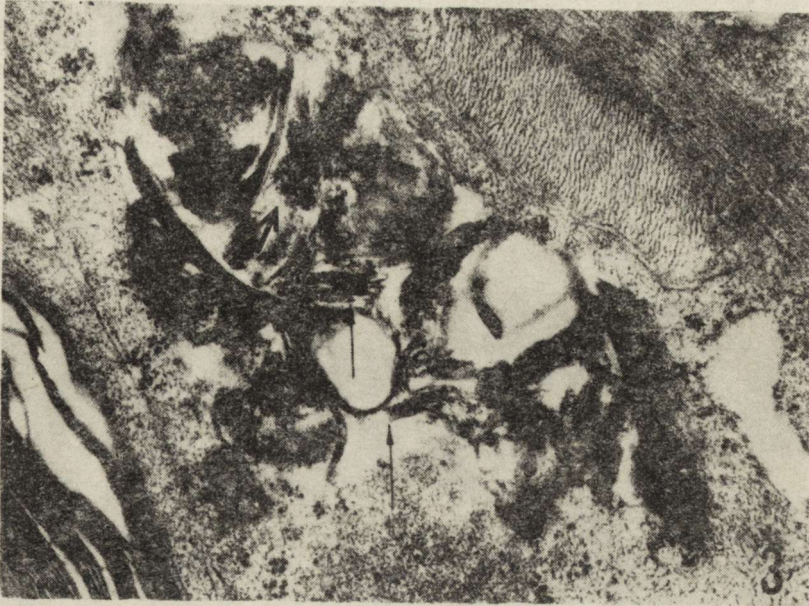


Fig. 3. Pumping myelopathy. Late period. Astrocytic process contains large osmiophilic formation. Most of accumulated material has an amorphous appearance.

However, fragments with retained periodicity are visible (arrows). $\times 14\,500$

Ryc. 3. Mielopatia wywołana „pompowaniem” płynu mózgowo-rdzeniowego. Okres późny. Wypustka astrocytarna zawiera duży twór osmofilny. Większość nagromadzonego materiału ma charakter amorficzny, jednakże widoczne są również fragmenty zachowujące budowę periodyczną (strzałki). Pow. $14\,500 \times$

periodicity, characteristic of myelin (Fig. 3). Even more numerous were amorphous osmiophilic structures associated with not yet fully developed lipid droplets. The structures occupied large spaces not only within the processes, but also in the perikarya of typical astrocytes (Fig. 4). As far as oligodendroglia are concerned, only a moderate increase in the number of polyribosomes and microtubules was noted. No infiltration of CNS parenchyma with cellular elements from the vascular bed could be observed.

Central Wallerian degeneration

As early as after 4 days of cWD in the rat and rabbit optic nerves, disintegration and shrinkage of axoplasm were observed, manifested by accumulation of electron-dense, fuzzy or membraneous material accompanied by empty spaces, very often within the same axonal fibre. The changes appeared almost regularly on the 8th day of observation (Fig. 5). In spite of the extent of axoplasmic disintegration, only slight loosening of surrounding myelin sheaths was observed and normal periodicity was retained even in collapsed sheaths forming myelin ovoids (Figs 5,

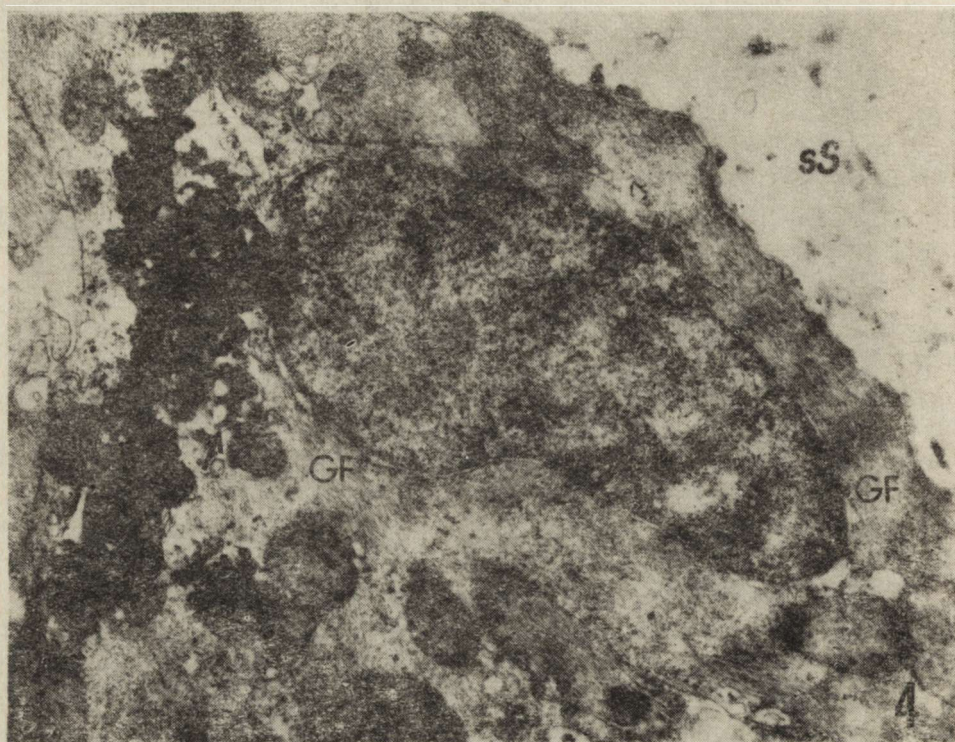


Fig. 4. Pumping myelopathy. Late period. Subpially located astrocyte (bundles of intermediate filaments — GF — are clearly visible in its cytoplasm) exhibits perinuclearly large osmiophilic deposit. On its border lipid droplets are formed (arrow). sS — subarachnoid space. $\times 5200$

Ryc. 4. Mielopatia wywołana „pompowaniem” płynu mózgowo-rdzeniowego. Okres późny. Podoponowy astrocyt (wyraźnie widoczne są w jego cytoplazmie wiązki włókienek klasy pośredniej — GF) wykazuje okołojądrowo obecność złożeń osmiofilnych. Na ich obrzeżu tworzą się kule lipidowe (strzałka). Przestrzeń podpajęczynówkowa oznaczona sS. Pow. 5200 \times

6). Contrary to the slow pace of myelin disintegration, structural changes of astroglia were much more pronounced already in the earliest period of observation.

Nuclei of the cells exhibited dense karyoplasm with a large amount of perichromatin granules. Nuclear membranes were much more invaginated as compared with normal condition. Perikarya were greatly enlarged with vast amount of polyribosomes and rough endoplasmic reticulum channels, complex structures of Golgi apparatus and numerous dense bodies. Due to the presence of these structures, perikarya as well as some processes penetrating the spaces between degenerating myelinated axons exhibited high electron density (Fig. 5). Moreover, the processes

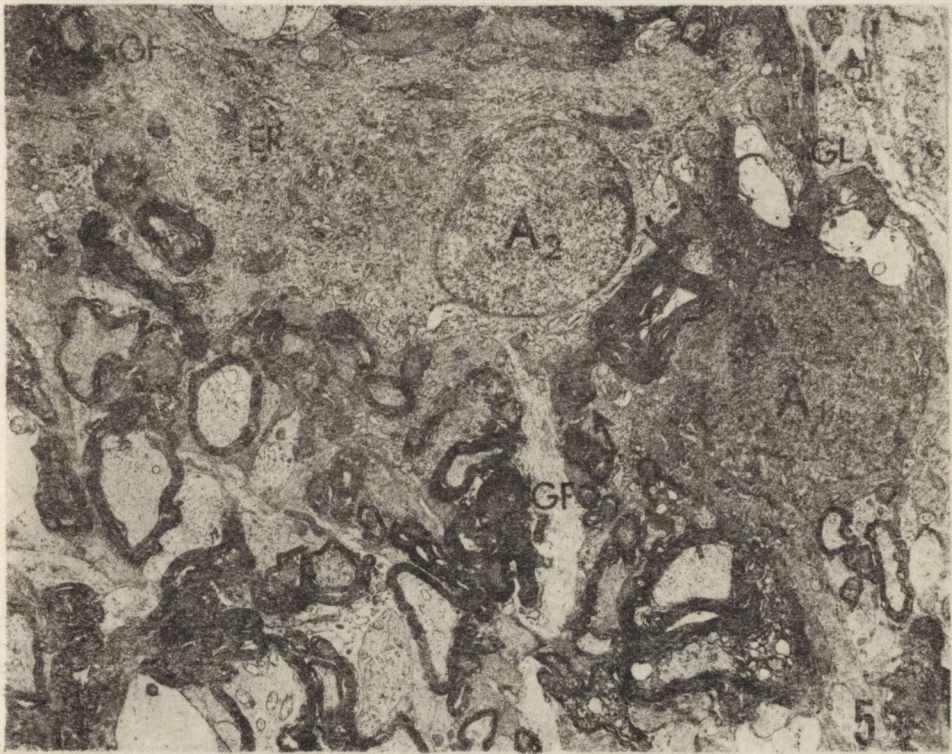


Fig. 5. Central Wallerian degeneration, 8 days after operation. In myelinated axons axoplasmic changes are more pronounced as compared with those of myelin sheath. Astrocyte of very dense nucleus and cytoplasm (A_1) sends processes adjoining degenerated axons (arrows) and forming convoluted glia limitans (GL). The other astrocyte (A_2) of voluminous cytoplasm containing numerous polyribosomes and endoplasmic reticulum channels (ER) has broad processes filled with intermediate filaments (GF). $\times 2200$

Ryc. 5. Ośrodkowe zwyrodnienie Wallera, 8 dzień po zabiegu. Zmiany w aksoplazmie włókien osiowych są bardziej zaawansowane niż w otaczającej je mielinie. Astrocyt o bardzo gęstym jądrze i cytoplazmie (A_1) wysyła wypustki wchodzące w kontakt z degenerującymi aksonami (strzałki) oraz formujące pofałdowaną graniczną błonę glejową (GL). Inny astrocyt (A_2) z obfitą cytoplazmą wypełnioną licznymi polirybosomami oraz kanałami siateczki śródplazmatycznej (ER) posiada szerokie wypustki zawierające włóknienka klasy pośredniej (GF). Pow. 2200 \times

were easy to identify because of the presence of intermediate filaments (Figs 5, 6). No increase of glycogen granules within astrocytic cytoplasm was observed. Complete disintegration of axoplasm and progressive splitting of myelin lamellae was characteristic of the latest periods of observations (16 days after operation and onwards). Numerous collapsed myelin ovoids seemed to be present extracellularly, for no remnants of oligodendroglial external or internal loops were observable and astrocytic processes adjoining the outermost lamellae of collapsed myelin were separated by small, irregular empty spaces (Fig. 6). Periodicity



Fig. 6. Central Wallerian degeneration. 32 days after operation. Degenerated axon with myelin of partially retained periodicity (arrows), with adjoining several astrocytic processes (Ap) separated by small clefts of extracellular space (ES). In lower left corner osmiophilic structure associated with lipid droplets (L), which appears within the cell possessing bundles of intermediate filaments (GF). $\times 7500$

Ryc. 6. Ośrodkowe zwyrodnienie Wallera. 32 dzień po zabiegu. Degenerujący akson z mieliną o częściowo zachowanej periodycznej budowie (strzałki), do której przylega kilka wypustek astrocytarnych (Ap), przedzielonych niewielkimi szczelinami przestrzeni pozakomórkowej (ES). W lewym dolnym rogu twór osmofilny sąsiadujący z wakuolami lipidowymi (L), które to struktury występują wewnątrz komórki posiadającej wiązki włókienek klasy pośredniej (GF). Pow. 7500 \times

was still visible in those "telescopic" forms of myelin, which was also true for the part of osmiophilic structures found within the cytoplasm even in the latest period of observation. However, most of the ingested osmiophilic material displayed more or less obliterated periodicity and was closely associated with amorphous osmiophilic debris as well as agglomerations of lipid droplets (Figs 7, 8). All the above mentioned osmiophilic structures were found within the cytoplasm of cells which displayed also bundles of intermediate filaments (Figs 6, 7, 8). Therefore, the cells might be positively identified as astrocytes. They formed the vast majority of the whole cell population in the latest period of observation and their processes, filled with bundles of gliofilaments, formed a solid glial scar. Oligodendroglia of somewhat denser than normal cytoplasm were rarely spotted and within it small number of lipid droplets, but no osmiophilic inclusions were noted. Pericytes present in perivascular spaces contained a moderate number of dense bodies but these cells never entered the CNS parenchyma.

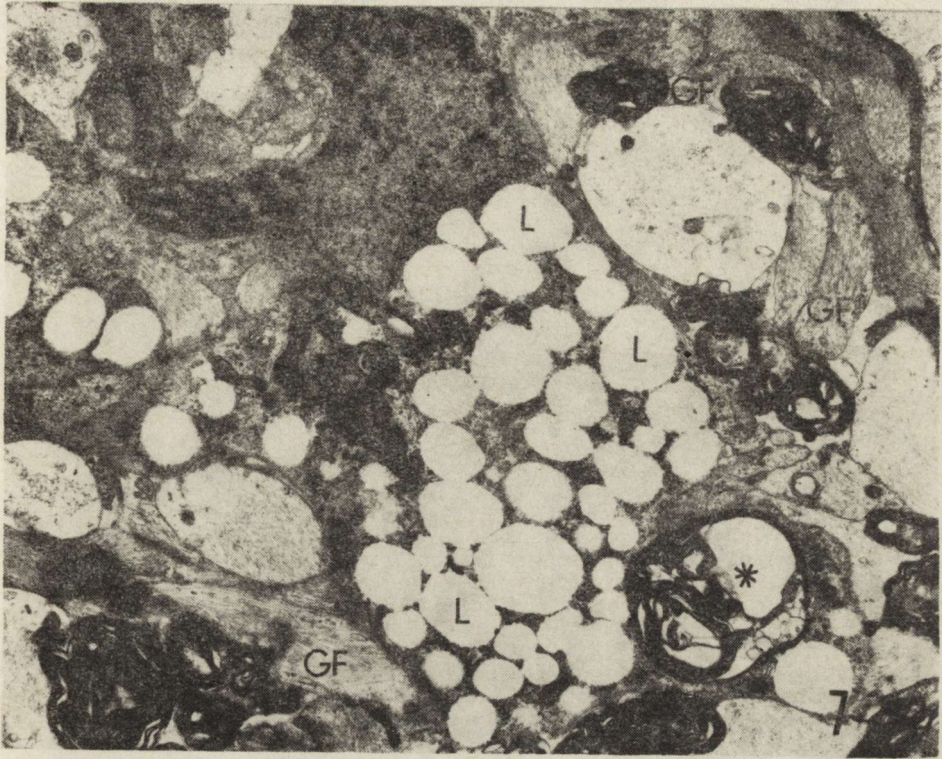


Fig. 7. Central Wallerian degeneration. 80 days after operation. The cell with nuclear features resembling classical microglia filled with many lipid droplets (L) and osmiophilic debris. Its short process completely encircled myelin ovoid (asterisk). Multiple processes containing intermediate filaments (GF) closely apposed to the other degenerated axons. $\times 4800$

Ryc. 7. Ośrodkowe zwyrodnienie Wallera. 80 dni po zabiegu. Jądro komórki posiada cechy upodabniające je do mikroglejowej. Cytoplazmę jej wypełniają liczne kule lipidowe (L), a jej krótką wypustka całkowicie otacza owoidę mielinową (gwiazdka). Liczne wypustki komórkowe zawierające włókienka klasy pośredniej (GF) ściśle przylegają do innych degenerujących aksonów. Pow. 4800 \times

Chronic TET intoxication

Within the first 24 hours of intoxication the cells identifiable as astrocytes displayed an increased number of polyribosomes (Fig. 9) and in some instances also extended areas of Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum. Their processes, filled with intermediate filaments have been seen to penetrate between individual axons and to border closely intermyelinic clefts of different size (Figs 9, 10). Oligodendrocytes also exhibited an increased number of polyribosomes and endoplasmic reticulum structures in their cytoplasm (Fig. 9). No infiltration with cells from the blood vessels has been observed.

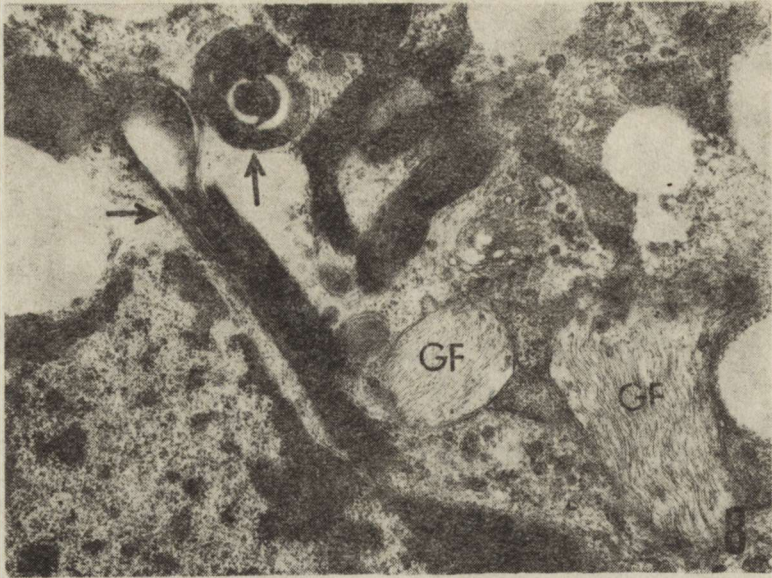


Fig. 8. Central Wallerian degeneration. 80 days after operation. The enlargement of perinuclear part of the cell presented in Fig. 7 reveals two processes filled with gliofilaments (GF) emerging from its perikaryon. Osmiophilic debris partially retain periodicity characteristic of myelin (arrows). $\times 14\,500$

Ryc. 8. Óśrodkowe zwyrodnienie Wallera. 80 dni po zabiegu. Powiększenie okołojądrowej części komórki przedstawionej na ryc. 7 ujawnia dwie wypustki wypełnione włóknami glejowymi (GF) odchodzące od jej okołojądrowej cytoplazmy. Złogi osmofilne częściowo zachowują budowę periodyczną zamienną dla mieliny (strzałki). Pow. 14 500 \times

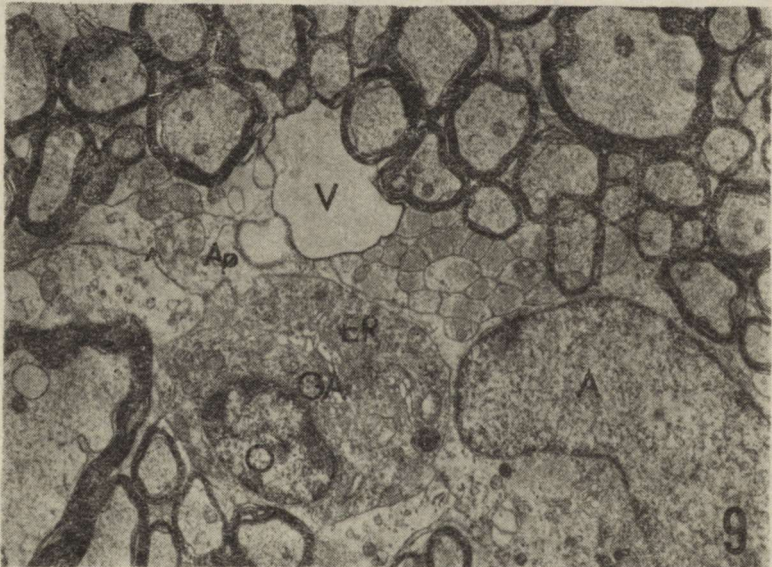


Fig. 9. TET intoxication. First day of intoxication. Astrocyte (A) sends its long process (Ap) apposing it to the large intermyelinic vacuole (V). In the cytoplasm of the oligodendrocyte (O) multiple cisternae of Golgi apparatus (GA) and channels of rough endoplasmic reticulum (ER). No morphological changes in myelinated axons could be observed. $\times 5\,400$

Ryc. 9. Zatrucie trójetylocyną. Pierwszy dzień zatrucia. Astrocyt (A) wysyła swą długą wypustkę (Ap) przylegającą do dużej wewnątrzmielinowej wakuoli (V). W cytoplazmie oligodendrocytu (O) liczne cysterny aparatu Golgiego (GA) oraz kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER). Zmielinizowane włókna osiowe są morfologicznie niezmiennione. Pow. 5 400 \times

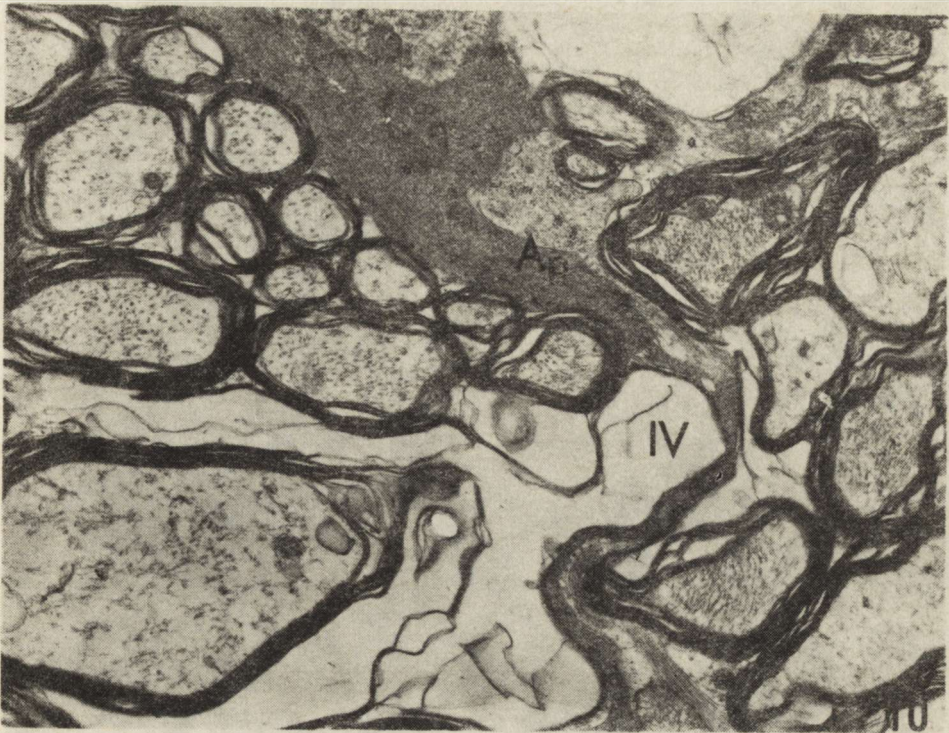


Fig. 10. TET intoxication. 24 hours of intoxication. Astrocytic process (Ap) filled with intermediate filaments penetrates between individual axons and closely borders large intramyelinic cleft (IV). $\times 18\ 000$

Ryc. 10. Zatrucie trójetylacyną. 24 godzina zatrucia. Wypustka astrocytu (Ap) wypełniona włóknkami klasy pośredniej penetruje pomiędzy poszczególnymi zmielinizowanymi włóknami osiowymi i przylega ściśle do brzegów dużej wakuoli wewnętrzmielinowej. Pow. 18 000 \times

Material taken from animals on day 28 and 42 of intoxication represented the period, when clinical recovery appeared. In fact, some regression of formerly observed alterations in myelin sheaths was observed. However, astrocytes retained their morphological characteristic of the earliest period of intoxication, and the presence of numerous cell processes filled with intermediate filaments in between individual myelinated axons was conspicuous (Fig. 11).

However, "intracellular edema" of astroglial cells was the phenomenon which attracted even more attention. Within the perikarya as well as in cell processes, sharply demarcated, electron-lucent areas of different size appeared. Sometimes membranous material could be observed within these usually empty spaces. Simultaneously, plasma membranes close to "edema zones" preserved their integrity, this holds true also

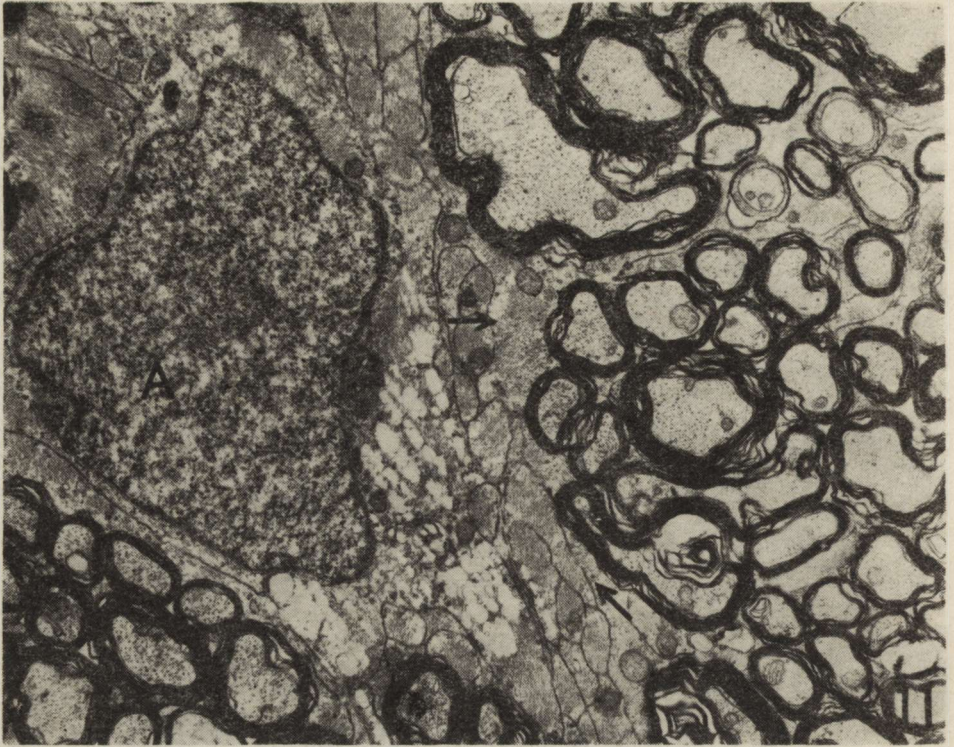


Fig. 11. TET intoxication. 28th day of intoxication. Numerous sharply delineated spaces of intracytoplasmic edema within astrocytic perikaryon (A). Otherwise, this astrocyte exhibits a normal structure of its plasma membrane, nucleus and cytoplasmic organelles. In between morphologically normal myelinated axons numerous processes filled with intermediate filaments are visible (arrows). $\times 4200$

Ryc. 11. Zatrucie trójetylocyną. 28 dzień zatrucia. Liczne, ostro odgraniczone obszary wewnątrzcytoplazmatycznego obrzęku widoczne są w perykarium astrocytu (A). Ponadto komórka ta wykazuje normalną strukturę swej błony cytoplazmatycznej, jądra oraz organelli cytoplazmatycznych. Pomędzy morfologicznie niezmiennymi zmielinizowanymi włóknami osiowymi widoczne są liczne wypustki wypełnione włóknkami klasy pośredniej (strzałki). Pow. 4200 \times

for the neighbouring cytoplasmic organelles (Figs 10, 11). Moreover, no nuclear changes could be seen in the cells which underwent intracytoplasmic edema. Small vessels were very often completely surrounded by swollen astroglial end-feet. However, no changes in endothelium, vascular basement membranes as well as no infiltration of CNS parenchyma with any cells from the vessels were observed (Fig. 12).

In none of the two described periods of observations could signs of phagocytosis be seen. Namely, no osmiophilic, myelin-like structures were observable either intracellularly or within extracellular spaces.

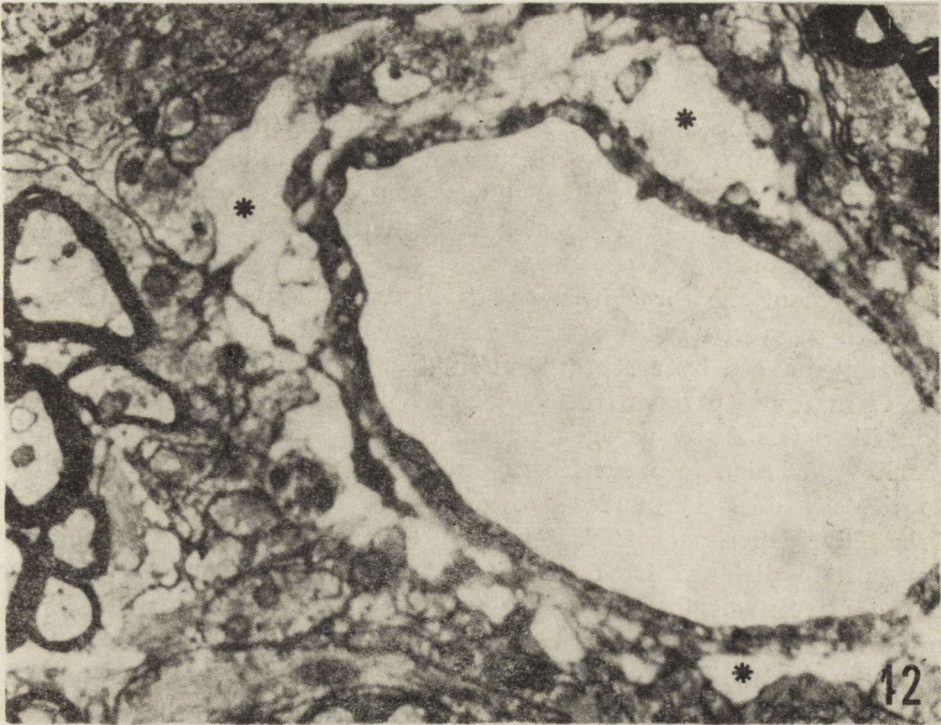


Fig. 12. TET intoxication. 42 day of intoxication. Swelling of perivascular astrocytic end-feet is visible (asterisks). The continuity of their plasma membranes as well as of the endothelial lining is retained. $\times 2500$

Ryc. 12. Zatrucie trójetylocyną. 42 dzień zatrucia. Obrzęk astrocytarnych okołonaczyniowych nózek ssących oznaczony gwiazdkami. Zachowana jest ciągłość zarówno ich błon cytoplazmatycznych, jak i warstwy komórek śródbłónka naczynia. Pow. $2500 \times$

DISCUSSION

The pathomorphology of white matter injury in the three above presented experimental models proved to be entirely different. The procedure which evokes "postpumping" myelopathy produced a shallow area of myelin injury within the border part of the upper cervical spinal cord, probably because of mechanical impairment of vascular supply (Bunge, Glass 1965) in the vasocorona territory. According to the classical description of Bunge et al. (1960), the area of lesion became invaded by the reactive neuroglial cells, which revealed bundles of gliofibrils within their copious cytoplasm.

Wallerian degeneration within the central nervous system is characterized by slowly progressing, simultaneous disruption of both axons and myelin. Their debris become engulfed by phagocytes. In due course, the degenerated structures are replaced by hypertrophied astrocytes and their processes (Aldskogius 1974).

The most characteristic phenomenon in chronic TET intoxication is the formation of intramyelinic clefts. Myelin lamellae delineating these electron-lucent spaces dissociate along intraperiod lines. At the time of occurrence the most severe clinical symptoms (third week of intoxication) accumulation of perivascular edematous fluid is also noted. It is postulated that consecutive clinical improvement could be rendered possible by some mechanisms of reabsorption of this fluid (Wender et al. 1982).

In each of the three here presented experimental processes the pathomechanism of myelin damage seems to be entirely different. In myelopathy induced by cerebrospinal fluid exchange, injury to white matter of marginal parts in the spinal cord is caused, according to Bunge and Glass (1965), by vasogenic edema. In Wallerian degeneration, after mechanical lesion to nerve fibers, axons and their myelin sheaths distal to the site of lesion undergo degenerative changes (Aldshogius 1974). When the experiment is performed properly and material is taken in appropriate distance from the site of lesion, accompanying vasogenic changes are negligible (Vaughn, Pease 1970; Goncerzewicz 1982 b). Finally, chronic TET intoxication causes cytotoxic edema of white matter (Eto, Suzuki 1971).

In spite of the differences, the nature and dynamics of astroglial morphological changes seem to be very similar in all the above presented experimental models. Beginning with the earliest periods of observations, the morphology of astroglial nuclei and cytoplasm is changed, always preceding perceptible indications of structural myelin disintegration. The most typical features of these reactive astrocytes include nuclei with heterochromatin spread towards euchromatin territory and with invaginated nuclear envelope; voluminous cytoplasm, much densier than in normal conditions, containing a number of polyribosomes, dense bodies, developed system of endoplasmic reticulum channels and of Golgi cisternae; finally, numerous processes containing intermediate filaments, penetrating between morphologically still unchanged myelinated axons.

Some authors have assumed that reactive cells of this kind represent, in fact, astrocytes dedifferentiating to their precursor forms, astroblasts (Fernando—Fernando 1973) or they represent an entirely new population of macroglia, intermediate between astrocytes and oligodendrocytes, capable of remyelination (Bunge et al. 1960). No significant grounds for a definitive opinion are available nowadays. The morphology of reactive astroglia is rather considered to reflect activation of metabolic processes, in response to CNS injury (Nathaniel, Nathaniel 1977). This point of view has been biochemically confirmed by Albrecht (1984), who showed in studies of the astroglial fraction from the early period of hepatic encephalopathy in rats that stimulation of RNA and protein synthesis precede the appearance of morphological changes.

It should be pointed out, however, that the astroglial reaction of morphological characteristics described above occurs in many pathological processes of various etiology and should by no means be considered specific for any of them. For instance, Friede (1962) described remarkable astroglial reaction on the border of cortical ischemic foci, when no parallel changes in white matter could be seen. Other authors have used different terms describing the astroglial reaction in the processes with myelin damage. Adams et al. (1965) pointed out that the two phenomena coexist only. Lassmann et al. (1980) in turn, stressed the variability in the extent of astroglial reaction in chronic relapsing experimental allergic encephalitis depending upon species studied as well as topographical differences.

However, the advent of improved techniques of electron microscopy has allowed more detailed observations on the morphology of astroglial reaction. Careful analysis of electron microscopic patterns of cWD in the myelinating optic nerve has enabled Fulcrand and Privat (1979) to demonstrate surface protrusions of reactive astrocytes, which developed into thin processes tending to wrap around degenerating axons or bundles of axons. Cook et al. (1973) have proven that astroglial hypertrophy in cWD is associated with formation of a peculiar plasma membrane configuration which has been observed in normal conditions. In previously published papers on Wallerian degeneration of adult (Goncerzewicz 1982) and myelinating (Goncerzewicz et al. 1982) rabbit optic nerve, the penetration of astroglial processes between bundles of degenerating axons has been clearly demonstrated. This paper described a similar phenomenon in three different models of experimental white matter injury. Therefore it is reasonable to say that development of close astroglial-myelin morphological contacts is an aspect of astroglial reaction as important as nuclear or cytoplasmic morphological changes. Furthermore, it may be assumed that a novel type of intercellular interactions has been demonstrated within the injured white matter.

These morphological reactive changes of astroglia might be, as a whole, considered a necessary step in "preparation" of these cells to phagocytosis and scar formation, i.e. two important functions performed by astroglia in later stages of white matter injury.

As far as phagocytosis is concerned, the long-lasting controversy referring to the type of cells capable of phagocytosis seems now to be settled. Among others, Vaughn and Pease (1970) and, then, Lemkey-Johnston et al. (1974) have proven that a graded phagocytic response takes place on the part of several different elements, depending upon the sort of noxious factor and its selectivity to individual components of nerve tissue and upon the extent of the lesion and degree of inflam-

mation involved. A general agreement exists that astrocytes belong to cell populations capable of phagocytosis.

The common trait of pathological processes presented here (i.e. post-pumping myelopathy, Wallerian degeneration of the optic nerve and TET intoxication) is the absence of infiltration of CNS parenchyma with circulating cells from the vascular bed. This should be considered an important factor which renders astrocytes capable of playing a primary role in phagocytosis of myelin debris. The morphological proof of this action involves the presence of osmiophilic structures within the cytoplasm of cells carrying bundles of intermediate filaments. In the earlier stages, engulfed fragments of discernible periodicity (characteristic of myelin) are visible. Later, the periodicity becomes more and more effaced and, finally, processes of intracellular degradation generate highly electron-dense, irregular, multilamellar or amorphous structures (probably of protein origin) and electron-lucent vacuoles, which probably represent the counterpart of digested myelin lipids (Bignami, Ralston 1969; Goncerzewicz 1982). Obviously, the extent of phagocytosis differs appreciably between the models, depending upon the extent of myelin damage. For instance, in cWD all the myelin sheaths are affected, whereas in postpumping myelopathy only a narrow rim of subpial white matter is involved. In the chosen period of observation in TET intoxication, no phagocytic activity of astroglia has been demonstrated. This is probably due to the fact that myelin changes in this model are essentially reversible. However, it should be noted that Wender et al. (1982) have demonstrated phagocytosed myelin within astroglial cells in the optic nerve of chronically TET-intoxicated rats.

As far as the latter experimental model is concerned, the "intracellular edema" of reactive astroglia occurring at a late stage of the pathological process has never up till now been described in details. Concomitantly with the still present intermyelinic vacuoles, astrocytic swelling produces a spongy appearance of the injured white matter. The preserved integrity of membranous structures, including plasma membranes of astrocytes displaying "edematous changes", rules out inadequate preservation as a possible source of artifact. The unchanged morphology of nuclear and cytoplasmic structures of the cells, in which intracellular edema has appeared, allows to exclude cell death as the background of these changes. Moreover, Hirano et al. (1968) in their ultrastructural studies have proven that vacuoles observable in TET intoxication do not communicate with extracellular space. Therefore, it should be concluded that in the pathological process presented here, selective, intracytoplasmic edema of reactive astrocytes has appeared. The phenomenon must have something in common with the astrocytic changes resulting from the action of various neurotoxic substances, as described by

Adornato and Lampert (1971). In fact, these cells appeared in the injured white matter at the time when clinical as well as biochemical recovery had taken place (Wender et al. 1983). Therefore, it may be assumed that astrocytes play some role in restoring the "status quo" at late stages of TET intoxication. This function may be analogous to that postulated by Noremberg (1981) in hepatic encephalopathy, in which astrocytes initially undergo hypertrophy in an attempt to detoxify ammonia. The described above characteristic pattern of astroglial reaction within the injured white matter has permitted some assumptions on the possible primary role of the reaction in myelin disintegration. First of all, observations of three different pathological processes have pointed to astroglia as one of the principal exponents of the process leading to myelin damage. Morphologically discernible activation of astroglia precedes visible signs of myelin disruption. In due course astroglial processes come into close contact with degenerating myelin and engulf it. This commences the process of its intracellular digestion. Another important function of astroglia within the injured white matter seems to involve a reparative role, including formation of glial scar and probably also detoxication.

CONCLUSIONS

1. In the described models of white matter injury (postpumping myelopathy, central Wallerian degeneration and TET intoxication) astrocytes with morphological features indicating an increased metabolic activity appeared before discernible features of structural myelin disintegration were noted.

2. At the earliest stages of postpumping myelopathy and central Wallerian degeneration, penetration of astroglial processes between as yet unchanged myelinated axons represents the first alteration in the succession of events, which terminate in phagocytosis and intracellular digestion of degenerated myelin. The phagocytizing cells were simultaneously engaged in the process of scar formation.

3. In the model of TET intoxication, selective intracytoplasmic edema which appeared in astroglia at the time of clinical recovery, may be considered as morphological proof of action of compensatory mechanisms involving astrocytes.

4. Astrocytes, as the cell population active in phagocytosis, scar formation and detoxication seem to demonstrate a novel type of interaction within the injured white matter. Some assumptions as to the important role of astroglia played in myelin disintegration are, therefore, put forward.

ROLA ASTROGLEJU W PROCESACH CHOROBYCH PRZEBIEGAJĄCYCH Z ROZPADEM MIELINY.

I. MORFOLOGIA ASTROGLEJU W DOŚWIADCZALNYM USZKODZENIU ISTOTY BIAŁEJ

Streszczenie

Przedmiotem badań była morfologia ultrastrukturalna reakcji astrogleju w różnych okresach doświadczalnego uszkodzenia istoty białej, wywołanego różnorodnymi procesami. Celem badań było prześledzenie powiązań reakcji astrogleju ze zjawiskiem rozpadu osłonek mielinowych, które było cechą wspólną wszystkich badanych modeli doświadczalnych. Badania wykazały, że formy astrogleju o morfologicznych cechach wzmoczonej aktywności metabolicznej pojawiają się w strefie zmian wcześniej niż oznaki morfologicznego rozpadu struktury osłonki mielinowej. Wykazano narastający w czasie proces penetracji wypustek astrogleju pomiędzy zmielinizowane włókna osiowe już w początkowych okresach rozpadu ich osłonek mielinowych. Kolejnym etapem tego zjawiska była fagocytoza uszkodzonej mielinę przez te wypustki, a następnie proces chemicznej degradacji fragmentów mielinowych w obrębie cytoplazmy astrocytów. Fagocytyjące komórki były równocześnie zaangażowane w proces tworzenia blizny glejowej. Obserwowany w okresie klinicznej poprawy w przebiegu przewlekłego zatrucia TET selektywny wewnątrzcytoplazmatyczny obrzęk astrogleju może być interpretowany jako wyraz mechanizmów kompensacyjnych, które działają w uszkodzonej tkance za pośrednictwem astrocytów. Na podstawie przytoczonych danych wysunięto wniosek, że astrocyty jako komórki aktywnie zaangażowane w proces fagocytozy, formowania blizny glejowej oraz odtruwania wytwarzają w uszkodzonej istocie białej nowy rodzaj strukturalnych i czynnościowych powiązań międzykomórkowych. Zaproponowano również możliwość spełniania przez astrocyty pierwotnej roli w procesie rozpadu mielinę.

РОЛЬ АСТРОГЛИИ В БОЛЕЗНЕННЫХ ПРОЦЕССАХ, ПРОТЕКАЮЩИХ С РАЗПАДОМ МИЕЛИНА.

I. MORFOLOGIA АСТРОГЛИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА

Резюме

Исследовалась ультраструктурная морфология астроглиальной реакции в различных периодах экспериментального повреждения белого вещества, вызванного разными процессами. Сущностью исследований была оценка связей астроглиальной реакции с явлением распада миелиновых оболочек, которое было общим признаком всех рассматриваемых экспериментальных модели. Исследования показали, что формы астроглии с морфологическими чертами усиленной метаболической активности появляются в зоне изменений раньше, чем признаки морфологического распада миелиновой оболочки. Показано нарастающий постепенно процесс проникновения отростков астроглии между миелинизированные нервные волокна в самых начальных стадиях распада их миелиновых оболочек. Очередным этапом этого явления был фагоцитоз поврежденного миелина этими отростками, а затем процесс химической деградации миелиновых фрагментов в цитоплазме астроцитов. Эти фагоцитирующие клетки принимали одновременно участие в процессе формирования глиозного рубца. Наблюдаемый во время клинического улучшения в течение хронической интоксикации TET селективное интрацитоплазматическое набухание астроглии может быть интерпретировано как проявление компенсаторных механизмов, действующих посредством астроцитов в поврежденной ткани.

На основании приведенных данных внушается, что астроциты, ангажированные в процесс фагоцитоза, формирования глиозного рубца и детоксикации формируют в поврежденном белом веществе новый вид структурных и функциональных межклеточных связей. Возможно также, что астроциты играют первоначальную роль в процессе распада миелина

REFERENCES

1. Adams C. W. M., Ibrahim M. Z. M., Leibowitz S.: Demyelination. In: Neuro-histochemistry, Ed.: C. Adams. Elsevier, Amsterdam, 1965, pp 437—487.
2. Adornato B., Lampert P.: Status spongiosus of nervous tissue. Electron microscopic studies. Acta Neuropath. (Berl.), 1971, 19, 271—289.
3. Albrecht J.: Enhanced RNA and protein synthesis *in vitro* in astrocytes derived from rats in the early stage of experimental hepatogenic encephalopathy. Acta Neurol. Scand., 1984, 70, 314—316.
4. Aldskogius H.: Indirect and direct Wallerian degeneration in the intramedullary root fibres of the hypoglossal nerve. An electron microscopic study in the kitten. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol., 1974, 50, 7—78.
5. Bignami A., Ralston H. J. III: The cellular reaction to Wallerian degeneration in the central nervous system of the cat. Brain Res., 1969, 13, 444—461.
6. Bunge R. P., Bunge M. B., Ris H.: Electron microscopic study in an experimentally induced lesion in adult cat spinal cord. J. Bioph. Biochem. Cytology, 1960, 7, 685—696.
7. Bunge R. P., Glass P. M.: Some observations on myelin-glial relationships and on the etiology of the cerebrospinal fluid exchange lesion. Ann. NY Acad. Sci., 1965, 122, 15—28.
8. Cook R. D., Raine S. C., Wiśniewski H. M.: On perivascular astrocytic membrane specialisations in monkey optic nerve. Brain Res., 1973, 57, 491—497.
9. Eto Y., Suzuki K.: Lipid composition of rat brain myelin in triethyltin induced edema. J. Lipid Res., 1971, 12, 570—579.
10. Fernando — Fernando D. A.: An electron microscopic study of the neuroglial reaction in Wallerian degeneration of the corticospinal tract. Acta anat., 1973, 86, 459—473.
11. Friede R. I.: An enzyme histochemical study of cerebral arteriosclerosis with some data on the pathogenesis of periarterial scars. Acta Neuropathol. (Berl.), 1962, 2, 58—72.
12. Fulcrand J., Privat A.: Neuroglial reaction secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: ultrastructural and quantitative study. J. comp. Neurol., 1979, 176, 189—224.
13. Goncerzewicz A.: Electron microscopic study of astrocytic reaction in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. Neuropat. Pol., 1982, 20, 47—60.
14. Goncerzewicz A., Biczysko W., Citowicki W.: Wallerian degeneration in the myelinating rabbit optic nerve. Neuropat. Pol., 1982, 20, 31—45.
15. Hirano A., Zimmermann H., Levine S.: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyltin intoxication. J. Neuropath. exp. Neurol., 1968, 27, 571—580.
16. Karnovsky M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 1965, 27, 137A—138A.
17. Lassmann H., Kitz K., Wiśniewski H. M.: Structural variability of demyelinating lesion in different models of subacute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. Acta Neuropath. (Berl.), 1980, 51, 191—200.
18. Lemkey-Johnston N., Butler V., Reynolds W. A.: Glial changes in a progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. J. comp. Neurol., 1974, 167, 487—502.

19. Mossakowski M. J.: Patologia komórkowa ośrodkowego układu nerwowego. In: *Podstawy Neuropatologii*. Eds: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa, 1981, pp. 64—101.
20. Nathaniel E. J. H., Nathaniel D. R.: Astroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 1977, 54, 60—76.
21. Nathaniel E. J. H., Nathaniel D. R.: The reactive astrocyte. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds: S. Fedoroff and L. Hertz. Academic Press, New York 1981, 2, pp. 249—301.
22. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds: S. Fedoroff and L. Hertz. Academic Press, New York, 1981, 2, pp. 304—354.
23. Vaughn J. E., Pease D. C.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. *J. comp. Neurol.*, 1970, 140, 207—226.
24. Wender M., Śniatała-Kamasa M., Piechowski A.: Myelin of the optic nerve in rats chronically intoxicated with triethyl tin sulfate (TET). *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 223—238.
25. Wender M., Zgorzalewicz B., Piechowski A., Spieszalski W., Bucholc M.: The pattern of myelin protein in triethyltin (TET) intoxication. *Exp. Pathol.*, 1983, 23, 193—195.

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

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO, EWA BERTRAND,
DANUTA MARKIEWICZ

ANALIZA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH W MOŚCIE
W PRZEBIEGU PRZEWLEKŁEGO ALKOHOLIZMU
ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM
MIELINOLIZY ŚRODKOWEJ MOSTU *

Zakład Neuropatologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

W przebiegu przewlekłej intoksykacji alkoholowej obserwuje się różnorodne zespoły chorobowe związane z uszkodzeniem określonych struktur anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego. Do najpóźniej wyodrębnionych jednostek chorobowych należy opisana w 1959 r. przez Adamsa, Victora i Mancalla mielinoliza środkowa mostu, charakteryzująca się sudanofilnym rozpadem osłonek rdzennych w częściach środkowych podstawy mostu oraz uszkodzeniem oligodendrogleju przy względnym zaoszczędzeniu komórek nerwowych i włókien osiowych.

W doniesieniach kazuistycznych obraz opisywanych zmian morfologicznych różni się często zarówno pod względem wielkości i lokalizacji, jak i intensywności uszkodzenia poszczególnych elementów strukturalnych mostu. Symptomatologia kliniczna zespołu jest również niejednorodna.

W obrazie klinicznym najczęściej dominuje zespół zaburzeń świadomości z dezorientacją w czasie i w przestrzeni, a w końcowym okresie stan śpiączki mózgowej; rzadziej spotyka się porażenie wszystkich kończyn, niedowład nerwu twarzowego oraz niemożność mówienia i połykania (Lereboullet, Escourolle 1962).

Prawidłowe rozpoznania przyżyciowe zespołu należą do rzadkości. Spotyka się je tylko sporadycznie w piśmiennictwie (Boudin i wsp. 1963; Paguirigan, Lefken 1969; Gross, Pfolz 1974; Seitelberger 1974).

* Praca wykonana w ramach CPBR VII.01 oraz wygłoszona na VII Konferencji Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich i V Polsko-Węgierskim Sympozjum Neuropatologicznym w Gdańsku. 4—6 czerwiec, 1957.

Celem niniejszego opracowania była szczegółowa ocena struktury i topografii zmian w móście, w przypadkach przewlekłego alkoholizmu. Interesujące wydawało się przy tym prześledzenie obrazu uszkodzenia mostu w zależności od wieku chorego oraz czasu trwania nałogu, jako przyczynek do wyjaśnienia patomechanizmu mielinolizy środkowej mostu.

MATERIAŁ I METODA

Materiał pochodzi ze zbiorów Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii i obejmuje 65 przypadków sekcyjnych chorych, nadużywających przewlekłe alkohol. Większość chorych (55 przypadków) zmarło w oddziałach psychiatrycznych.

Do badania histopatologicznego pobierano wycinki z mostu oraz z innych reprezentatywnych okolic ośrodkowego układu nerwowego*. Materiał zatapiano w parafinie. Skrawki barwiono fioletem krezylu, hematoksyliną i eozyną oraz według metod van Gieson, Spielmeyera, Bielschowskyego i Kanzler-Arendta.

Charakterystyka kliniczna

W grupie 65 przypadków było 59 mężczyzn i 6 kobiet, zmarłych w wieku od 24 do 78 lat. Średnia wieku wynosiła 52 lata. Okres nadużywania alkoholu u 26 chorych zamykał się w granicach od 5 do 29 lat, średnio trwał 15 lat; u 22 chorych wynosił powyżej 30 lat. U pozostałych 17 chorych w wywiadzie powtarzało się określenie „długo”. Ilości jednorazowo spożywanego alkoholu, jak i częstości jego nadużywania nie udało się ustalić.

W przebiegu nałogu u 29 chorych występowało majaczenie drżenne, u 7 — ostra lub przewlekła halucynozja alkoholowa, u 12 — napady padaczkowe, najczęściej typu grand mal.

Badaniem psychiatrycznym u wszystkich chorych stwierdzono zespół psychoorganiczny z degradacją alkoholową, doprowadzający w 19 przypadkach do ciężkiego otępienia.

W stanie neurologicznym w 36 przypadkach dominowały rozsiane objawy uszkodzenia układu nerwowego, najczęściej ataktyczne zaburzenia chodu, połowicze niedowłady lub bezwłady (12 przypadków), zwłaszcza w końcowym etapie życia. U 8 chorych występowała obwodowa polineuropatia.

Przyczyną zgonu w 22 przypadkach było majaczenie drżenne, u 11 chorych krwotok podtwardówkowy, u 6 — krwotok podpajęczynówko-

* Zmiany patologiczne mózgu części badanych przypadków zostały omówione szczegółowo w pracy E. Tarnowskiej-Dziduszko „Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie” (1978).

wy, śródmiażdżowy lub rozmiękanie nadnamiotowe. Pozostali chorzy zmarli wśród objawów wyniszczenia w przebiegu zapalenia płuc (18 przypadków), krwawienia z żyłaków przełyku (2 przypadki), bądź wrzodu żołądka (3 przypadki) i mocznicy (3 przypadki).

Badaniem anatomo-patologicznym w 50 przypadkach stwierdzono stłuszczenie i/lub marskość wątroby, w 38 — zwyrodnienie mięśnia sercowego, w 24 — uszkodzenie mięszu nerek. Owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy występowało w 20 przypadkach, a zapalenie płuc w 45.

WYNIKI

Badanie makroskopowe układu nerwowego

Badanie makroskopowe w 46 przypadkach wykazało zmiany zanikowe mózgu (zweżenie zakrętów z poszerzeniem rowków, zweżenie kory i istoty białej, różnego stopnia zanik części przedniej i środkowej spoidła wielkiego oraz poszerzenie rogów czołowych i skroniowych komór bocznych). Obrzęk mózgu obecny był w 31 przypadkach. Zmiany miażdżycowe w naczyniach podstawy II i III stopnia obserwowano w 18 przypadkach. Tylko w 4 stwierdzono obniżenie konsystencji tkanki w zakresie mostu z zatarciem zarysów jego struktury.

Badanie mikroskopowe mostu

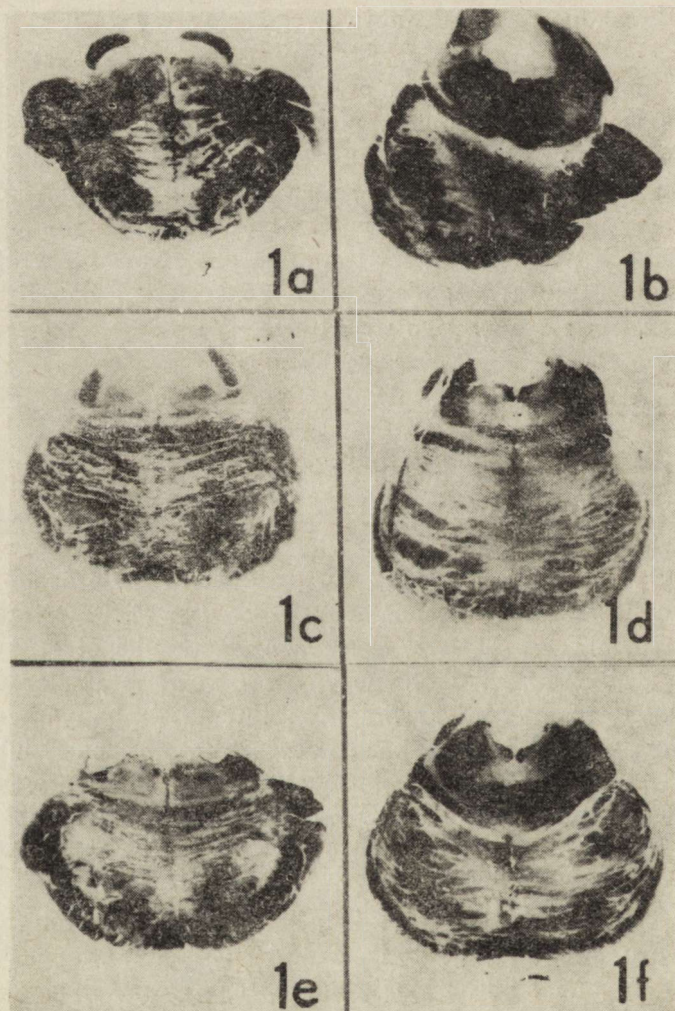
Naczynia śródmiażdżowe mostu włósniczki, tętniczki i tętnice w większości przypadków (48) były maksymalnie wypełnione krwią. Ich ściany uległy prawie pełnej przebudowie włóknistej, a często, bo w 30 przypadkach, były pogrubiałe. W 12 przypadkach stwierdzono zweżenie światła i częściowe zeszkliwienie ściany naczyniowej. Przestrzenie okołonaczyniowe niemal zawsze były poszerzone, a tkanka otaczająca je była rozluźniona i zgąbczała. Wokół naczyń obserwowano „jeziorka” włóknika. Niewielkich rozmiarów krwinkotoki kuliste i płomykowate obecne były w poszczególnych przypadkach w części nakrywkowej lub podstawnej mostu. W 2 przypadkach występowały nacieki zapalne wokół naczyń. Sporadycznie, bo tylko w 5 przypadkach, obserwowano wzmoczoną okołonaczyniową glejową włóknistą. W 10 przypadkach obecne były kłęбки naczyniowe.

W licznych przypadkach (47) komórki jąder własnych mostu oraz neurony tworzącego siatkowatego były nadmiernie obciążone lipofuscyną; często też były one obkurczone i hiperchromatyczne. Nierzadko obserwowano cienie komórkowe i obrazy tigrolizy centralnej. W jądrze miejsca sinawego w 7 przypadkach doszło do częściowego odbarwienia komórek nerwowych. Wyraźne opustoszenie neuronalne zarówno w struk-

turach tworzących siatkowate, jak i w jądrach własnych mostu, poza naczyniopochodnym uszkodzeniem, obecne było tylko w 7 przypadkach. Rzadko zwyrodnieniu komórek nerwowych towarzyszyła wzmożona satelitoza glejowa lub neuronofagia. Postacie przerostowe mikrogleju i grudki glejowe spostrzegano jedynie w 5 przypadkach, podobnie rzadko obserwowano nagie jądra glejowe (4 przypadki).

W zależności od rozległości uszkodzenia osłonek mielinowych i zachowania się włókien osiowych badany materiał podzielono na 4 grupy.

Do grupy I zaliczono 12 przypadków z rozlanym spłowieniem mielin oraz ogniskowym rozpadem osłonek. Spłowienie mielin było umiejscowione w części centralnej podstawy mostu (ryc. 1 a—f). W jednym przy-



Ryc. 1. a—f. Spłowienie mielin z ogniskowym rozpadem osłonek rdzennych położone w części centralnej podstawy mostu. Spielmeyer. Pow. lupowe

Fig. 1. a—f. Pallor of myelin with focal sheaths destruction, localized in central part of pontine basis. Spielmeyer. Magn. glass

padku uszkodzenie osłonek mielinowych przechodziło również na część dolną nakrywki (ryc. 2). Granice demielinizacji były nieregularne, od-cinkowo zatarte, gubiły się w otoczeniu. Mimo tych zmian rysunek anatomiczny mostu był dość dobrze widoczny.

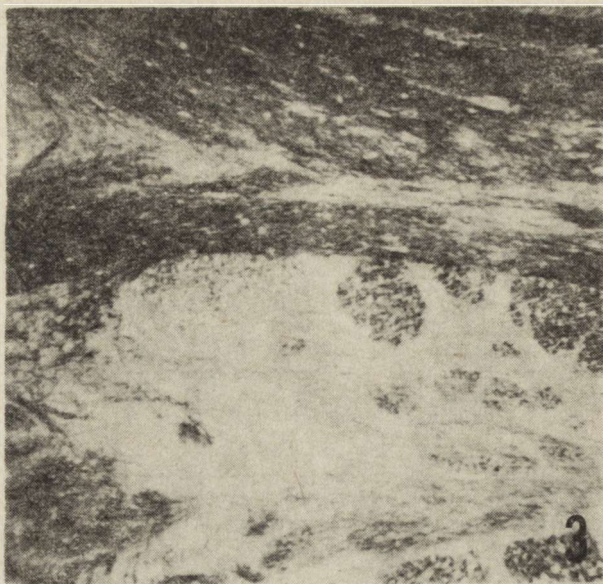


Ryc. 2. Destrukcja osłonek mielinowych podstawy mostu obejmująca dodatkowo część dolną nakrywki mostu. Spielmeyer. Pow. lupowe

Fig. 2. Destruction of myelin sheaths in the pontine basis involving partially inferior portion of tegmentum. Spielmeyer. Magn. glass

W polach spłowienia mieliny uszkodzeniu uległy zarówno osłonki włókien poprzecznych mostu, jak i włókien piramidowych (ryc. 3). Intensywność zmian w poszczególnych pęczkach zarówno grubych, jak i cienkich była niejednakowa. Obok spłowienia części pęczka obserwowano wrzecionowate lub kuliste deformacje osłonek z rozluźnieniem włókien bądź ogniska rozpadu mieliny (ryc. 4). Niekiedy w polu demielinizacji widoczne były pasma włókien z dobrze utrzymanymi osłonkami. Włókna osiowe były zazwyczaj zachowane, czasami ulegały niewielkiemu przeredzeniu i deformacji (ryc. 5). Można było natomiast dostrzec przerzedzenie komórek oligodendrogleju zwłaszcza w tych częściach spłowienia mieliny, w których uszkodzenie osłonek mielinowych było cięższe. Miejscami przybierało ono postać pełnej demielinizacji, równocześnie dość często obserwowano wtedy zgąbczenie podłoża tkankowego (ryc. 6). Między pęczkami włókien wokół zachowanych komórek oligodendrogleju widoczne było jasne „halo”.

Ugrupowania komórek nerwowych jąder własnych mostu, zarówno w polach spłowienia mieliny, jak i poza tymi obszarami, w 3 przypadkach uległy przeredzeniu. Poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej z „jeziorkami” włóknika, znaczne przekrwienie naczyń, przynaczyniowe krwinkotoki obserwowano w tej grupie przypadków zarówno w części nakrywkowej, jak i poza polami spłowienia mieliny — na obwodzie mos-



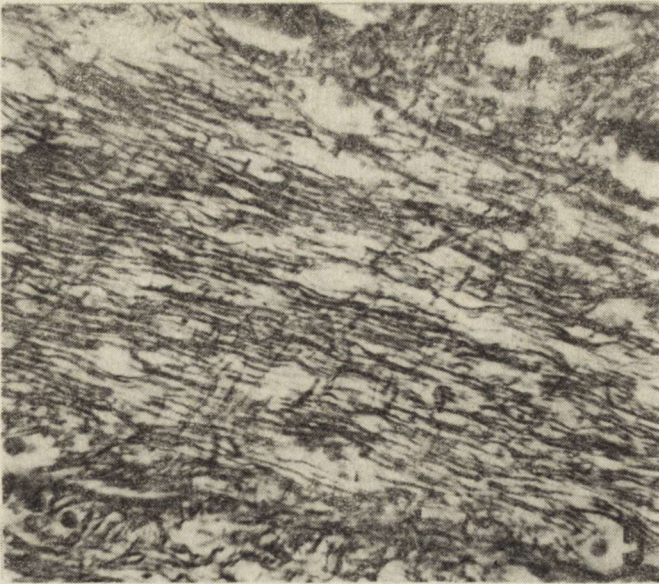
Ryc. 3. Ognisko demielinizacji w sąsiedztwie szwu części podstawnej mostu, obejmujące włókna poprzeczne i pęczek piramidowy. Spielmeyer. Pow. 60 ×

Fig. 3. Demyelination focus in the vicinity of the raphe of pontine basis, involving both transverse fibres and pyramidal bundle. Spielmeyer. × 60



Ryc. 4. Deformacja oraz rozpad osłonek mielinowych wśród prawidłowo zachowanych osłonek. Spielmeyer. Pow. 200 ×

Fig. 4. Deformation and disintegration of the same myelin sheaths, distributed among normal ones. Spielmeyer. × 200



Ryc. 5. Przerzedzenie włókien osiowych w polu uszkodzenia osłonek mielinowych w pęczkach poprzecznych mostu. Bielschowsky. Pow. 400 ×

Fig. 5. Decreased number of axoncyllinders in the area of damaged myelin sheaths, involving transverse pontine fibres. Bielschowsky. × 400

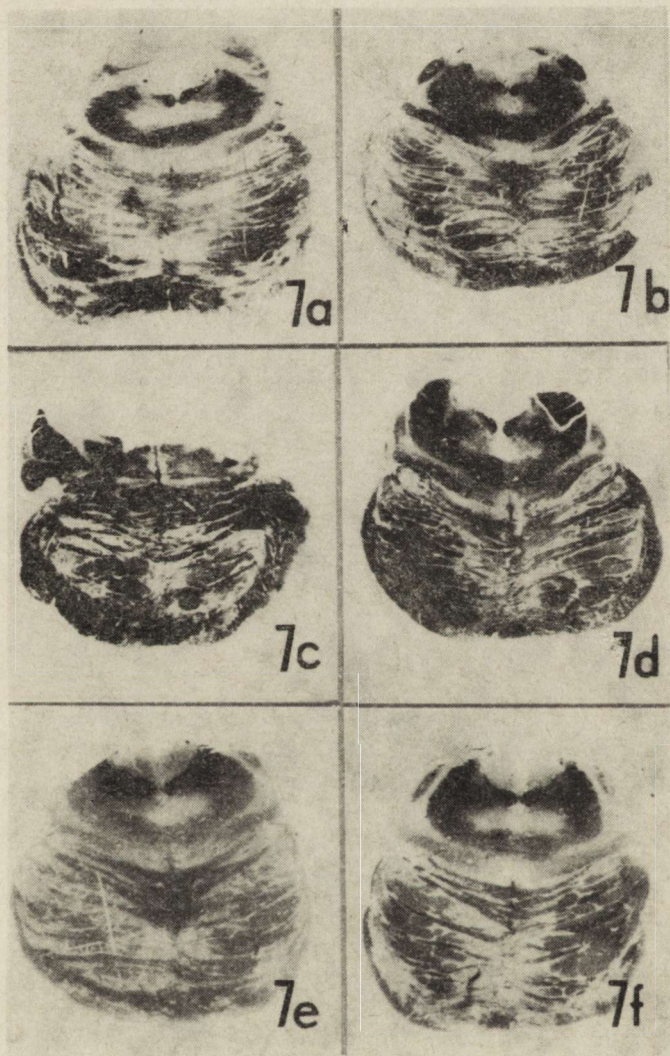


Ryc. 6. Zgąbczenie podłoża i ubytki komórek oligodendrogleju. H—E. Pow. 100 ×

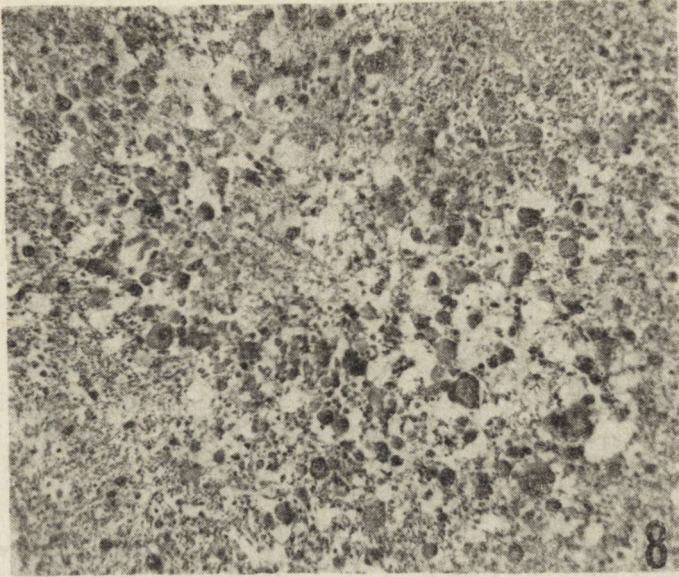
Fig. 6. Tissue spongiosis with loss of oligodendroglial cells. H—E. × 100

tu. Przekrwienie i zastój miały charakter ogniskowy. Naczynia śródmiąższowe były zwłókniałe. Dotyczyło to zarówno włóściczek, jak i tętniczek.

W grupie II obejmującej 14 przypadków smugowate lub okrągłe pola spłowienia i demielinizacji osłonek były zlokalizowane zazwyczaj w części centralnej podstawy mostu, mniej lub bardziej symetrycznie po obu stronach szwu (ryc. 7 a—f). Uszkodzenie osłonek mielinowych czasami obejmowało całe pęczki piramidowe lub część ich przekroju, jak i włókien poprzecznych mostu. We włóknach osiowych nie stwierdzono zmian.



Ryc. 7. a—f. Pola spłowienia mielin i rozpadu osłonek rdzennych zlokalizowane symetrycznie po obu stronach szwu podstawy mostu. Spielmeyer. Pow. lupowe
 Fig. 7. a—f. Areas of myelin pallor and disintegration of medullary sheaths, localized symmetrically on both sides of raphe in basal pons. Spielmeyer. Magn. glass



Ryc. 8. Zmiany zwyrodnieniowe włókien osiowych — obrazy sferoidów aksonalnych. Bielschowsky. Pow. 400 ×

Fig. 8. Degeneration of axon cylinders in the form of axonal spheroids. Bielschowsky. × 400

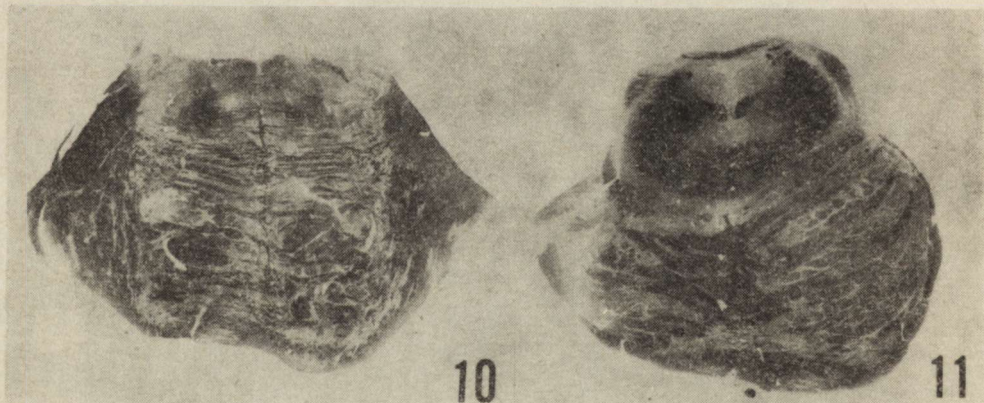


Ryc. 9. Odnaczyniowe szerzące się ogniska zgąbczenia tkanki obejmujące ugrupowania komórek jąder własnych mostu. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 9. Foci of tissue spongiosis spreading from the perivascular areas, involving some group of pontine neurons. H—E. × 200

Podobnie nie było widocznych ubytków neuronów ani zmian o charakterze odczynu glejowego. W poszczególnych przypadkach można było natomiast prześledzić mniej lub bardziej nasilone cechy obrzęku okołonaczyniowego, przekrwienie i zastój. W naczyniach krwionośnych z reguły obserwowano zwłóknienie bez wyraźnych cech pogrubienia ściany ani zwężenia światła.

W III grupie, obejmującej 15 przypadków, obserwowano niewielkie ogniska spłowienia i rozpadu mieliny rozrzucone w sposób nieuporządkowany, asymetrycznie w obrębie podstawy mostu. W obszarach tych, poza uszkodzeniem mieliny, stwierdzano ubytki i zmiany zwyrodnieniowe włókien osiowych. Częste były obrazy sferoidów (ryc. 8). Zgębczenie widoczne w polach rozpadu mieliny przechodziło nierzadko na ugrupowania komórkowe jąder własnych mostu szerząc się na ogół odnaczyniowo (ryc. 9). Obok opisanych powyżej nieprawidłowości obserwowano ogniska pełnego rozpadu tkanki w fazie rozbiórki makrofagowej oraz rozsiane ubytki neuronów z odczynem proliferacyjnym gleju komórkowego. Często były w tych razach obrazy ostrego obrzmienia neuronów, neuronofagia i grudki glejowe, a zmiany demielinizacyjne, o charakterze zwyrodnienia wtórnego, obejmowały wybiórczo bądź znaczne obszary szlaków piramidowych (ryc. 10) lub pojedyncze ich pęczki. W dwóch przypadkach z tej grupy, w przebiegu wgłobienia struktur nadnamiotowych, obserwowano martwicę obrzękową umiejscowioną w bocznej części podstawy mostu (ryc. 11). Zwyrodnienie naczyń śródmiąższowych mostu było bardziej nasilone w porównaniu z tego typu zmianami w obu poprzednich

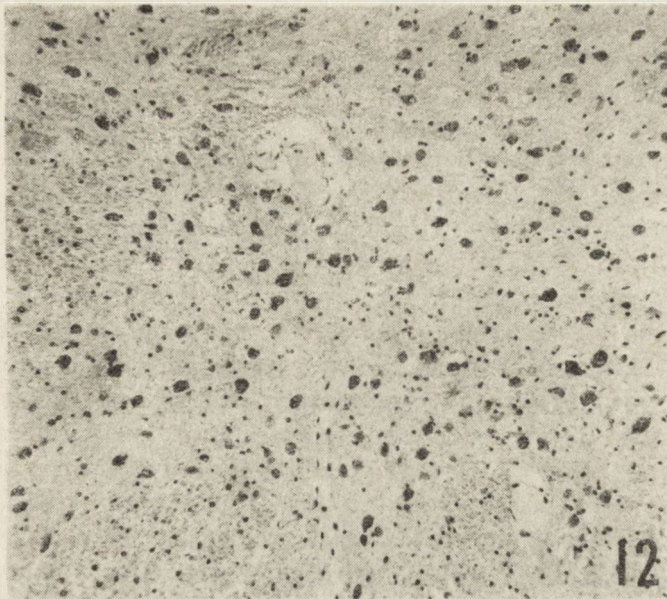


Ryc. 10. Ogniskowe uszkodzenie mieliny w drogach piramidowych o charakterze zwyrodnienia wtórnego (blizny w strukturach zlokalizowanych nadnamiotowo). Spielmeyer. Pow. lupowe

Fig. 10. Secondary degeneration of nerve fibres in the pyramidal tract, resulting from supratentorial brain damage. Spielmeyer. Magn. glass

Ryc. 11. Zgębczenie bocznej części podstawy mostu w przypadku jednostronnego wgłobienia podnamiotowego. Spielmeyer. Pow. lupowe

Fig. 11. Spongiosis of lateral portion of pontine basis in a case of unilateral sub-tentorial herniation. Spielmeyer. Magn. glass



Ryc. 12. Zgąbczenie okołonaczyniowe tkanki mostu. H—E. Pow. 200 ×
 Fig. 12. Perivascular spongiosis of pontine structure. H—E. × 200

grupach. Zeskliwienie ścian tętniczek i tętnic oraz zwężenie ich światła obserwowano w 10 przypadkach tej grupy.

W grupie IV, obejmującej pozostałe 24 przypadki badanego materiału, w 5 przypadkach obecne były kuliste lub płomykowate krwotoki zlokalizowane w części środkowej podstawy mostu oraz na jej pograniczu z nakrywką. Występowały one w przypadkach wylewów podtwardówkowych. W dwóch przypadkach przewlekłej halucynozji alkoholowej stwierdzono nacieki limfocytarne wokół naczyń mostu. Uszkodzenie osłonek mielinowych w większości przypadków tej grupy ograniczało się do zgąbczeń okołonaczyniowych rozsianych w całym moście (ryc. 12). Ściany naczyń śródmiąższowych były najczęściej zwłókniałe i pogrubiałe.

OMÓWIENIE

W badanym materiale przewlekłego alkoholizmu w grupie I, liczącej 12 przypadków, stwierdzono zespół zmian strukturalnych odpowiadający kryteriom morfologicznym niezbędnym dla rozpoznania mielinolizy środkowej mostu. Wiek chorych tej grupy zamykał się w granicach od 34 do 76 lat, przy czym aż 1/3 chorych zmarła między 34 a 42 rokiem życia. Na ten przedział wieku przypada, według danych z piśmiennictwa (Goebel, Herman-Ben Zur 1972; Gross, Pfolz 1975), szczyt występowania mielinolizy centralnej mostu. Wszyscy chorzy przewlekłe, zazwyczaj od kilkudziesięciu lat, nadużywali alkoholu i byli wielokrotnie hospitalizo-

wani na oddziałach psychiatrycznych. U 3 chorych obecne było głębokie otępienie, u wszystkich pozostałych znacznie nasilony zespół psychodegradacji alkoholowej. Pięciu chorych zmarło w przebiegu majaczenia drżennego, a 1 wśród objawów halucynozy alkoholowej. Wszyscy wykazywali cechy mniej lub bardziej nasilonego wyniszczenia ze znacznym odwodnieniem i zakłóceniami gospodarki elektrolitowej, znamienne często spostrzeganymi w majaczeniu alkoholowym (Tavel 1962; Jacob, Spalke 1971). U żadnego z chorych, podobnie zresztą jak w większości doniesień kazuistycznych, nie rozpoznano klinicznie mielinolizy środkowej mostu. Z zestawienia doniesień kazuistycznych (Goebel, Herman-Ben Zur 1972) wynika, że na sto opisanych morfologicznie przypadków zespołu przypadają jedynie dwa prawidłowe rozpoznania przyżyciowe. Część trudności diagnostycznych wynika z faktu, iż mielinoliza środkowa mostu zwykle nie występuje w sposób izolowany, towarzyszą jej natomiast nieprawidłowości innych struktur ośrodkowego układu nerwowego (oun) zacierające objawy uszkodzenia mostu (Mathieson, Olszewski 1960; Aleü, Terry 1963; Berry, Olszewski 1963; Goebel, Herman-Ben Zur 1972; Seitelberger 1974), zwłaszcza przedwczesne starzenie się oun, a szczególnie układu limbicznego odpowiedzialnego za prawidłowe funkcje mnesyczne. Ten zespół zmian opisano w naszym materiale przewlekłego alkoholizmu (Tarnowska-Dziduszko 1978).

Podobnie jak w opisach innych autorów (Goebel, Herman-Ben Zur 1972; Gross, Pfolz 1975; Okeda 1974; Seitelberger 1974), spostrzegane przez nas uszkodzenie mostu w przebiegu mielinolizy środkowej mostu było zróżnicowane zarówno, co do wielkości obszaru spłowienia mieliny, nasilenia uszkodzenia osłonek rdzennych, jak i przebudowy włóknistej ścian naczyń, czy nasilenia zwyrodnienia neuronów w ugrupowaniach jądrowych mostu. Może to być wyrazem indywidualnej wrażliwości na zadziałanie czynnika szkodliwego.

Etiologia i patogeneza zespołu chorobowego mimo wieloletnich badań i obserwacji nie są jednoznacznie wyjaśnione. Zespół charakterystycznego uszkodzenia mostu poza przewlekłą intoksykacją alkoholową opisywano i w innych schorzeniach doprowadzających do długotrwałych stanów odwodnienia oraz wyniszczenia. Spostrzegano go w zakażeniach wirusowych (Mathieson, Olszewski 1960), w ropniu podtwardówkowym (Bailey i wsp. 1960), w następstwie ciężkich urazów czaszki u dzieci (Minauf, Jellinger 1970) i u dorosłych (Seitelberger, Jonasz 1970), w przebiegu choroby Wilsona i innych schorzeń wątroby (Seitelberger 1974), w zakrzepie żyły Galena (Landers i wsp. 1965), czy w białaczce (Minauf, Krepler 1969; Okeda 1974).

Nie ma również jednolitego poglądu na temat patomechanizmu i ewolucji stwierdzonych uszkodzeń. Większość autorów uważa, że u podłoża zmian leży uszkodzenie oligodendrogleju, w konsekwencji którego dochodzi do przerwania wytwarzania mieliny bądź też do produkcji nie-

pełnowartościowych lipidów osłonek mielinowych. Na podstawie prac doświadczalnych (Hirano i wsp. 1967; Bass 1967) podkreśla się szczególną wrażliwość oligodendrogleju pnia mózgu, a zwłaszcza mostu na intoksykację (Paguirigan, Lefken 1969). Okeda (1974) uważa, że przyczyną uszkodzenia oligodendrogleju jest anoksja oligemiczna, wywołana nagłymi spadkami ciśnienia krwi, anamnesticznie uchwytnymi u znacznego odsetka chorych zmarłych z powodu mielinolizy środkowej mostu. Autor zwraca uwagę na słabiej rozwinięte unaczynienie istoty białej mostu i zjawisko tzw. vascular steal. Na podstawie obserwacji klinicznej McCormick i Danneel (1967) przypuszczają, że nagłe nawodnienie chorego wyniszczonego może sprzyjać rozwojowi obrzęku mózgu, co w konsekwencji miałyby prowadzić do wybiórczego uszkodzenia mieliny. Seitelberger (1974) uważa, że podstawowym czynnikiem powodującym zmiany demielinizacyjne mostu jest dystrofia glejowa zarówno oligo-, jak i astrogleju, spowodowana zaburzoną czynnością wątroby, szczególnie często obserwowana u alkoholików. Współuczestniczyć w tym mają zjawiska immunopatologiczne.

W świetle przytoczonych poglądów powstanie rozlanej demielinizacji w centralnych częściach podstawy mostu jest zjawiskiem patogenetycznie złożonym. Może być wywołane zarówno przez bezpośrednie działanie substancji toksycznych, jak i nałożenie się szeregu dodatkowych czynników o typie zaburzeń naczynioruchowych i nieprawidłowości gospodarki elektrolitowej.

Zmiany demielinizacyjne mają rozwijać się z drobnych ognisk uszkodzenia mieliny, poszerzających mimośrodkowo swoje rozmiary, w przebiegu procesu chorobowego (Schneck 1966). W związku z powyższym wydaje się, że stwierdzone w grupie II naszego materiału (obejmującej 14 przypadków) niewielkie ogniska uszkodzenia osłonek mielinowych, zlokalizowane w części podstawnej mostu i położone zazwyczaj symetrycznie po obu stronach szwu, bez cech wybiórczości w stosunku do układów anatomicznych, ze względny zaoszczędzeniem włókien osiowych, mogą być uznane za wczesne stadia mielinolizy środkowej mostu, bądź też za jej postać poronną. Zagadnienia tego nie można jednak jednoznacznie rozstrzygnąć. Podobnie jak w grupie I uszkodzenia te występowały częściej (8 chorych) między 24 a 45 rokiem życia. Najstarszy chory miał 70 lat. Trzech chorych zmarło w przebiegu majaczenia drżennego. Stwierdzone w tej grupie przypadków zmiany można było stosunkowo dobrze zróżnicować z ogniskami uszkodzenia mieliny, powstającymi na podłożu naczyniowym lub zwyrodnieniowym w następstwie nadnamiotowych uszkodzeń oun, spostrzeganych w grupach III i IV przedstawionego materiału.

Jak już wspomniano poprzednio, obserwowane uszkodzenia mieliny, rozlane lub ogniskowe, rozwijały się przy równoczesnej znacznie nasilonej przebudowie włóknistej i/lub zeszkliwieniu ścian naczyń śródmiąż-

szowych mostu. Towarzyszyło im znaczne zwyrodnienie barwnikowe neuronów, przy skąym odczynie rozrostowym i przerostowym komórek glejowych. Na podstawie danych z piśmiennictwa (Pentschew 1958; Seitelberger, Gross 1962; Colmant 1965; Tarnowska-Dziduszko i wsp. 1978) wydaje się, iż zmiany te należy wiązać raczej z przewlekłą intoksykacją alkoholową.

PODSUMOWANIE

W przypadkach przewlekłego alkoholizmu, niezależnie od wieku chorego, obserwowano w strukturach mostu znacznie nasilone zmiany inwolucyjne przyjmujące postać zwyrodnienia tłuszczowego i schorzenia przewlekłego neuronów jąder własnych mostu oraz jąder tworzącego siatkowego. Naczynia śródmiąższowe ulegały zazwyczaj znacznej przebudowie włóknistej rzadziej zeszkliwieniu, a ich światło przewężeniu. Utkanie mostu wokół naczyń krwionośnych było często rozluźnione i zgąbczałe. W otoczeniu naczyń zwłaszcza w nakrywce i na obrzeżu mostu obecne były krwinkotoki. W przypadkach z naczyniopochodnym uszkodzeniem struktur mostu uderzała nikła reakcja rozplemowa i przerostowa komórek glejowych. Uszkodzenie osłonek mielinowych przebiegające z destrukcją włókien osiowych i obrazami sferoidów aksonalnych było bądź ograniczone do określonych struktur anatomicznych, i miało charakter zwyrodnienia wtórnego występującego w przebiegu nadnamiotowego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, bądź też występowało w obszarach zgąbczeń tkankowych szerzących się odnaczyniowo.

Rozlane spłowienia mieliny z ogniskowym rozpadem osłonek rdzeniowych przy równoczesnym zaoszczędzeniu włókien osiowych i zubożeniu ilości komórek oligodendrogleju położone w częściach centralnych podstawy mostu obecne w około 1/5 ogólnej liczby badanych przypadków, odpowiadało diagnostycznym kryteriom mielinolizy środkowej mostu. Smugowate i kuliste spłowienia mieliny z ogniskowym rozpadem osłonek, zachowanymi włóknami osiowymi, zlokalizowane zazwyczaj symetrycznie po obu stronach szwu części podstawnej mostu obserwowano również w 1/5 przypadków. Zmiany tego typu uznano za wczesną fazę mielinolizy środkowej mostu bądź też za jej postać poronną.

Zarówno rozlane, jak i smugowate lub kuliste uszkodzenia mieliny położone w częściach centralnych podstawy mostu występowały na tle znacznie nasilonych zmian inwolucyjnych w jego strukturach jądrowych, przy silnym zwłóknieniu ścian naczyń śródmiąższowych i rozluźnieniu utkania okołonaczyniowego, nawet w przypadku chorych młodszych, zmarłych między 34 a 42 rokiem życia. Na uwagę zasługuje równoczesne uszkodzenie narządów miąższowych u tych chorych, w tym przede wszystkim stłuszczenie i marskość wątroby oraz zwyrodnienie mięśnia sercowego.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE PONTS IN THE COURSE
OF CHRONIC ALCOHOLISM WITH PARTICULAR REFERENCE
TO CENTRAL PONTINE MYELINOLYSIS

Summary

The structure of the pons and topography of its alterations were evaluated in 65 patients with diagnosis of chronic alcoholism who died at the age of 24 to 78 years. The pons belongs to structures particularly sensitive to the toxic action of ethanol.

The period of alcohol abuse by the patients under study varied from 15 to 30 years.

In dependence on the extent of myelin sheaths lesions and preservation of the axonal fibers the material was divided into four groups.

To group I, 12 cases were classified with diffuse myelin pallor and focal sheath disintegration both located in the central part of the pons, and involving its transverse fibers and pyramidal bundles. The axons were preserved but the number of oligodendroglial cells was diminished. This group corresponds to the diagnostic criteria of central pontine myelinolysis.

Group II included 14 cases with streak-like areas of myelin pallor and sheath disintegration, usually lying symmetrically on both sides of the raphe of the pons base. The nerve fibres in the involved areas were well preserved. Cases included into this group were considered as either initial stage or abortive form of central pontine myelinolysis.

In group III comprising 15 cases small foci of myelin pallor and disintegration with damaged axonal fibers showing pattern of axonal spheroids were either irregularly dispersed in the pons base or had the character of secondary degeneration connected with supratentorial lesions of the central nervous system. The character of the degeneration in this group indicates its vasogenic pathogenesis.

In group IV of 24 cases demyelination with damage to axonal fibers was limited to disseminated perivascular spongy foci in the whole pons, being probably of vascular origin.

The complex pathomechanism of central pontine myelinolysis and its connection with chronic alcohol intoxication as well as the difficulty of intra vitam diagnosis of the syndrome are discussed.

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ВОРОЛИЕВОМ МОСТЕ
В ХРОНИЧЕСКОМ АЛГОХОЛИЗМЕ С ОСОБЫМ УЧЕТОМ MYELINOLYSIS
CENTRALIS PONTIS

Резюме

У 65 больных с диагнозом хронического алкоголизма, умерших в возрасте 24–78 лет исследовались структура и топография изменений в воролиевом мосте принадлежающим к структурам особенно чувствительным к токсическому действию этанола. Период злоупотребления алкохоля длится от 15 до 30 лет.

В зависимости от величины нарушения миелиновых оболочек и состояния нервных волокон материал был разделен на 4 группы:

I группа состояла с 12 случаев с диффузным побледнением миелина, с очаговым разпадом оболочек в центральной части моста, захватывающим как его поперечные волокна, так пирамидные пучки. Нервные волокна были сохранены, количество клеток олигодендроглии было уменьшено. Эта группа отвечала диагностическим критериям центрального миелинолиза.

Во II группе состоявшей с 14 случаев полосатые поля побледнения и разпада оболочек были преимущественно локализованы симметрически, с обеих сторон шва в основании моста. Нервные волокна были в этих местах сохранены. Этот тип изменений является начальным фазом центральной мостовой миелинолизы.

В III группе состоявшей с 15 случаев, небольшие очаги побледнения и разпада миелина с повреждением нервных волокон с картиной аксональных сфероидов, были или беспорядочно разбросаны в основании моста, часть изменений проявляла черты вторичной дегенерации, связанной с наднаметным повреждением центральной нервной системы. Вид изменений в этой группе показывает на их сосудистое происхождение.

В IV группе, обнимающей 24 случая, демиелинизация с повреждением нервных волокон ограничивалась к рассеянному околососудистому спонгиозу во всем мосте, вероятно сосудистого происхождения.

Обсуждается сложный патомеханизм появления центральной мостовой миелинолизы ее связь с хронической интоксикацией алкоголем и трудности прижизненного диагноза синдрома.

PISMIENICTWO

1. Adams R. D., Victor M., Mancall N. L.: Central pontine myelinolysis. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.), 1959, 81, 154—172.
2. AleÛ F. P., Terry R. D.: Central pontine myelinolysis. Arch. Path., 1963, 76, 140—146.
3. Bailey O. T., Bruno M., Ober W. B.: Central pontine myelinolysis. Amer. J. Med., 1960, 29, 902—906.
4. Bass N. H.: Experimental cyanide encephalopathy: Microchemical evidence for the selective vulnerability of glia. Neurology, 1967, 17, 303—312.
5. Berry K., Olszewski J.: Central pontine myelinolysis. Neurology, 1963, 13, 531—537.
6. Boudin G., Labet R., Lyon G., Brunet P.: La myélinolyse centrale de la protubérance. Presse Med., 1963, 71, 2080—2082.
7. Colmant H. J.: Enzephalopathien bei chronischen Alkoholismus. Enke, Stuttgart, 1965,
8. Goebel H. H., Herman-Ben Zur P.: Central pontine myelinolysis. Brain, 1972, 95, 495—504.
9. Gross H., Pfolz H.: Neuropathologische Befunde und klinisches Korrelat bei Alkoholencephalopathien. Neuropat. Pol., 1975, 13, 333—341.
10. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy. Electron microscopic observations of early lesions in white matter. J. Neuropath. exp. Neurol., 1967, 26, 200—212.
11. Jacob H., Spalke G.: Klinik und Neuropathologie zentralnervöser Komplikationen nach akuten Elektrolyt- und Wasser-haushaltsstörungen unter besonderer Berücksichtigung der zentralen pontinen Myelinolyse. Fortsch. Neurol. Psychiat., 1971, 39, 169—191.
12. Landers J. W., Chason J. L., Samuel V. N.: Central pontine myelinolysis. A pathogenetic hypothesis. Neurology, 1965, 15, 968—971.
13. Lereboullet J., Escourolle R.: Le Revue du Practicien, 1962, 12, 881—915.
14. Mathieson G., Olszewski J.: Central pontine myelinolysis with other cerebral changes. Neurology 1960, 10, 345—355.
15. McCormick W. F., Danneel G. M.: Central pontine myelinolysis. Arch. Int. Med., 1967, 119, 444—478.
16. Minauf M., Krepler K.: Zentrale pontine Myelinolyse bei einem Kind mit Leukemie. Arch. Kinderheilk., 1969, 180, 55—65.

17. Minauf M., Jellinger K.: Zentrale pontine Myelinolyse bei einem Kind mit protrahiertem posttraumatischem Koma. *Neuropädiatrie*, 1970, 2, 107—111.
18. Okeda R.: Centrale pontine Myelinolyse. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1974, 27, 233—246.
19. Paguirigan A., Lefken E. B.: Central pontine myelinolysis. *Neurology*, 1969, 19, 1007—1011.
20. Pentschew A.: Aethylalkoholvergiftung. W: *Hdb. spez. path. Anat. Histol. Red.*: O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle. Springer, Berlin, 1958, 13/2, 2214—2262.
21. Schneck S. A.: Neuropathological features of human organ transplantation. II. Central pontine myelinolysis and neuroaxonal dystrophy. *J. Neuropath. exper. Neurol.*, 1966, 25, 18—39.
22. Seitelberger F.: Central pontine myelinolysis. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 247—251.
23. Seitelberger F., Gross H.: Zur Neuropathologie des Alkoholismus. W: *Arbeitstagung über Alkoholismus. Red.*: Krispin Exner. E. Werner, Wien, 1962, pp. 12—30.
24. Seitelberger F., Jonasz G.: Zentrale pontine Myelinolyse nach Schädeltrauma. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1970, 197, 28—41.
25. Tarnowska-Dziduszko E.: Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 588—597.
26. Tarnowska-Dziduszko E., Markiewicz D., Szemis L.: Morfologia śródmiaższowych naczyń krwionośnych mózgu w przewlekłym alkoholizmie. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 399—412.
27. Tavel M. E.: A new look at an old syndrome: delirium tremens. *Arch. Intern. Med.*, 1962, 109, 129—134.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

RYSZARD PLUTA

WPLYW PROSTACYKLINY NA ULTRASTRUKTURĘ KORY MÓZGU
KRÓLIKA PO CAŁKOWITYM 20-MINUTOWYM
NIEDOKRWIENIU MÓZGOWIA

CZĘŚĆ I. NEURONY I NEUROPIL

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Prostacyklina (PGI_2) uwalniana przez komórki śródbłonna ma właściwości antyagregacyjne oraz rozszerzające naczynia krwionośne (Moncada 1982). Te właściwości są wykorzystywane w terapii stanów patologicznych związanych z zaburzeniami ukrwienia, między innymi w zrostowym zapaleniu tętnic (Szczeklik i wsp. 1979), niedrożności naczyń siatkówki (Żygulska-Mach i wsp. 1980), nadciśnieniu tętniczym, ostrej niewydolności naczyń wieńcowych (Szczeklik i wsp. 1980), chorobie Raynauda. Ostatnio podnosi się znaczenie prostacykliny PGI_2 w zwalczaniu skutków niedotlenienia i niedokrwienia mózgowia (Nikolov i wsp. 1982; Pluta 1985a).

Oдноśnie terapeutycznego działania PGI_2 w warunkach niedokrwienia mózgowia poglądy poszczególnych autorów są kontrowersyjne. Obok opinii o korzystnym wpływie tej prostacykliny zastosowanej w okresie recyrkulacji krwi w mózgowiu (Gryglewski i wsp. 1983; Miller i wsp. 1984; Pluta 1984, 1985a,b, 1986a,b,c), wypowiedane są zdania o braku jej wpływu lub wręcz szkodliwym oddziaływaniu (Kerckhoff i wsp. 1983; Miller i wsp. 1984; Pluta 1984, 1986a,b). Wydaje się jednak, że brak wpływu lub szkodliwe działanie PGI_2 na zaburzenia krążenia mózgowego po niedokrwieniu wiążą się z czasem jej podawania. Kerckhoff i wsp. (1983) podawali PGI_2 w 3 godz. po całkowitym jednogodzinnym niedokrwieniu mózgowia, a Pluta (1984, 1985b, 1986a,b) stosował PGI_2 jedynie przez 15 min przed niedokrwieniem i w czasie 15 min niedokrwienia. W pierwszym przypadku PGI_2 podawano przypuszczalnie za późno po niedokrwieniu, a w drugim z kolei za wcześniej. W dalszych badaniach wykazano, że ochronny wpływ PGI_2 na ośrodkowy układ nerwowy po jego niedokrwieniu występuje pod warunkiem stosowania jej w czasie niedokrwienia

i bezpośrednio po incydencie niedokrwiennym (Pluta 1984, 1985a,b, 1986a,b,c).

Badania w mikroskopie świetlnym wykazały, że PGI_2 zmniejsza nasilenie wykładników cytotoksycznego obrzęku oraz pozwala na utrzymanie strukturalnej integralności większości neuronów w mózgowiu po całkowitym niedokrwieniu (Pluta 1985a). Na podstawie tych spostrzeżeń wysunięto przypuszczenie, że podstawą korzystnego wpływu PGI_2 po całkowitym niedokrwieniu mózgowia jest jej działanie cytoprotekcyjne. Skłoniło to do próby oceny wpływu PGI_2 na ultrastrukturę neuronów kory mózgowia. O wyborze tej bogatokomórkowej formacji tkankowej zdecydowało wysokie zapotrzebowanie i zużycie tlenu, które wykazuje kora w prawidłowych warunkach. Przyjęto, iż zmiany w tkance nerwowej mózgowia spowodowane całkowitym niedokrwieniem, ich brak albo ich ograniczenie po podaniu PGI_2 powinny występować najwyraźniej w neuronach kory, na co wskazały już wcześniejsze badania (Pluta, Gajkowska 1984; Pluta 1985a). Ponadto postanowiono sprawdzić, czy istnieją różnice w obrazach mikroskopowo-elektronowych neuronów i neuropilu kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej u zwierząt z całkowitym niedokrwieniem mózgowia w przypadku stosowania i nie stosowania PGI_2 .

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 15 królikach rasy mieszanej, o masie ciała 2,5—3,0 kg. Całkowite, trwające 20 minut, niedokrwienie mózgowia wywoływano przez wewnątrzkratkowe zamknięcie pnia ramienno-głowego, lewej tętnicy podobojczykowej oraz obu tętnic piersiowych wewnętrznych (Pluta 1981). W celu uniknięcia obocznego napływu krwi do mózgowia obniżano skurczowe ciśnienie tętnicze do 60 ± 10 mm Hg, metodą kontrolowanego skrwawiania przez tętnicę udową do kompensatora ciśnienia (Pluta, Kąpuściński 1980).

Zwierzęta usypiano pentobarbitalem (Nembutal 30 mg/1 kg masy ciała) podawanym dożylnie (i.v.) z dodatkiem 2,5 ml soli sodowej kwasu $\{(2,3\text{-dimetylo-5-okso-1-fenyl-3-pirazolin-4-ylo)-metylo}\text{-amino}\}\text{-metano-sulfonowego}$ (Pyralginum — Polfa) — jako środka przeciwbólowego. Miejscowo stosowano 1% chlorowodurek 2-etyloamino-2',6'-acetoksyliidydu (Xylocain — Astra Chemicals). Następnie wykonywano tracheostomię i po unieruchomieniu zwierząt przy użyciu trójetylojodku 1,2,3-tri-(2-dietyloaminoetoksy)-benzenu (Tricurin — Germed) w dawce 3 mg/kg masy ciała (i.v.) prowadzono kontrolowaną wentylację płuc mieszaniną powietrza z tlenem (Pluta 1981). W razie potrzeby podczas trwania doświadczenia podawano dożylnie dodatkowe dawki Nembutalu (10—20 mg), Pyralginy (2,5 ml) i Tricurinu (Pluta 1982). Jedną tętnicę i żyłę udową kaniulowano w celu pomiarów ciśnienia krwi i wstrzyknięć leków. Czynność bioelektryczną kory mózgu rejestrowano za pomocą aparatu do EEG (Accutrace-8, Beckman) w postaci elektrokortykogramu (ECoG).

W tym celu w kościach czaszki wiercono otwory o średnicy 1 mm w okolicy czołowo-ciemieniowej i ciemieniowo-potylicznej nie uszkodzając opony twardej oraz w zatoce czołowej. Do otworów wprowadzano srebrne elektrody igłowe uzyskując kontakt z oponą twardą. Elektrody rejestrujące znajdowały się w odległości 1—5 cm od siebie, w zależności od wielkości czaszki. Na tym samym aparacie EEG rejestrowano równocześnie zintegrowaną aktywność nerwu przeponowego za pomocą srebrnej elektrody dwubiegunowej oraz ciśnienie tętnicze krwi i EKG (odprowadzenie II). W krwi tętniczej kontrolowano pH, pO_2 , pCO_2 i hematokryt (Ht). Temperaturę ciała zwierząt mierzono w prostnicy.

Krążenie mózgowe wznawiano przez zdjęcie zacisków z wszystkich tętnic doprowadzających krew do mózgowia z równoczesnym podniesieniem ciśnienia tętniczego krwi do 100 mm Hg. W czasie niedokrwienia i po niedokrwieniu ciśnienie tętnicze krwi utrzymywano za pomocą retransfuzji własnej krwi zwierzęcia oraz dożylnych wlewów noradrenaliny (2—4 mg/100 ml 0,9% NaCl). Powrót czynności ośrodków naczynioruchowych oceniano na podstawie czasu, od którego ciśnienie tętnicze krwi utrzymywało się bez wspomagania farmakologicznego. Jako wykładnik powrotu czynności oddechowej przyjmowano pojawienie się fazowej aktywności nerwu przeponowego u zwierząt zwiotczonych lub własnego oddechu u zwierząt niezwiotczonych.

Do badań używano prostacyklinę Epoprostenol (The Wellcome Foundation Ltd, London). PGI_2 rozpuszczano bezpośrednio przed podaniem w 1 M buforze Tris o pH 9,0 tak, aby uzyskać końcowe stężenie 1 mg związku w 1 ml. Następnie 100 μ l wyjściowego roztworu rozcieńczano w 10 ml 50 mM buforu Tris o pH 7,5. Roztwór PGI_2 , oziębiony do 4°C podawano w ciągłym wlewie za pomocą pompy infuzyjnej do prawej żyły udowej w dawce 2 μ g/kg/min.

Doświadczenia przeprowadzono w dwóch grupach. Grupę I stanowiło 6 królików z całkowitym 20-minutowym niedokrwieniem mózgowia, którym podawano bufor Tris o pH 7,5 przez 3 min przed niedokrwieniem, przez cały okres niedokrwienia oraz przez 15 min po przywróceniu krążenia mózgowego. W grupie II 6 królików z 20-minutowym niedokrwieniem mózgowia otrzymywało PGI_2 przez 3 min przed zatrzymaniem krążenia mózgowego, w czasie niedokrwienia i przez 15 min po niedokrwieniu. Dodatkową grupę kontrolną stanowiły 3 króliki, u których wykonywano pełną preparatykę chirurgiczną z wyjątkiem zaciśnięcia tętnic doprowadzających krew do mózgowia, i które utrzymywano w narkozie pentobarbitalowej przez okres 3 godz.

W 3 i 6 godz. po niedokrwieniu zwierzęta zabijano przez perfuzję 1,5% aldehydem glutarowym przez lewą komorę serca pod ciśnieniem 80 mm Hg. Do badań pobierano wycinki z kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej. Wycinki do badań w mikroskopie elektronowym przygotowywano w sposób rutynowy. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 100B.

Czas przygotowania doświadczenia wynosił 2 godz. Zwierzęta obserwowano przez okres 3—6 godz. po niedokrwieniu. U wszystkich zwierząt przeprowadzono badanie sekcyjne narządów wewnętrznych i mózgowia.

Znamiennosc statystyczna uzyskanych wyników oceniano przy zastosowaniu testu *t* Studenta.

WYNIKI

Podstawowe wskaźniki fizjologiczne

Wartości pomiarów gazometrycznych i hematokrytu w krwi tętniczej, układowego ciśnienia tętniczego oraz tętna przed niedokrwieniem i po niedokrwieniu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane parametry fizjologiczne opisujące stan zwierząt podczas całkowitego 20-minutowego niedokrwienia mózgowia z prostacycliną i bez prostacycliny

Tael 1. Physiological parameters characterizing the animals' condition in 20-min global cerebra ischemia treated and not treated with prostacyclin PGI_2

Dane doświadczalne Experimental data	Kontrola Control	Okres po niedokrwieniu Postischemic period		
		1 godz. 1 h	3 godz. 3 h	6 godz. 6 h
20-minutowe niedokrwienie bez podawania prostacycliny 20-min ischemia without prostacyclin treatment				
Liczba zwierząt Number of animals	6	6	6	3
Ciśnienie tętnicze (mm Hg) Arterial pressure (mm Hg)	106±5*	89±13	86±9	83±8
Tętno (min ⁻¹) Pulse rate (min ⁻¹)	269±24	222±5	200±16	190±9
pH krwi Blood pH	7.38±0.04	7.35±0.17	7.31±0.05	7.40±0.08
pO ₂ (mm Hg)	95±14	111±16	120±19	108±12
pCO ₂ (mm Hg)	31±3	35±11	41±7	38±9
Hematokryt (%) Hematocrit (vol %)	36±4	34±1	33±3	32±1
20-minutowe niedokrwienie z podawaniem prostacycliny 20-min ischemia with prostacyclin treatment				
Liczba zwierząt Number of animals	6	6	6	3
Ciśnienie tętnicze (mm Hg) Arterial pressure (mm Hg)	122±6	106±16	104±10	118±24
Tętno (min ⁻¹) Pulse rate (min ⁻¹)	267±21	241±36	225±37	220±3
pH krwi	7.42±0.08	7.32±0.14	7.32±0.08	7.43±0.11

Blood pH				
pO ₂ (mm Hg)	105±11	134±38	108±20	114±7
pCO ₂ (mm Hg)	33±7	35±7	37±11	39±3
Hematokryt (%)	36±5	33±3	31±2	32±1
Hematocrit (vol %)				

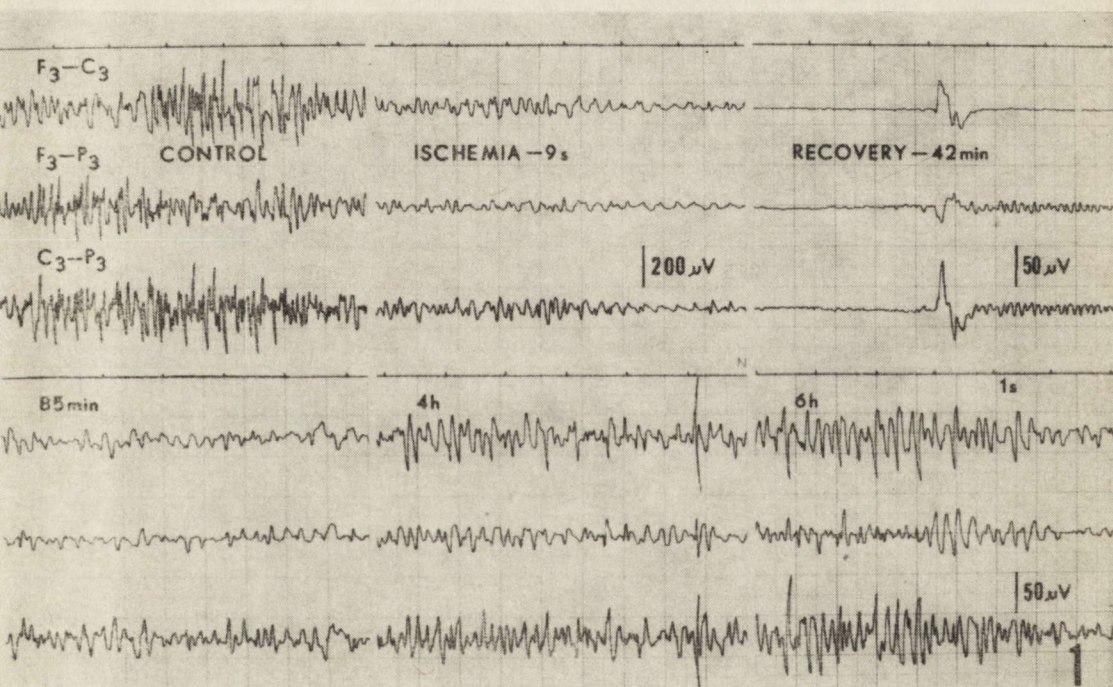
* — wartości średnie ±SD
mean ±SD

Po 3 min infuzji PGI₂ ciśnienie tętnicze obniżało się do 70 mm Hg, a częstość akcji serca wynosiła od 258 do 313/min. Pozostałe parametry nie ulegały uchwytym zmianom.

W czasie niedokrwienia w obu grupach doświadczalnych ciśnienie tętnicze utrzymywano na poziomie 70–50 mm Hg za pomocą infuzji noradrenaliny. W grupie I częstość akcji serca wahała się od 180 do 260/min, a w grupie II — od 200 do 290/min.

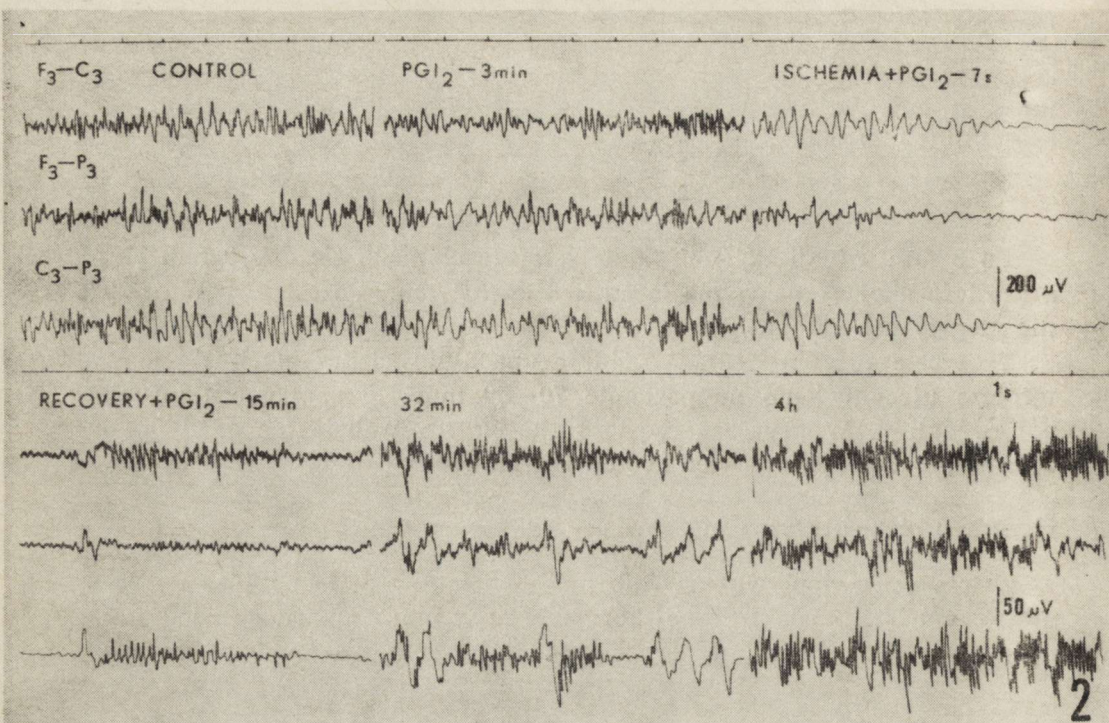
Czynność bioelektryczna mózgowia

Zatrzymanie dopływu krwi do mózgowia prowadziło po 15 s do zaniku czynności bioelektrycznej kory mózgu w obu grupach doświadczalnych (ryc. 1, 2). Czynność ośrodków oddechowych i naczynioruchowych



Ryc. 1. Zmiany ECoG w całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia (Grupa doświadczalna I). Stała czasu 0,03 s. Control — okres przed niedokrwieniem; Ischemia — niedokrwienie; Recovery — okres po przywróceniu krążenia; F₃—C₃, F₃—P₃, C₃—P₃ — odprowadzenia zapisu ECoG

Fig. 1. ECoG changes in global 20 min cerebral ischemia without prostacyclin application (Experimental group I). Time constant 0,03 s F₃—C₃, F₃—P₃, C₃—P₃ — leads of ECoG recordings



Ryc. 2. Zmiany ECoG w całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia przy podawaniu prostacykliny PGI_2 (Grupa doświadczalna II). Stała czasu 0,03 s. Control — okres przed niedokrwieniem; PGI_2 — 3 min — okres podawania prostacykliny przed niedokrwieniem; Ischemia + PGI_2 — 7 s — wczesna faza niedokrwienia przy podawaniu prostacykliny; Recovery + PGI_2 — różne fazy recyrkulacji w warunkach stosowania prostacykliny; $\text{F}_3\text{—C}_3$, $\text{F}_3\text{—P}_3$, $\text{C}_3\text{—P}_3$ — odprowadzenia zapisu ECoG

Fig. 2. ECoG changes in global 20-min cerebral ischemia with prostacyclin application (Experimental group II). Time constant 0,03 s. $\text{F}_3\text{—C}_3$, $\text{F}_3\text{—P}_3$, $\text{C}_3\text{—P}_3$ — leads of ECoG recording

zanikała po 3—6 min od początku niedokrwienia. W dalszych okresach doświadczenia w obu grupach utrzymywał się izoelektryczny zapis ECoG oraz brak aktywności ośrodków oddechowych i naczynioruchowych.

Powrót czynności mózgowia po niedokrwieniu oceniano na podstawie pojawienia się aktywności w zapisach ECoG oraz czynności oddechowej i naczynioruchowej. W grupie I pierwsze oznaki powrotu ECoG stwierdzano w 35—55 min, a ciągle zapis ECoG w 60—93 min (ryc. 1). W grupie II odpowiednio w 5—33 min i w 15—48 min (ryc. 2). Różnice między grupami w czasie powrotu czynności bioelektrycznej mózgowia po niedokrwieniu przedstawiono w tabeli 2. Normalizacja zapisu ECoG pod względem częstotliwości w grupie I następowała około 6 godz. po recyrkulacji lub nie pojawiała się (ryc. 1), a w grupie II po około 4 godz. (ryc. 2). W tym czasie amplituda zapisów ECoG w obu grupach osiągała 50—70% amplitudy wyjściowej. Czynność ośrodków oddechowych i naczynioruchowych, w grupie I, powracała odpowiednio w $11,1 \pm 3,7$ min i w $11,3 \pm 6,3$ min. Natomiast w grupie II w pierwszych 15 min recyrkulacji.

Tabela 2. Powrót spontanicznej czynności bioelektrycznej kory mózgu u zwierząt po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia z podawaniem i bez podawania prostacykliny
 Table 2. Time of recovery of spontaneous bioelectric activity of the brain following 20-min global ischemia in animals treated and not treated with prostacyclin PGI₂

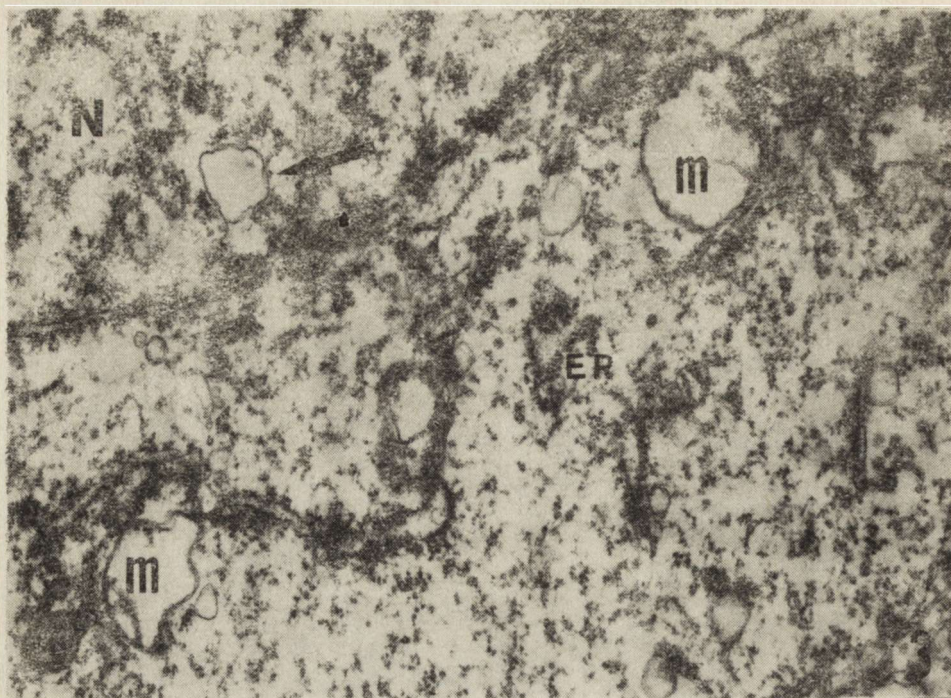
Grupa doświadczalna Experimental group	Liczba zwierząt Number of animals	Pierwsze objawy powrotu ECoG First signs of recovery of cerebral bioelectric activity (min)	Ciągła aktywność ECoG Continuous cerebral bioelectric activity (min)
20-minutowe niedokrwienie bez podawania prostacykliny 20-min ischemia without prostacyclin treatment	6	47.2 ± 7.8 ^a (n = 6)	73.0 ± 12.2 (n = 6)
20-minutowe niedokrwienie z podawaniem prostacykliny 20-min ischemia with prostacyclin treatment	6	17.8 ± 11.5* (n = 6)	31.2 ± 11.1* (n = 6)

^a – wartości średnie ±SD; * – prawdopodobieństwo $p < 0.05$; n – liczba zwierząt
 mean ±SD probability $p < 0.05$ number of animals

Zmiany ultrastrukturalne

Zwierzęta kontrolne. Obrazy komórek nerwowych i neuropilu u zwierząt kontrolnych, u których nie wywoływano niedokrwienia mózgowia, pokrywały się z opisami podanymi przez Petersa i wsp. (1976) u ssaków bytujących w normalnych warunkach.

Grupa doświadczalna I. Obrazy mikroskopowo-elektronowe kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej wykazywały podobne zmiany ultrastrukturalne po niedokrwieniu. W 3 i 6 godz. po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia w neuronach i neuropilu obserwowano nieprawidłowości ultrastrukturalne o znacznym nasileniu. Dotyczyły one w jednakowym stopniu cytoplazmy i jąder komórek nerwowych. Cytoplazma była przeważnie elektronowo przezierna i uboga w organelle komórkowe. Nieliczne kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej były krótkie, pofragmentowane i poszerzone, ułożone dość nieregularnie i pokryte nielicznymi rybosomami (ryc. 3). Niektóre z nich układały się równolegle, a wąskie przestrzenie między ich błonami zawierały nie rybosomy, lecz jednorodny materiał o dużej gęstości elektronowej. Zjawisko to występowało zwłaszcza w tzw. ciemnych neuronach. Gładka siateczka przyjmowała postać większych lub mniejszych, regularnych bądź nieregularnych, ale bardzo szerokich pęcherzyków. Natomiast aparat Golgiego był miernie rozwinięty i dosyć rzadko stwierdzano jego obecność. Nieliczne mitochondria były znacznie obrzmiałe. Macierz mitochondrialna była przejaśniona, a grzebień skrócony lub nieobecny.



Ryc. 3. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora ruchowa. Fragment komórki nerwowej. Cytoplazma o zmniejszonej gęstości elektronowej z pojedynczymi obrzmiałymi mitochondriami (m) i fragmentami poszerzonych kanałów siateczki śródplazmatycznej (ER). Struktura pęcherzowata (strzałka) w jądrze (N). Pow. 18.000 \times

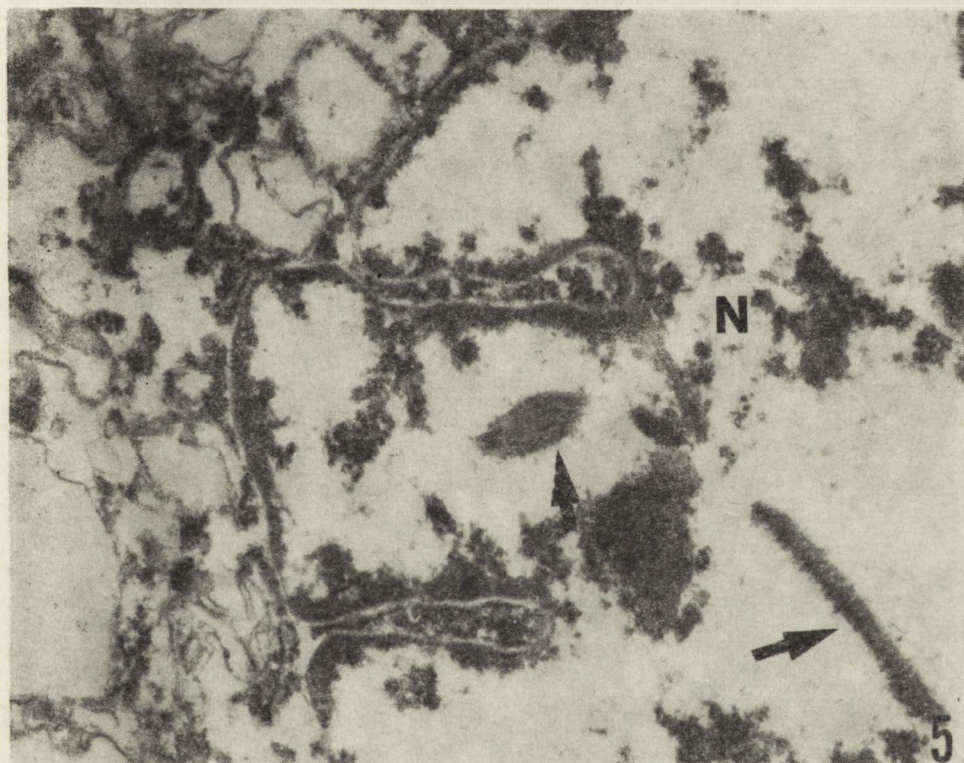
Fig. 3. Experimental group I — ischemia without prostacyclin application. Three hours of recirculation. Motor cortex. Fragment of nerve cell. Cytoplasm with reduced electron density, contains single swollen mitochondria (m) and fragments of dilated channels of endoplasmic reticulum (ER). Vascular structure (arrow) in the nucleus (N). $\times 18\ 000$



Ryc. 4. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora ruchowa. Filamentarne wtręty śródjądrowe w komórce nerwowej. Krzyżujące się wiązki o przebiegu podłużnym oraz trafione skośnie. Pow. 72.000 \times

Fig. 4. Experimental group I — ischemia without prostacyclin application. Three hours of recirculation. Motor cortex. Intranuclear filamentous inclusions in the nerve cell. Crossing longitudinal bundles of filaments. Some of them cut obliquely. $\times 72\ 000$

Jądra komórkowe były duże o nieregularnym kształcie. Cechowały się one głębokimi wgłobieniami i licznymi poszerzeniami między zewnętrzną i wewnętrzną błoną otoczki jądrowej. Chromatyna była rozproszona i tworzyła większe lub mniejsze agregaty. Jąderko ulegało segregacji z wyraźnie wyróżniającą się częścią włóknistą i ziarnistą. Oprócz tego w jądrach spotykano duże skupiska ziarnistości interchromatynowych. W około 50% badanych jąder występowały pojedyncze lub mnogie struktury pęcherzowate o nieregularnych obrysach (ryc. 3). Struktury te były otoczone pojedynczą błoną. Wnętrze ich było przeważnie elektronowo przeźierne lub zawierało niewielką ilość kłaczkowatej, lub ziarnistej substancji. Strukturom pęcherzowym towarzyszyły wtręty (ryc. 4) złożone z wiązek filamentów o liniowym, równoległym układzie. Niekiedy filamenty krzyżowały się pod kątem zbliżonym do prostego. W zależności od uzyskiwanego przekroju uzyskiwano dość znaczną zmienność obrazu



Ryc. 5. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny. Szósta godzina recyrkulacji. Kora czuciowa. Fragment komórki nerwowej. Zaawansowana dezintegracja cytoplazmy. Jądro komórkowe (N) o nieregularnych zarysach z ubogą ilością chromatyny zawiera wtręty złożone z wiązek filamentów (strzałki). Pow. 27.000 X

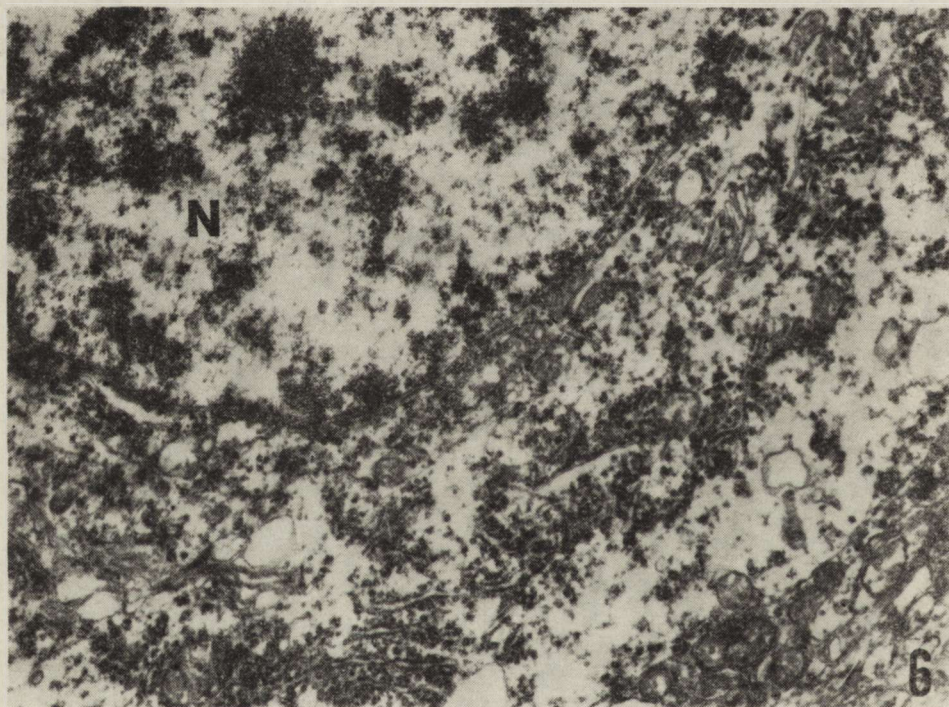
Fig. 5. Experimental group I — ischemia without prostacyclin application. Six hours of recirculation. Sensory cortex. Fragment of neurocyte with severe cytoplasmic disintegration. Cellular nucleus (N) with irregular outlines and scarce chromatine contains inclusions composed of bundles of filaments (arrows). X 27 000

morfolożicznego wtretów. Wtretę te nie miały kontaktu ze strukturami pęcherzowatymi ani z jądrem i otoczką jądrową. Ilość struktur pęcherzowatych i wtretów oraz stopień nasilenia zmian strukturalnych były mniejsze w korze czuciowej niż w pozostałych rodzajach kory. Natomiast w korze skroniowej obserwowano największe nasilenie zmian ultrastrukturalnych zarówno w neuronach, jak i neuropilu.

W neuropilu w zmielinizowanych i w niezmielinizowanych wypustkach neuronów obecne były obrznięte mitochondria. Włókna zmielinizowane miały porozsuwane blaszki mielinowe i poszerzone przestrzenie między osłonką mielinową a aksonami. Między neuronami a neuropilem obserwowano znaczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych.

W 6 godz. po niedokrwieniu obserwowano nasilenie wyżej opisanych zmian strukturalnych (ryc. 5). Zmiany te były identyczne i powtarzalne u wszystkich badanych zwierząt.

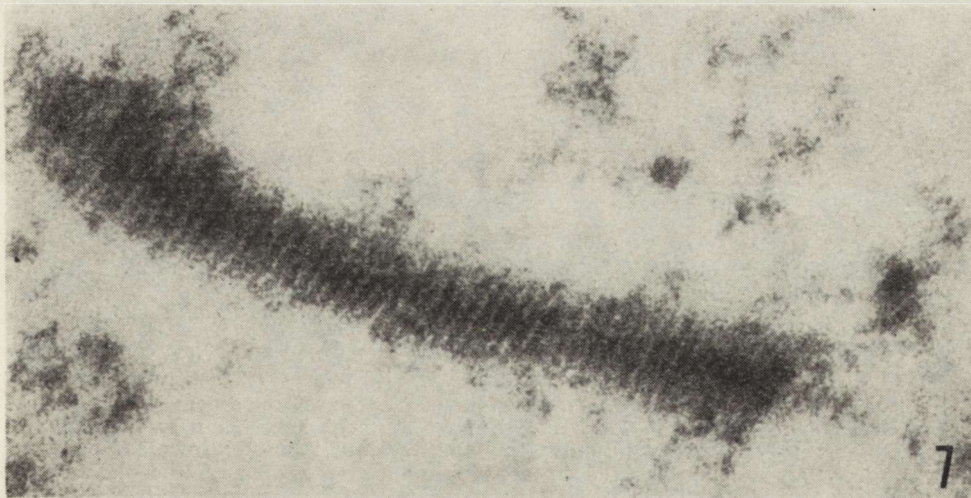
Grupa doświadczałna II. W 3 i 6 godz. po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu w obecności podanej PGI₂ stwierdzano również występo-



Ryc. 6. Grupa doświadczałna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora skroniowa. Fragment komórki nerwowej i przylegającego neuropilu. Cytoplazma ze skupieniami dobrze zachowanej ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. N — jądro komórkowe. Pow. 10.800 ×

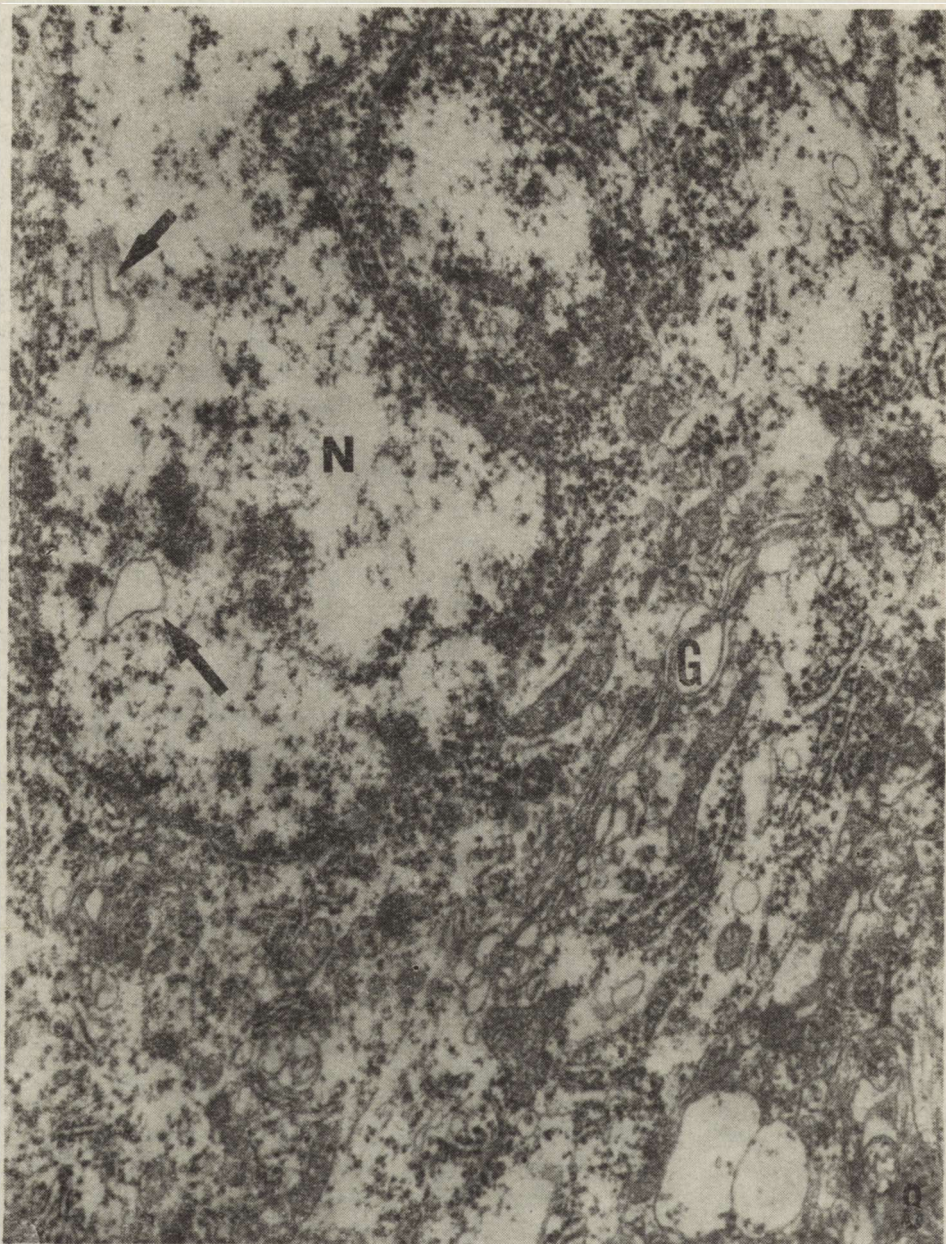
Fig. 6. Experimental group II — ischemia with prostacyclin application. Three hours of recirculation. Temporal cortex. Fragment of nerve cell with adjacent neuropil. Cytoplasm with aggregations of well preserved rough endoplasmic reticulum. N — cellular nucleus. EM. × 10 800

wanie zmian ultrastrukturalnych zarówno w neuronach, jak i neuropilu we wszystkich badanych okolicach kory. Nasilenie zmian było jednak mniejsze niż w grupie poprzedniej. Obserwowano głównie neurony jasne. Zmniejszenie intensywności zmian patologicznych dotyczyło przede wszystkim cytoplazmy. Trzy godziny po niedokrwieniu z zastosowaniem PGI_2 w obrazach mikroskopowo-elektronowych komórek nerwowych kory mózgowia występowały dwa ich typy. Pierwsze charakteryzowały się cytoplazmą o zwiększonej przezierności elektronowej, której jednak towarzyszyły gęsto skupione kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 6). W drugim typie przeważała obecność licznych wolnych rybosomów i polirybosomów grupujących się zwłaszcza w bezpośrednim sąsiedztwie jądra komórkowego bądź zajmujących znaczną część cytoplazmy. Aparat Golgiego był dobrze rozwinięty i był obecny we wszystkich badanych neuronach. Macierz mitochondrialna i grzebienie miały strukturę zbliżoną do mitochondriów występujących w neuronach kontrolnych zwierząt. Jądra komórkowe miały regularne kształty. Chromatyna była rozproszona. Jąderka nie wykazywały różnic w stosunku do grupy I. W jądrach obecne były struktury pęcherzowate i wszystkie rodzaje wtrętów opisanych w grupie poprzedniej (ryc. 7). Jednakże ilość zarówno struktur pęcherzowatych, jak i wtrętów była większa niż w grupie I. Sześć godzin po niedokrwieniu spotykano komórki nerwowe z licznymi rybosomami zgrupowanymi zwłaszcza w pobliżu jądra (ryc. 8). Komórki te miały również dobrze rozwinięte kanaliki szorstkiej siateczki śródplazmatycznej oraz liczne mikropęcherzyki o różnej gęstości elektro-



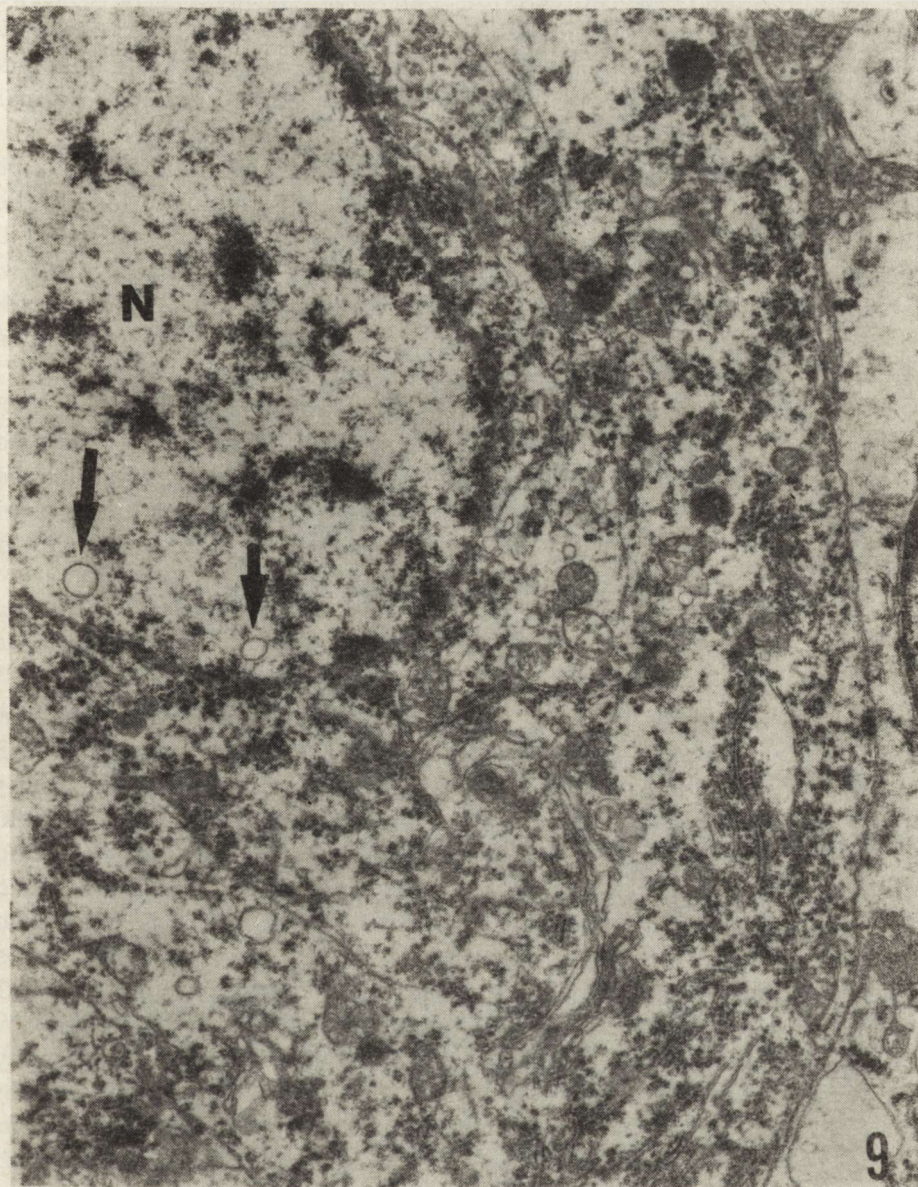
Ryc. 7. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora skroniowa. Filamentarny wtręt śródjądrowy. Przekrój skośny. Pow. 144.000 \times

Fig. 7. Experimental group II — ischemia with prostacyclin application. Three hours of recirculation. Temporal cortex. Filamentous intranuclear inclusion. Oblique section. $\times 144\ 000$



Ryc. 8. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Szósta godzina recyrkulacji. Kora potyliczna. Fragment komórki nerwowej. W cytoplazmie komórki liczne rybosomy skupione w okolicy przyjądrowej, dobrze zachowane kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i liczne mitochondria oraz bogato rozwinięty aparat Golgiego (G). W jądrze widoczne struktury pęcherzowate (strzałki). Pow. 10.800 ×

Fig. 8. Experimental group II — ischemia with prostacyclin application. Six hours of recirculation. Occipital cortex. Fragment of nerve cell. In the cytoplasm abundant ribosomes accumulated in the direct vicinity of nucleus, well preserved channels of rough endoplasmic reticulum, numerous normally looking mitochondria, and rich Golgi apparatus (G) are seen. In the nucleus vesicular structures are present (arrows). × 10 800



Ryc. 9. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z podaniem prostacykliny. Szósta godzina recyrkulacji. Kora skroniowa. Fragment komórki nerwowej. Cytoplazma z licznymi mikropęcherzykami, dobrze zachowanymi mitochondriami oraz kanałami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej z licznymi rybosomami. Struktury pęcherzowate w jądrze (strzałki). Pow. 10.800 ×

Fig. 9. Experimental group II — ischemia with prostacyclin application. Six hours of recirculation. Temporal cortex. Fragment of nerve cell. Cytoplasm with numerous microvesicles, well preserved mitochondria and channels of rough endoplasmic reticulum with abundant ribosomes. Vesicular structures are present within nucleus (arrows). × 10 800

nowej. Struktura mitochondriów była taka sama jak w 3 godz. po niedokrwieniu. Zmiany w jądrach miały podobne nasilenie jak obserwowane w 3 godz. recyrkulacji. Występowały również komórki nerwowe z licznymi rybosomami i polirybosomami rozproszonymi w cytoplazmie, z wąskimi kanalikami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. W komórkach tych obecne były stosunkowo liczne ciała gęste (ryc. 9).

W strukturach neuropilu tej grupy doświadczalnej stwierdzano pojedyncze obrzmiałe mitochondria. We włóknach zmielinizowanych dominowały uwypuklenia blaszek mielinowych w kierunku aksonów, co sprawiało wrażenie dużych pojedynczych wakuoli występujących między blaszkami mieliny. Porozsuwanie blaszek mielinowych na całej szerokości przekroju poprzecznego włókien zmielinizowanych występowało dość rzadko.

W 6 godz. po niedokrwieniu nie obserwowano nasilenia zmian ultrastrukturalnych w wyżej opisanych strukturach. Zmiany występujące w tej grupie zwierząt były identyczne i powtarzalne we wszystkich badanych mózgach. W ciągu 6 godz. recyrkulacji nie stwierdzano różnic w obrazach ultrastrukturalnych różnych rodzajów kory mózgowia po podaniu PGI_2 .

OMÓWIENIE

W obrazach mikroskopowo-elektronowych neuronów i neuropilu kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej królików po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia bez podawania PGI_2 dominują zmiany, które mogą być uznane za wykładniki narastającego obrzęku mózgu. Nieprawidłowości te polegają na zmniejszeniu gęstości elektronowej cytoplazmy komórek nerwowych, na masywnym obrzmieniu mitochondriów i poszerzeniu kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej oraz na poszerzeniu przestrzeni międzykomórkowych w neuropilu. Wzrost zawartości wody w elementach komórkowych tkanki nerwowej po całkowitym niedokrwieniu mózgowia stanowi kryterium diagnostyczne obrzęku cytotoksycznego (Klatzo 1967). Przedstawione powyżej obrazy, jak i wyniki wcześniejszych badań (Pluta 1985a), w których obok zmniejszonej gęstości elektronowej cytoplazmy komórek nerwowych i glejowych obserwowano poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych, a także wykazanie wzrostu przepuszczalności bariery krew—mózg po niedokrwieniu (Pluta i wsp. 1987), wskazują, że obrzęk mózgu powstający pod wpływem jego całkowitego niedokrwienia ma cechy obrzęku mieszanego, łączącego zjawiska właściwe zarówno dla obrzęku cytotoksycznego, jak i naczyniopochodnego. Istotnym elementem przedstawionych obserwacji jest stwierdzenie struktur pęcherzowatych i wtętów fibrylarnych w jądrach neuronów. Można przypuszczać, że tego typu zmiany w jądrach mogą powodować wtórne metaboliczne zaburzenia w całej komórce, pro-

wadzące następnie do głębokich nieprawidłowości czynnościowych i strukturalnych, a w rezultacie do śmierci neuronów. W korze czuciowej w grupie zwierząt bez podawania PGI_2 zmiany ultrastrukturalne były wyraźnie mniej nasilone. Natomiast w korze skroniowej osiągały one największe natężenie.

Charakter i dynamika zaburzeń czynności bioelektrycznej mózgowia w przedstawionych badaniach w obu grupach, w czasie niedokrwienia, były identyczne do nieprawidłowości opisanych przez innych autorów w podobnych lub takich samych warunkach doświadczalnych (Hossmann, Zimmermann 1974; Pluta i wsp. 1980; Kerckhoff i wsp. 1983; Pluta 1982, 1984, 1985a,b, 1986a,b,c). Istotne różnice między grupami pojawiały się w okresie po niedokrwieniu. Dotyczyły one czasu i stopnia powrotu czynności bioelektrycznej kory mózgu oraz zachowania ciśnienia tętniczego, które u zwierząt z zastosowaną PGI_2 stabilizowało się po niedokrwieniu w granicach kontrolnych. Prostacyklina opóźniła występowanie bradykardii w okresie recyrkulacji i ograniczała jej nasilenie (Pluta 1985b). Po podaniu PGI_2 zmiany ultrastrukturalne w neuronach kory mózgowia były mniej nasilone i nie narastały w czasie. Zależność ta najwyraźniej odnosiła się do zmian obrzękowych. Zjawisko to należy zapewne wiązać z opóźnieniem dojrzewania procesów patologicznych w komórkach tkanki nerwowej lub z cytoprotekcyjnym, czy osłaniającym wpływem PGI_2 na ultrastrukturę komórek stwierdzonym w warunkach *in vitro* przez Renkawek i wsp. (1986). Prostacyklina nie wywierała natomiast wpływu na występowanie struktur pęcherzowatych i wtętów w jądrach komórek nerwowych. Wręcz przeciwnie, odnosiło się wrażenie, że podanie PGI_2 zwiększało ilość obu struktur w jądrach neuronów. Pomimo to przedstawione w niniejszej pracy badania wykazały w ciągu 6 godz. obserwacji po niedokrwieniu dodatnią korelację pomiędzy stanem ultrastrukturalnym i funkcjonalnym neuronów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż u zwierząt z zastosowaniem PGI_2 w 3 i 6 godz. po niedokrwieniu obserwowano wokół jąder komórek nerwowych lub w całej ich cytoplazmie zwiększenie liczby rybosomów. Obrazy te sugerować mogą zwiększoną syntezę białek. Na uwagę zasługuje także występowanie w komórkach nerwowych dużej liczby mikro-pęcherzyków. Obserwowano również zwiększenie liczby struktur pęcherzowatych i wtętów w jądrach neuronów. Wydaje się, że wszystkie te zjawiska mogą wskazywać na wzrost przemian metabolicznych zachodzących w neurocytach. Potwierdzeniem tego może być około dwa razy szybszy powrót czynności bioelektrycznej kory mózgowia u zwierząt z PGI_2 .

Podsumowując powyższe badania należy stwierdzić, że PGI_2 ogranicza w pierwszej kolejności występowanie obrzęku cytotoksycznego. W mniejszym natomiast stopniu wpływa na pojawianie się zmian o typie obrzęku naczyniopochodnego u zwierząt po całkowitym niedokrwieniu mózgowia.

Sugeruje to cytoprotekcyjne działanie PGI_2 na komórki nerwowe kory mózgowia. Podkreślić należy również pojawianie się w okresie po niedokrwieniu, w przypadku stosowania prostacykliny, zmian ultrastrukturalnych wskazujących na aktywizację procesów metabolicznych komórek nerwowej.

Autor serdecznie dziękuje Panu Sławomirowi Januszewskiemu za współpracę podczas wykonywania doświadczeń.

INFLUENCE OF PROSTACYCLIN ON THE CEREBRAL CORTEX ULTRASTRUCTURE IN THE RABBIT AFTER COMPLETE BRAIN ISCHEMIA OF 20 MIN DURATION

I. NEUROS AND NEUROPIIL

Summary

The experiments were run in two groups with 12 rabbits in which complete 20-min brain ischemia was induced. In group I the animals received Tris buffer, pH 7.5 for 3 min before ischemia, during arrest of cerebral circulation and for 15 min after ischemia. Rabbits of group II received prostacyclin PGI_2 under the same time conditions as those for group I.

After ischemia lasting 20 min ultrastructural examination of neurons and neuropil in the motor, sensory, temporal and occipital cortex revealed changes indicating advancing brain edema and cellular disintegration. The investigations showed that brain edema as consequence of ischemia combines features of cytotoxic and vasogenic edema. Vesicular structures were noted in the neurocyte nuclei. So were intranuclear inclusions of the type of rodlets, lattices and fibrillary bundles. In the sensory cortex the above mentioned ultrastructural changes were less pronounced, whereas in the temporal cortex they were most intensive. In the group, where PGI_2 was applied, a marked reduction of ultrastructural exponents of both cytotoxic and vasogenic brain edema was observed. On the other hand, in the neurocyte nuclei the number of vesicular structures and inclusions was increased as compared with that in cells in animals not treated with prostacyclin. A positive correlation was demonstrated between the ultrastructural and the functional state of cerebral cortex neurons in the course of 6-hour observation after ischemia. The data obtained indicate a cytoprotective action of PGI_2 on the cells of the cerebral cortex under conditions of ischemia.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТАЦИКЛИНЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КОРЫ МОЗГА КРОЛИКА ПОСЛЕ ПОЛНОЙ 20-МИНУТНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

I ЧАСТЬ. НЕВРОНЫ И НЕВРОПИЛ

Резюме

Эксперименты были проведены в двух группах на 12 кроликах, у которых была вызвана полная 20-минутная ишемия мозга. В I группе животные получали буфер Tris с pH 7,5 в течение 3 минут перед ишемией, во время задержки мозгового кровообращения и в течение 15 минут после ишемии. Вместо того, в группе II кролики получали простациклину PGI_2 в тоже самое время как в группе I. После продолжающейся 20 минут ишемии мозга, в ульт-

траструктурных исследованиях нейронов и невропила двигательной, чувствительной, височной и затылочной коры появляются изменения, являющиеся показателями прогрессирующего отека мозга. Исследования показали, что отек мозга вследствие ишемии соединяет черты цитотоксического и сосудистого отека. В ядрах нейронов обнаружены пузырчатые структуры и палочковидные, решетковидные и пучковидные включения. В чувствительной коре усиление этих ультраструктурных изменений было менее выразительное. Сильнее всего они были выражены в височной коре.

В группе с применением PGI_2 обнаружено отчетливое уменьшение напряжения показателей цитотоксического и сосудистого отека. Вместо того, в ядрах нейронов обнаружено увеличение количества пузырчатых структур и включений по сравнению с группой, в которой не применялась простаглицина.

Исследования показали положительную корреляцию между ультраструктурным и функциональным состоянием нейронов коры мозга в течение 6-ти часового наблюдения после ишемии. Полученные данные показывают охраняющее действие PGI_2 на клетки коры мозга в условиях ишемии.

PIŚMIENNICTWO

1. Gryglewski R. J., Nowak S., Kostka-Trąbka E., Kuśmiderski J., Dembińska-Kieć A., Bieroń K., Basista M., Błaszczak B.: Treatment of ischemic stroke with prostacyclin. *Stroke*, 1983, 14, 197—202.
2. Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
3. Kerckhoff Van den W., Hossmann K.-A., Hossmann V.: No effect of prostacyclin on blood flow, regulation of blood flow and blood coagulation following global cerebral ischemia. *Stroke*, 1983, 14, 724—730.
4. Klatzo I.: Presidential address: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—14.
5. Miller V. T., Coull B. M., Yatsu F. M., Shah A. B., Beamer N. B.: Prostacyclin infusion in acute cerebral infarction. *Neurology*, 1984, 34, 1431—1435.
6. Moncada S.: Prostacyclin and arterial wall biology. *Arteriosclerosis*, 1982, 2, 193—207.
7. Nikolov R., Nikolova M., Miyares C., Milanova D.: Anti-hypoxic effect of prostacyclin. *Meth. Find. Exper. Clin. Pharmacol.*, 1982, 4, 211—219.
8. Peters A., Palay S. L., Webster H.: The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1976.
9. Pluta R.: Zmiany pO_2 , pCO_2 i pH w tętniczej krwi królika w całkowitym 30-minutowym niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 323—334.
10. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska, CMDiK PAN, Warszawa, 1982, 270 s.
11. Pluta R.: Treatment of complete cerebral ischemia with prostacyclin. II-nd European Neuropathology Conference. Abstracts, Warsaw, 1984, 54—55.
12. Pluta R.: Influence of prostacyclin on early morphological changes in the rabbit brain after complete 20-min ischemia. *J. Neurol. Sci.*, 1985a, 70, 305—316.
13. Pluta R.: Wpływ prostacykliny na zmiany podstawowych parametrów fizjologicznych w całkowitym niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1985b, 23, 475—492.
14. Pluta R.: The influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral activity after complete ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986a, 73, 44—54.

15. Pluta R.: Prostacyclin in rabbits with complete cerebral ischemia — An experimental trial. IV Symposium on „Cerebral ischemia and edema”, Abstracts, Tbilisi, 1986b, 32—33.
16. Pluta R.: Effect of prostacyclin on complete cerebral ischemia in rabbit. IX-th Congress of the Polish Pharmacological Society. Abstracts, Lublin, 1986c, 36.
17. Pluta R., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bioelektryczna. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 41—52.
18. Pluta R., Tołowa S. W., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgowia u królika w wyniku ostrego nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 365—384.
19. Pluta R., Gajkowska B.: Ultrastructural changes in the sensomotor cortex of the rabbit after complete 30-min brain ischemia. *J. Neurosci. Res.*, 1984, 11, 35—47.
20. Pluta R., Salińska E., Puka M., Stafiej A., Łazarewicz J. W.: Early changes of extracellular amino acids and calcium in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *J. Neurol. Sci.*, 1987 (w druku).
21. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of prostacyclin on the morphological and enzymatic properties of CNS cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986, 73, 111—118.
22. Szczeklik A., Niżankowski R., Skawiński S., Szczeklik J., Głuszko P., Gryglewski R. J.: Successful therapy of advanced atherosclerosis obliterans with prostacyclin. *Lancet*, 1979, 1, 1111—1114.
23. Szczeklik J., Szczeklik A., Niżankowski R.: Hemodynamic effects of prostacyclin in man. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 1980, 7, 769—775.
24. Żygulska-Mach H., Kostka-Trąbka E., Nitoń A., Gryglewski R. J.: Prostacyclin in central retinal vein occlusion. *Lancet*, 1980, 2, 1075.

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

RYSZARD PLUTA

WPŁYW PROSTACYKLINY NA ULTRASTRUKTURĘ KORY MÓZGU
KRÓLIKA PO CAŁKOWITYM 20-MINUTOWYM
NIEDOKRWIENIU MÓZGOWIA

CZĘŚĆ II. ASTROCYTY I NACZYNIA KRWIONOŚNE

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Doświadczalne badania całkowitego niedokrwienia mózgowia wykazały występowanie zespołów neurologicznych o różnym nasileniu oraz zróżnicowanych zmian histopatologicznych w neuronach poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego (Jenkins i wsp. 1981). Zmiany neuronalne zależne były od rodzaju zwierząt doświadczalnych i modelu niedokrwienia mózgowia. Niejednolite jakościowe i ilościowe zmiany pojawiły się nawet w tym samym modelu doświadczalnym, pomimo zwracania bacznej uwagi na powtarzalność i jednorodność postępowania operacyjnego (Hossmann, Hossmann 1973; Jenkins i wsp. 1981; Pluta 1982). Uszkodzenia neurologiczne występowały z jednej strony już po 4-minutowym niedokrwieniu (Weinberger i wsp. 1940), podczas gdy z drugiej nie stwierdzano ich po 25-minutowym zatrzymaniu krążenia mózgowego (Neely, Youmans 1963). Część autorów stwierdza, że zmiany w neuronach po niedokrwieniu mają charakter uogólniony z predyлекcyjnym zajęciem komórek nerwowych kory mózgu i mózdzku (Nemoto i wsp. 1977; Kalimo i wsp. 1979; Kolata 1979; Pulsinelli, Brierley 1979). Natomiast inni dowodzą, że mają one charakter wybiórczy z przewagą lokalizacji w gałce bladej, prążkowie oraz we wzgórzu (Hossmann, Zimmermann 1974; Marshall i wsp. 1975).

W obrazach ultrastrukturalnych astrocytów i naczyń krwionośnych nie stwierdzono różnorodności zmian morfologicznych, która byłaby zależna od rodzaju zwierząt, czy doświadczalnego modelu niedokrwienia mózgowia (Jenkins i wsp. 1979; Mossakowski, Gajkowska 1984; Pluta 1986). We wcześniejszych własnych badaniach i u wielu innych autorów, wykazano identyczne zmiany w astrocytach i naczyniach krwionośnych. Wyrażały się one masywnym obrzmieniem cytoplazmy astrocytów, któ-

rych okołonaczyniowe wypustki uciskały naczynia włosowate, w skrajnych przypadkach prowadząc do całkowitego zaciśnięcia ich światła (Pluta 1982; Pluta, Gajkowska 1984). Obserwowano także typowe dla zespołów niedokrwienych zmiany strukturalne w jądrach astrocytów, które wyrażały się znaczną przeziernością elektronową karioplazmy z nierównomierną agregacją chromatyny. Warunki upośledzenia zaopatrzenia tkanki nerwowej w krew prowadzą w pierwszej kolejności do głębokich nieprawidłowości cytoplazmy astrocytów na zasadzie „błędnego koła”. Zachowanie strukturalnej integralności i czynnościowej sprawności astrocytów z ich funkcjami buforowymi, metabolicznymi i odżywczymi w okresie recyrkulacji ma obok dobrego stanu neuronów zasadnicze znaczenie dla utrzymania sprawności ośrodkowego układu nerwowego po całkowitym długotrwałym niedokrwieniu mózgowia. Jak wiadomo, w następstwie niedokrwienia dochodzi do obniżenia zasobów energetycznych i zwiększonej w wyniku metabolizmu beztlenowego produkcji kwasu mlekowego prowadzącego do zakwaszenia środowiska wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego. Efektem zaburzeń metabolizmu związków wysokoenergetycznych są nieprawidłowości w metabolizmie fosfolipidów błonowych. Powoduje to uwalnianie kwasów tłuszczowych, spośród których kwas arachidonowy uruchamia kaskadę przemian metabolicznych prowadzących do syntezy różnych klas prostanoidów, z których część wywiera niekorzystny wpływ na układ naczyniowy i błony komórkowe (Wolfe 1982). W związku z tym wydawało się celowe podanie w niedokrwieniu mózgowia prostaglandyny PGI_2 w celu ograniczenia lub zapobieżenia tym zmianom na zasadzie jej konkurencyjnego działania w stosunku do uszkadzającego oddziaływania innych prostanoidów, w tym tromboksanu.

Celem podjętych badań było przeto prześledzenie stanu astrocytów i naczyń krwionośnych w korze ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej w okresie recyrkulacji po całkowitym niedokrwieniu mózgowia po uprzednim podaniu prostacykliny PGI_2 . Badaniami objęto zwierzęta, u których obserwowano powrót czynności bioelektrycznej mózgowia po jego całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu (Pluta 1987). Ponadto postanowiono sprawdzić, czy w tych warunkach istnieją różnice w obrazach mikroskopowo-elektronowych astrocytów i naczyń krwionośnych w poszczególnych obszarach kory mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na 12 królikach, u których wywoływano całkowite 20-minutowe niedokrwienie mózgowia. Dokładny opis modelu doświadczalnego oraz rejestrowanych parametrów przedstawiono w pierwszej części pracy (Pluta 1987). Doświadczenia wykonano w dwóch grupach. Grupę I stanowiło 6 królików z całkowitym 20-minutowym nie-

dokrwieniem mózgowia, którym podawano bufor Tris o pH 7,5 przez 3 min przed niedokrwieniem, w czasie i przez 15 min po niedokrwieniu. Grupa II obejmowała również 6 królików z identycznie długotrwałym niedokrwieniem mózgowia, które otrzymywały prostacyklinę PGI₂ przez 3 min przed zatrzymaniem krążenia mózgowego, w trakcie niedokrwienia i przez 15 min po restytucji krążenia w mózgowiu. Grupę kontrolną stanowiły 3 króliki, u których wykonywano pełną preparatykę chirurgiczną z wyjątkiem niedokrwienia mózgowia, i które utrzymywano w narkozie pentobarbitalowej przez 3 godz.

W 3 i 6 godz. po niedokrwieniu zwierzęta zabijano przez przezsercową perfuzję 1,5% aldehydem glutarowym pod ciśnieniem 80 mm Hg. Następnie pobierano wycinki z odpowiednich okolic kory mózgu do badań w mikroskopie elektronowym, które przygotowywano do oglądania w sposób rutynowy (Pluta, Gajkowska 1984). Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 100B.

WYNIKI

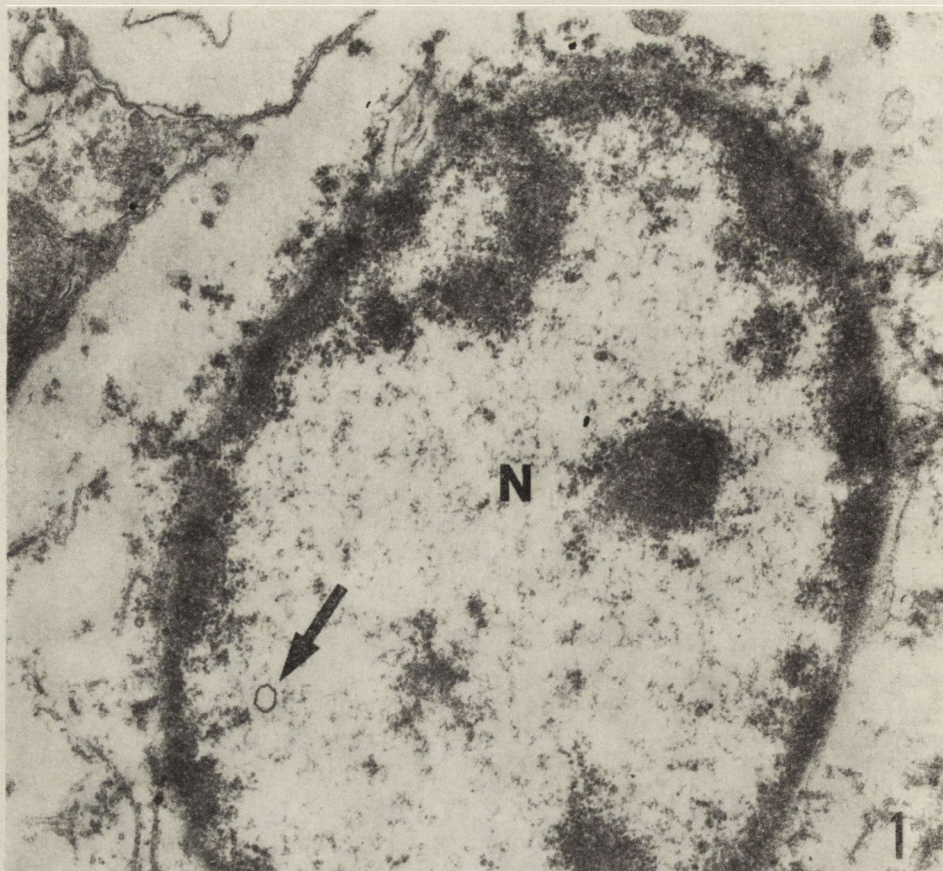
Zwierzęta kontrolne

Obrazy komórek glejowych i naczyń krwionośnych u zwierząt operowanych, lecz nie poddanych niedokrwieniu mózgowia były identyczne z tym, co opisał Peters i wsp. (1976) oraz Jenkins i wsp. (1981) u ssaków w zwykłych warunkach bytowania.

Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny

Obrazy mikroskopowo-elektronowe astrocytów kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej uzyskiwane w 3, jak i w 6 godz. po niedokrwieniu charakteryzowały się podobnymi zmianami ultrastrukturalnymi (ryc. 1, 2). Astrocyty wykazywały bardzo nasilone obrzmienie, niezależnie od okolicy kory mózgowia. Jądra astrocytów miały elektronowo przezierną karioplazmę z niewielką ilością chromatyny, która tworzyła drobne zgrupowania o dużej gęstości elektronowej. Zgrupowania te były skupione głównie przy otoczce jądrowej. Otoczka jądrowa charakteryzowała się poszerzeniami między zewnętrzną a wewnętrzną błoną oraz uwypukleniami błony zewnętrznej do cytoplazmy. Uwypuklenia te osiągały niejednokrotnie bardzo znaczne rozmiary. W pojedynczych jądrach spotykano małe, okrągłego kształtu struktury pęcherzowate. Były one otoczone pojedynczą błoną gładką. Ich wnętrze było elektronowo przeziernie.

Cytoplazma astrocytów była opustoszała, spotykano w niej jedynie fragmenty gładkiej i ziarnistej siateczki śródplazmatycznej oraz struktury pęcherzowate bardzo różnych rozmiarów. Substancja podstawowa cyto-

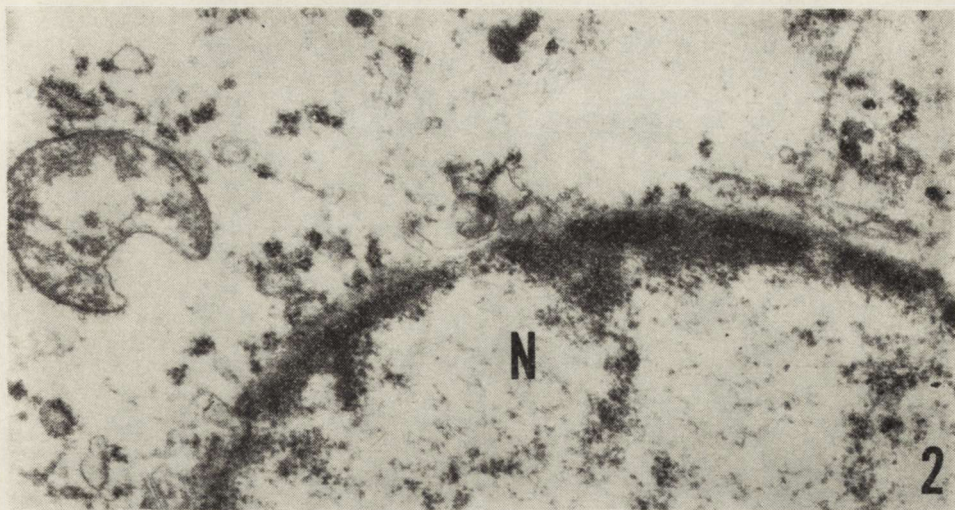


Ryc. 1. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora ruchowa. Fragment astrocytu. W jądrze (N) o elektronowo przeziernym karyoplazmie z niewielką ilością chromatyny widoczna struktura pęcherzowata (strzałka). Elektronowo przezierna cytoplazma zawiera nieliczne fragmenty organelli komórkowych. Pow. 27 000 \times

Fig. 1. First experimental group — ischemia without prostacyclin application. Three hours of recirculation. Motor cortex. Astrocyte. In the nucleus (N) with electron lucent karyoplasm and scanty chromatin aggregates a vesicle-like structure is visible (arrow). Electron-lucent cytoplasm comprises but few fragments of cellular organelles. $\times 27\ 000$

plazmy była z reguły elektronowo przezierna. Dostyc rzadko spotykano w niej pojedyncze mitochondria z przejaśnioną macierzą i skróconymi grzebieniami.

Wypustki astrocytarne miały cechy masywnego obrzmienia. Ich elektronowo przezierna cytoplazma była prawie całkowicie pozbawiona organelli. Napotymano w niej jedynie substancję włóknistą o małej gęstości elektronowej oraz struktury pęcherzowate. W 6 godz. po niedokrwieniu zmiany w perykarionach i wypustkach astrocytów znacznie nasiliły się, co wyrażało się niemal całkowitym zanikiem organelli cytoplazmatycznych.



Ryc. 2. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez podawania prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora skroniowa. Fragment astrocytu. Jądro (N) o jasnej karioplazmie z niewielką ilością chromatyny. W elektronowo przeźiernej cytoplazmie pojedyncze mitochondria i fragmenty ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Pow. 27 000 ×

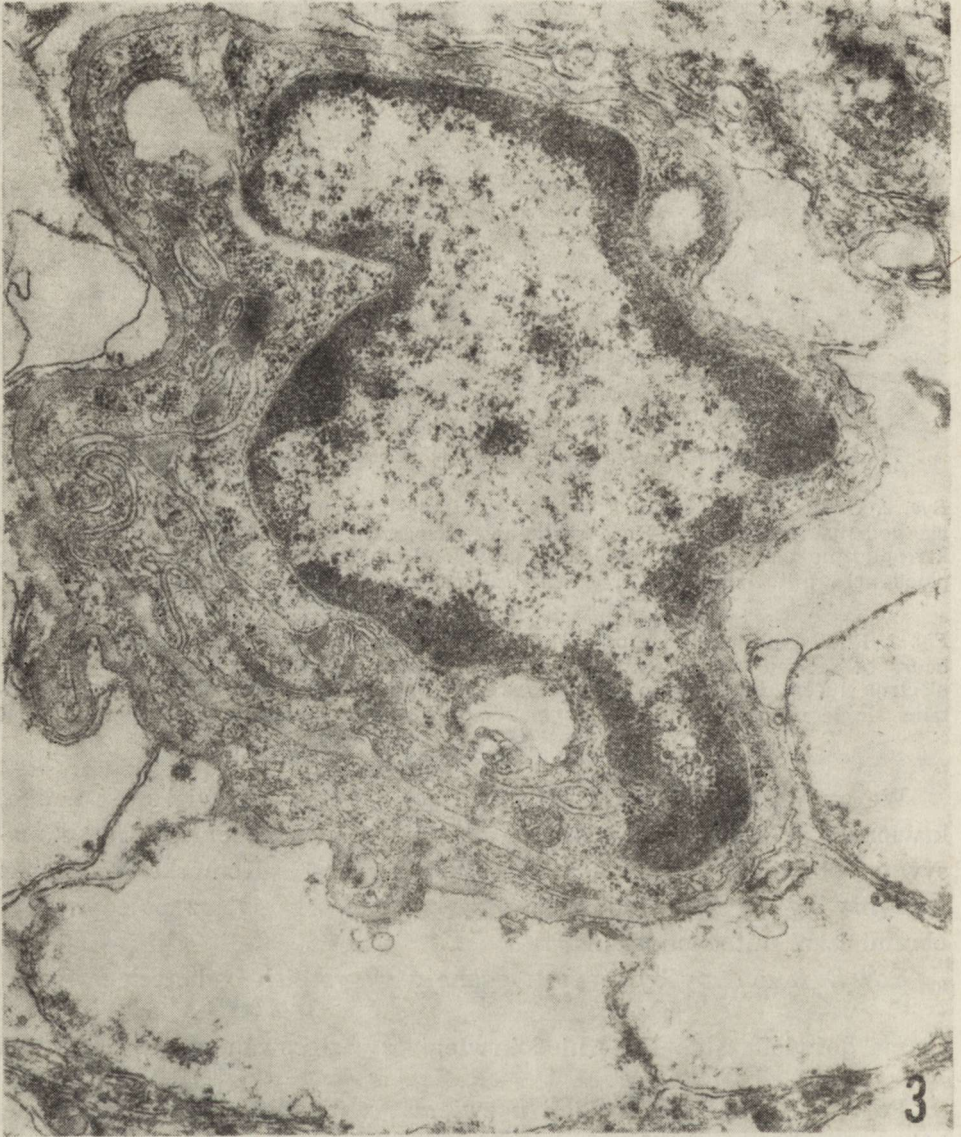
Fig. 2. First experimental group — ischemia without prostacyclin application. Three hours of recirculation. Temporal cortex. Fragment of astrocyte. Nucleus (N) with electron lucent karyoplasm and scarce chromatin. Electron lucent cytoplasm contains single mitochondria and fragments of rough endoplasmic reticulum. × 27 000

We wszystkich przebadanych okolicach kory mózgu większość naczyń krwionośnych sprawiała wrażenie zaciśniętych przez otaczające je masywnie obrzmiałe wypustki astrocytarne (ryc. 3). Komórki śródbłonka naczyniowego wykazywały dobrze zachowane organelle z pojedynczymi obrzmiałymi mitochondriami.

Powyższe zmiany były spostrzegane u wszystkich badanych zwierząt.

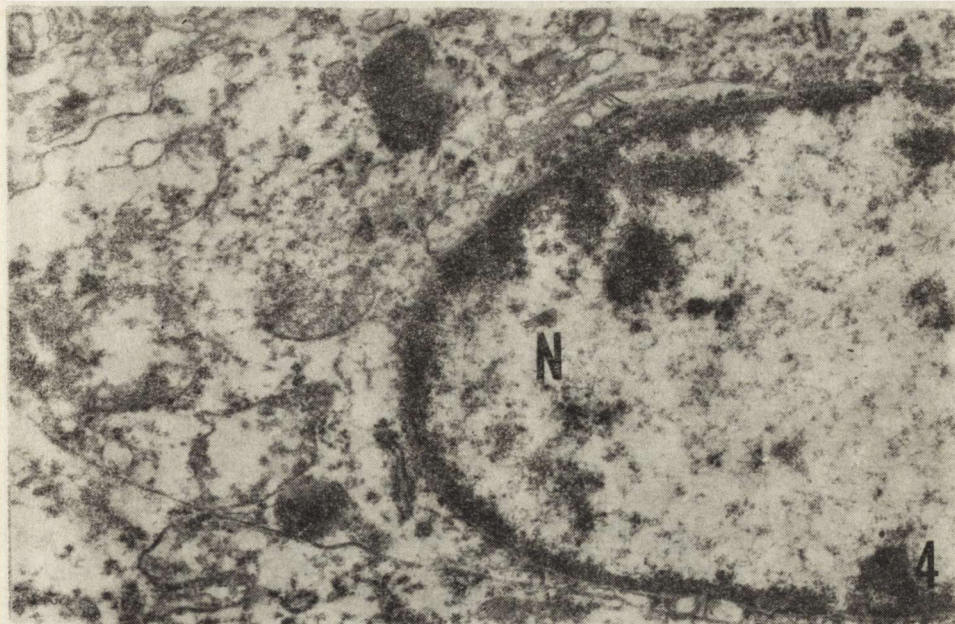
Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny

Po 3 i 6 godz. recyrkulacji u zwierząt z niedokrwieniem mózgowia, którym podawano PGI_2 , stwierdzało się w obrazie ultrastrukturalnym astrocytów i naczyń krwionośnych badanych obszarów kory zmiany znacznie mniej nasilone (ryc. 4). Ograniczenie zmian patologicznych dotyczyło przede wszystkim cytoplazmy (ryc. 5). Zmiany te miały jednak różne nasilenie. W cytoplazmie o nieco zmniejszonej gęstości elektronowej niektóre mitochondria były tylko nieznacznie obrzmiałe. Ziarnista siateczka śródplazmatyczna nie wykazywała zmian, podobnie aparat Golgiego. Obserwowano liczne ciała gęste i struktury filamentarne.



Ryc. 3. Grupa doświadczalna I — niedokrwienie bez stosowania prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora ruchowa. Naczynie krwionośne z zaciśniętym światłem. Do blaszki podstawnej śródbłonka przylegają bardzo znacznie obrzmiałe wyputki astrocytów. Ich cytoplazma jest elektronowo przezierna i pozbawiona całkowicie organelli komórkowych. Pow. 27 000 X

Fig. 3. First experimental group — ischemia without prostacyclin application. Three hours of recirculation. Motor cortex. Blood vessel with completely compressed lumen. Basal membrane surrounded by severely swollen astrocytic processes. Their electron-lucent cytoplasm almost totally devoid of cellular organelles. X 27 000



Ryc. 4. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Trzecia godzina recyrkulacji. Kora skroniowa. Astrocyt. Jądro (N) z jasną karyoplazmą z niewielką ilością chromatyny. W cytoplazmie liczne dobrze zachowane organelle komórkowe. Pow. 14 400 \times

Fig. 4. Second experimental group — ischemia with prostacyclin application. Three hours of recirculation. Temporal cortex. Astrocyte. Electron-lucent karyoplasm with scarce chromatin granules (N). In the cytoplasm abundant, well preserved cellular organelles. $\times 14\ 400$

Zmiany ultrastrukturalne karyoplazmy i jąder miały podobny charakter jak w grupie I. Jednakże otoczka jądrowa stosunkowo rzadko ujawniała charakterystyczne dla poprzedniej grupy uwypuklenia błony zewnętrznej i wewnętrznej.

Wypustki astrocytarne miały mniej nasilone cechy obrzmienia i zawierały więcej organelli cytoplazmatycznych niż w grupie I. Aczkolwiek w wielu przypadkach mimo ograniczenia cech obrzmienia w cytoplazmie wypustek leżących przy naczyniach ilość organelli była znikoma lub podobna jak w grupie I.

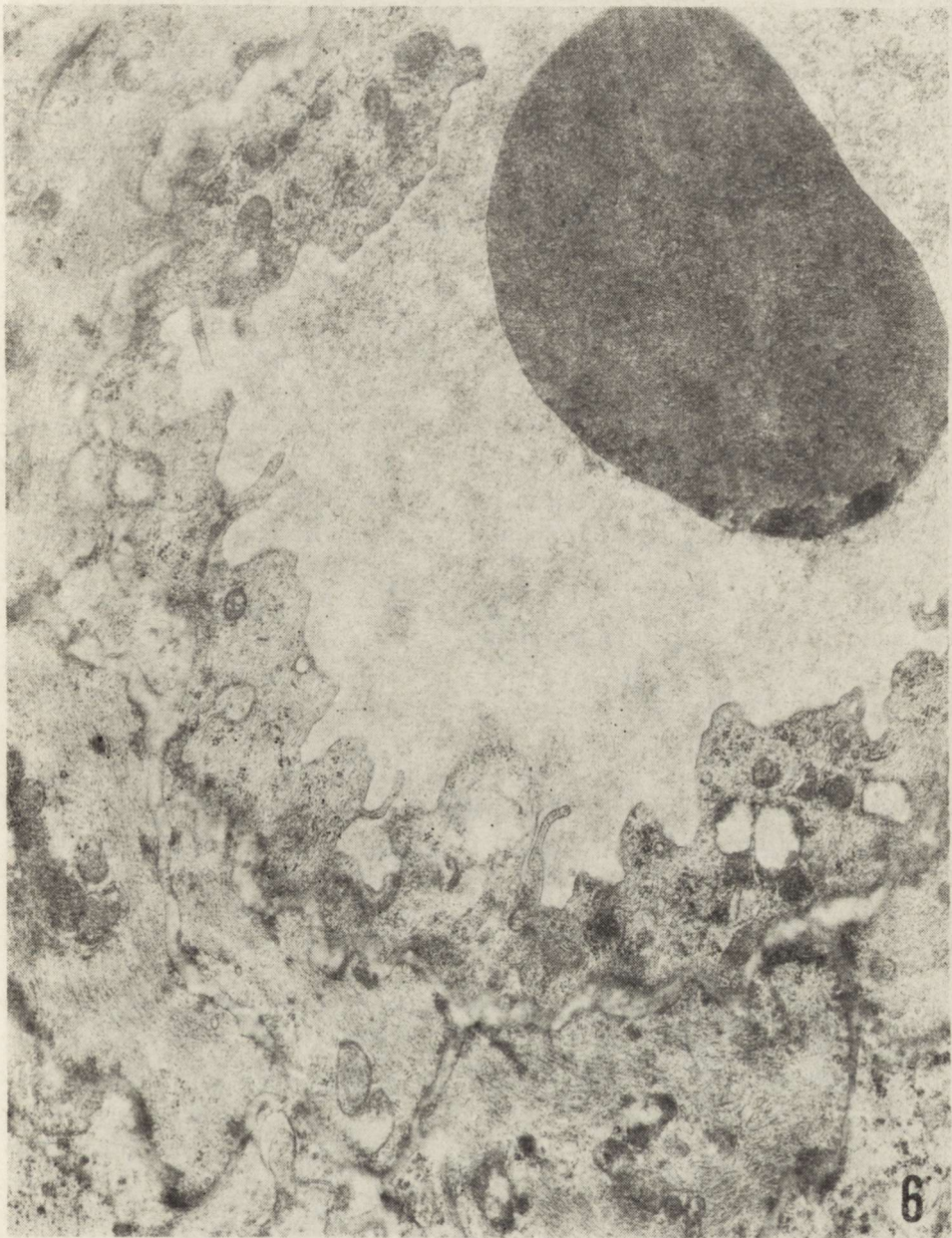
Większość naczyń krwionośnych posiadała szerokie światło o stosunkowo dużej średnicy, co było związane z ograniczeniem obrzmienia otaczających je wypustek astrocytarnych (ryc. 6). Światła naczyń miały nieregularny kształt. Śródbłonki posiadały liczne mikrokosmki, pęcherzyki o różnej wielkości i ciała gęste. W cytoplazmie śródbłonek widywano zgrupowania filamentów. Błona podstawna była wyraźna.



Ryc. 5. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Szósta godzina recyrkulacji. Kora czuciowa. Astrocyt. Jądro (N) o jasnej karyoplazmie z nielicznymi zbitymi grudkami chromatyny. W cytoplazmie o stosunkowo licznych organellach, widoczne są między innymi mitochondria i krótkie kanały szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Pow. 18 000 ×

Fig. 5. Second experimental group — ischemia with prostacyclin application. Six hours of recirculation. Sensory cortex. Astrocyte. Nucleus (N) with electron-lucent karyoplasm, contains scanty clumps of chromatin. In the cytoplasm relatively rich in cellular organelles some mitochondria and fragments of rough endoplasmic reticulum are seen. × 18 000

Zmiany obserwowane w tej grupie doświadczalnej były identyczne i powtarzalne u wszystkich zwierząt. Nie stwierdzono różnic w obrazach ultrastrukturalnych astrocytów i naczyń krwionośnych po podaniu PGI₂ w korze ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej. W 3 i 6 godz. po niedokrwieniu nie obserwowano w tej grupie zwierząt różnic w natężeniu zmian patologicznych zarówno w perykarionach, jak i wypustkach astrocytów.



Ryc. 6. Grupa doświadczalna II — niedokrwienie z zastosowaniem prostacykliny. Szósta godzina recyrkulacji. Kora potyliczna. Naczynie krwionośne z szerokim światłem, w którym zawarta jest krwinka czerwona. Zwraca uwagę obfitość filamentów w cytoplazmie endotelialnej. Pow. 18 000 X

Fig. 6. Second experimental group — ischemia with prostacyclin application. Six hours of recirculation. Occipital cortex. Blood vessel with wide lumen containing erythrocyte. Note abundance of filaments in the endothelial cytoplasm. X 18 000

OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że całkowite 20-minutowe niedokrwienie mózgowia wywołuje podobne zmiany w ultrastrukturze astrocytów i naczyń krwionośnych kory ruchowej, czuciowej, skroniowej i potylicznej. Pomimo powrotu czynności bioelektrycznej kory mózgu (patrz Pluta 1987) natężenie zmian w naczyniach, a w szczególności w astrocytach w grupie zwierząt, którym nie podawano prostacykliny, nasilało się wraz z wydłużeniem czasu recyrkulacji. Obserwowane zmiany były wyrazem narastającego obrzęku i postępującej destrukcji perykariów i wypustek astrocytów. Wyrażały się one zmniejszeniem gęstości elektronowej zarówno cytoplazmy, jak i karioplazmy z następowym ubytkiem organelli cytoplazmatycznych.

Zwężenie lub zaciśnięcie światła naczyń włosowatych było również charakterystyczną zmianą stwierdzoną w grupie I zwierząt. Zjawisko to związane jest głównie ze skurczem naczyń po niedokrwieniu (Hart i wsp. 1978) i/lub z zaciśnięciem ich światła poprzez obrzmiałe wypustki astrocytarne (Pluta, Gajkowska 1984). Obecnie uzyskane wyniki wydają się potwierdzać podane przez nas uprzednio przypuszczenie. Spostrzeżenia te nasunęły nam następujące pytania. Po pierwsze czy zmiany w astrocytach są odwracalne czy nieodwracalne? Po drugie czy istnieje jakaś substancja lub substancje, które byłyby w stanie zapobiec lub ograniczyć występujące nieprawidłowości tkankowe?

Odpowiedzi na te pytania uzyskano w pewnej mierze w II grupie doświadczalnej zwierząt z niedokrwieniem mózgu, którym podawano PGI_2 . Stwierdzono, iż w przypadku podawania PGI_2 uzyskać można korzystny wpływ na stan cytoplazmy niedokrwionych astrocytów. Nie można jednak powiedzieć tego w odniesieniu do obrazów ultrastrukturalnych karioplazmy. W perykariach astrocytów u zwierząt grupy II stwierdzono zwykle ilości organelli lub nawet ich zwiększone nagromadzenie. Obrazy ultrastrukturalne astrocytów były porównywalne z astrocytami w prawidłowych warunkach (Jenkins i wsp. 1981). W wypustkach astrocytarnych oprócz ograniczenia zmian obrzękowych nie stwierdzano zwiększenia liczebności organelli cytoplazmatycznych. Należy dodać przy tym, że w ciągu 6 godz. po niedokrwieniu nie obserwowano w grupie II nasilenia zmian ultrastrukturalnych. Wydaje się przeto, że PGI_2 hamuje, jeśli nie trwale, to przynajmniej przejściowo w okresie prowadzonych obserwacji, rozwój zmian patologicznych. Przypuszczalnie w pierwszej kolejności PGI_2 wpływała na ograniczenie zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg. Sugestia ta miałaby częściowe potwierdzenie we wcześniejszych badaniach, w których wykazano ograniczenie lub zniesienie zmian krwotocznych w korze mózgu po całkowitym długotrwałym niedokrwieniu mózgowia (Pluta 1985). W tym kontekście odpowiedzi na postawione powyżej pytania byłyby pozytywne. Zmianom w astrocytach

po niedokrwieniu można zapobiec, można uznać je więc za odwracalne. Odpowiedzią na drugie pytanie byłyby właściwości biologiczne prostacykliny z jej korzystnym wpływem zarówno na barierę krew-mózg, a przede wszystkim na stan błon cytoplazmatycznych astrocytów. Podsumowując przedstawione powyżej spostrzeżenia w konfrontacji z obserwacjami zawartymi w pierwszej części pracy (Pluta 1987) można stwierdzić, że PGI₂ działa cytoprotekcyjnie nie tylko w stosunku do neuronów, ale w szczególności wobec astrocytów. Charakter zmian ultrastrukturalnych w niedokrwionych neuronach i astrocytach w przypadku stosowania prostacykliny jest podobny oraz sugeruje nie tylko efekt cytoprotekcyjny substancji, lecz również możliwość wzmagania komórkowych procesów metabolicznych.

Autor serdecznie dziękuje Panu Sławomirowi Januszewskiemu za współpracę podczas wykonywania doświadczeń.

INFLUENCE OF PROSTACYCLIN ON THE CEREBRAL CORTEX ULTRASTRUCTURE IN THE RABBIT AFTER COMPLETE BRAIN ISCHEMIA OF 20 MIN DURATION

II. ASTROCYTES AND BLOOD VESSELS

Summary

Astrocytes and blood vessels of the motor, sensory, temporal and occipital cortex were examined in 12 rabbits after complete 20-min brain ischemia.

The experiments were performed in two groups of animals. Group I comprised rabbits subjected to 20-min complete cerebral ischemia, receiving Tris buffer, pH 7.5 for 3 min before, during and 15 min after ischemia. Group II consisted of animals which received under the same conditions prostacyclin PGI₂ 3 min before, during and for 15 min after ischemia.

Ultrastructural examination of the astrocytes in brains of animals subjected to ischemia revealed changes indicating swelling and destruction of their perikarya and processes. As a consequence the cytoplasmic organelles disappeared. The blood vessels were compressed by the massively swollen astrocytic processes. In group II in which cerebral ischemia was accompanied with simultaneous administration of PGI₂ the ultrastructural picture of the astrocyte cytoplasm was normal, although the nuclear changes were not favourably affected by PGI₂. Most blood vessels seemed to be patent with wide lumina. The described data indicate a cytoprotective action of PGI₂ on astrocytes. This permits maintaining a normal state of brain blood vessels.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТАЦИКЛИНЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МОЗГА КРОЛИКА ПОСЛЕ ПОЛНОЙ 20-МИНУТНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

II ЧАСТЬ. АСТРОЦИТЫ И КРОВЕНОСНЫЕ СОСУДЫ

Резюме

Астроциты и кровеносные сосуды двигательной, чувствительной, височной и затылочной коры исследовались у 12 кроликов после полной 20-минутной ишемии мозга. Эксперименты велись в двух группах. Группа I вмещала кролики, которые получали буфер Tris

с рН 7,5 в течение 3 минут перед ишемией, во время и в течение 15 минут после ишемии. К группе принадлежали животные, которые в тех же условиях получали простаглицлину PGI₂ в течение 3 минут перед ишемией, в ее время и в течение 15 минут после ишемии. В ультраструктурных исследованиях астроцитов были обнаружены проявления набухания и деформации перикарионов и их отростков. Вследствие этого цитоплазматические органеллы полностью отсутствовали. Кровеносные сосуды были зажатые очень набухшими астроцитарными отростками.

В группе II с ишемией мозга и одновременным введением PGI₂ была найдена нормальная ультраструктура цитоплазмы астроцитов. Ядерные изменения не подвергались полезному влиянию PGI₂. Большинство кровеносных сосудов казалось проходимыми, они имели большие просветы. Эти данные свидетельствуют о охраняющим действитель PGI₂ на астроциты, позволяющим удержать нормальное состояние кровеносных сосудов мозга.

PIŚMIENNICTWO

1. Hart M. N., Sokoll M. D., Davies L. R., Henriquez E.: Vascular spasm in cat cerebral cortex following ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 52—57.
2. Hossmann V., Hossmann K.-A.: Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res.*, 1973, 60, 423—438.
3. Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
4. Jenkins L. W., Povlishock J. T., Becker D. P., Miller J. D., Sullivan H. G.: Complete cerebral ischemia: An ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1979, 48, 113—125.
5. Jenkins L. W., Povlishock J. T., Lewelt W., Miller J. D., Becker D. P.: The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1981, 55, 205—220.
6. Kalimo H., Paljärvi L., Vapalahti M.: The early ultrastructural alterations in the rabbit cerebral and cerebellar cortex after compression ischemia. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1979, 5, 211—223.
7. Kolata R. J.: Survival of rabbits after prolonged cerebral ischemia. *Stroke*, 1979, 10, 272—277.
8. Marshall L. F., Graham D. I., Durity F., Lounsbury R., Welsh F., Langfitt T. W.: Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part. 2. Brain morphology. *J. Neurosurg.*, 1975, 43, 318—322.
9. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347—365.
10. Neely W. A., Youmans J. R.: Anoxia of canine brain without damage. *J. Am. Med. Ass.*, 1963, 183, 1085—1087.
11. Nemoto E. M., Bleyaert A. L., Stezoski S. W., Moossy J., Rao G. R., Safar P.: Global brain ischemia: A reproducible monkey model. *Stroke*, 1977, 8, 558—564.
12. Peters A., Palay S. L., Webster H.: The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1976.
13. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska, CMDiK PAN, Warszawa, 1982, 270 s.

14. Pluta R.: Influence of prostacyclin on early morphological changes in the rabbit brain after complete 20-min ischemia. *J. Neurol. Sci.*, 1985, 70, 305—316.
15. Pluta R.: Wczesne zmiany ultrastrukturalne w zwojach podstawy, mózdzku i w rdzeniu przedłużonym po całkowitym 30-min niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 245—262.
16. Pluta R.: Wpływ prostacykliny na ultrastrukturę kory mózgu królika po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia. Część I. Neurony i neuropil. *Neuropat. Pol.*, 1987 25, 407—424.
17. Pluta R., Gajkowska B.: Ultrastructural changes in the sensomotor cortex of the rabbit after complete 30-min brain ischemia. *J. Neurosci. Res.*, 1984, 11, 35—47.
18. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10, 267—272.
19. Weinberger L. M., Gibbon M. H., Gibbon J. H. Jr.: Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. I. Physiologic effects. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)*, 1940, 43, 615—634.
20. Wolfe L. S.: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J. Neurochem.*, 1982, 38, 1—14.

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

MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

WPLYW BLOKOWANIA BŁONOWYCH KANAŁÓW WEJŚCIA
WAPNIA
NA ROZWÓJ NIEDOKRWIENNYCH USZKODZEŃ NEURONÓW
SEKTORA CA₁ ROGU AMONA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Mechanizm selektywnego uszkodzenia neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona w krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich jest niewyjaśniony. Jego opóźnienie w stosunku do innych wybiórczo wrażliwych na niedotlenienie okolic i struktur mózgowia, odmienność obrazu mikroskopowo-elektronowego w stosunku do typowych niedokrwienych zmian komórek nerwowych, a wreszcie znamienne zachowanie czynności bioelektrycznej w fazie poprzedzającej rozwój nieprawidłowości prowadzących nieodwołalnie do śmierci komórki sugerują, iż mechanizm ten jest inny niż w większości niedokrwienych zespołów patomorfologicznych. Koncepcją szeroko lansowaną w ostatnich latach jest pogląd, iż powolne, nieodwracalne zmiany neuronów sektora CA₁ rogu Amona w krótkotrwałym, przejściowym niedokrwieniu przodomózgowia zarówno u chomików mongolskich, jak i szczurów są następstwem działania ekscytotoksycznych neuromediatorów aminokwasowych, przede wszystkim glutaminianu (Olney 1978; Meldrum 1981; Meldrum i wsp. 1985; Petito, Pulsinelli 1984; Suzuki i wsp. 1985; Kirino i wsp. 1985). Za taką możliwością przemawia między innymi fakt bogatej inervacji glutaminergicznej neuronów CA₁, pochodzącej z zakończeń odgałęzień kolateralnych Schaffera (Wieraszko 1982), zwiększona aktywność bioelektryczna neuronów CA₁ w okresie pierwszej doby po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983, 1985) oraz charakter wczesnych zmian ultrastrukturalnych komórek, sugerujący ich czynnościową aktywizację (Kirino i wsp. 1984; Petito, Pulsinelli 1984; Mossakowski i wsp. 1987). Przypuszcza się przy tym, że efektem wzmożonej aktywności komórki jest zwiększony napływ wapnia, prowadzący do rozprzężenia jej funkcji metabolicznych i śmierci (Simon i wsp. 1984). Na rolę wapnia w mechanizmie

uszkodzeń komórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym zwraca uwagę szereg autorów (Łazarewicz i wsp. 1978; Wieloch, Siesjö 1981), a hipoteza sformułowana przez Siesjö (1986) o roli dokomórkowego napływu wapnia, jako zasadniczego ogniwa patogenetycznego niedokrwienych zmian neuronalnych, zyskała szeroką akceptację. Uzasadnia to próby ochronnego oddziaływania na niedokrwioną tkankę nerwową przy użyciu farmakologicznych środków blokujących błonowy transport wapnia (Hoffmeister i wsp. 1979; Kazda i wsp. 1979; Steen i wsp. 1983, 1984; Heffez, Passonneau 1985).

Celem niniejszych badań była ocena wpływu blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia przy użyciu nimodipiny na rozwój selektywnych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona, w następstwie krótkotrwałego podwiązania obustronnego tętnic szyjnych wspólnych u chomików mongolskich.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dojrzałych chomikach mongolskich, samcach o masie ciała 70g, którym w narkozie wziewnej (2% narkotan podawany w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) zaciskano obustronnie tętnice szyjne wspólne na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta doświadczalne, którym w różnym czasie w stosunku do incydentu niedokrwienego podawano nimodipinę (Nimotop, firmy Bayer, Leverkusen, RFN), oraz zwierzęta kontrolne, które nie otrzymywały żadnych preparatów farmakologicznych, poza dootrzewnową iniekcją fizjologicznego roztworu chlorku sodu, pozostawiano w warunkach zwierzętarnianych na okres 5 dni. Po tym czasie uśmiercano je przez przezsercową perfuzję zbuforowanym 10% roztworem formaliny.

Nimodipinę podawano w dawce 1 mg/kg masy ciała zwierzęcia, zgodnie z danymi doświadczalnymi Heffeza i Passonneau (1985), w postaci komercyjnie przygotowanego roztworu alkoholowego, zawierającego 10 mg substancji czynnej w 50 ml rozpuszczalnika. Lek podawano w iniekcjach dootrzewnowych, w objętości 0,35 ml roztworu na jedno podanie.

W zależności od częstotliwości podawania leku i czasu w stosunku do incydentu niedokrwienego, wydzielono cztery grupy doświadczalne zwierząt.

Grupa 1 obejmowała 6 chomików mongolskich, które otrzymały dwa podania leku: pierwsze na 60 min przed podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych, drugie w 5 godzinie reperfuzy.

Grupa 2 składała się z pięciu zwierząt również z dwukrotnym zastosowaniem nimodipiny, z tym tylko, że pierwszą dawkę podano na 15 min przed niedokrwieniem, a drugą w 3 godzinie po przywróceniu krążenia mózgowego.

Grupę 3 stanowiło 5 chomików mongolskich z trzykrotnym podaniem nimodipiny. Dwie dawki podane według schematu grupy 2 uzupełniono dodatkową iniekcją leku w 24 godz. po niedokrwieniu.

W grupie 4 obejmującej również 5 zwierząt, nimodipinę podano jednorazowo w 24 godzinie reperfuzyj.

Jak wspomniano powyżej, zwierzęta kontrolne w liczbie 6 nie otrzymywały żadnych substancji czynnych poza jednorazową dootrzewnową iniekcją 0,9% chlorku sodu podaną na 15 min przed podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych. Układ odniesienia stanowiły 3 chomiki mongolskie nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym. Uzyskane wyniki oceniono morfometrycznie według metody opisanej uprzednio (Mossakowski, Gadamski 1987), której podstawą było określenie średniej liczby komórek piramidowych w 0,3 mm odcinku segmentu CA₁ rogu Amona. Średnią wartość uzyskiwano z ogólnej liczby neuronów występujących w 3 odcinkach o tej długości w 3—5 kolejnych skrawkach histologicznych od każdego zwierzęcia. Wyniki odnoszono do wartości uzyskanych u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Uzyskaną w ten sposób średnią równą $44,7 \pm 2,5$ komórek traktowano jako 100%.

Przeprowadzone obliczenia pozwoliły na wyodrębnienie następujących kategorii obrazu morfologicznego:

— brak zmian morfologicznych, gdy liczba komórek piramidowych równa była średniej u zwierząt nie poddanych zabiegom doświadczalnym — całkowity ubytek neuronów piramidowych, charakteryzujący się zastąpieniem warstwy komórek nerwowych proliferującym glejem gwiaździstym,

— częściowy ubytek neuronów piramidowych znamionowało utrzymanie zmiennej proporcji komórek nerwowych, wymagające dalszej kwantyfikacji. Wyodrębniono mianowicie 3 stopnie częściowego ubytku komórek piramidowych: 1° — z utrzymaniem 73,9% populacji neuronów, 2° — z 52,7% oraz 3° — z zachowaniem jedynie 35% średniej, prawidłowej populacji komórkowej.

Statystyczna analiza z użyciem testu t dla niezależnych średnich wykazała znaczną znamienność różnic między poszczególnymi stopniami i między każdym z nich a wartościami prawidłowymi.

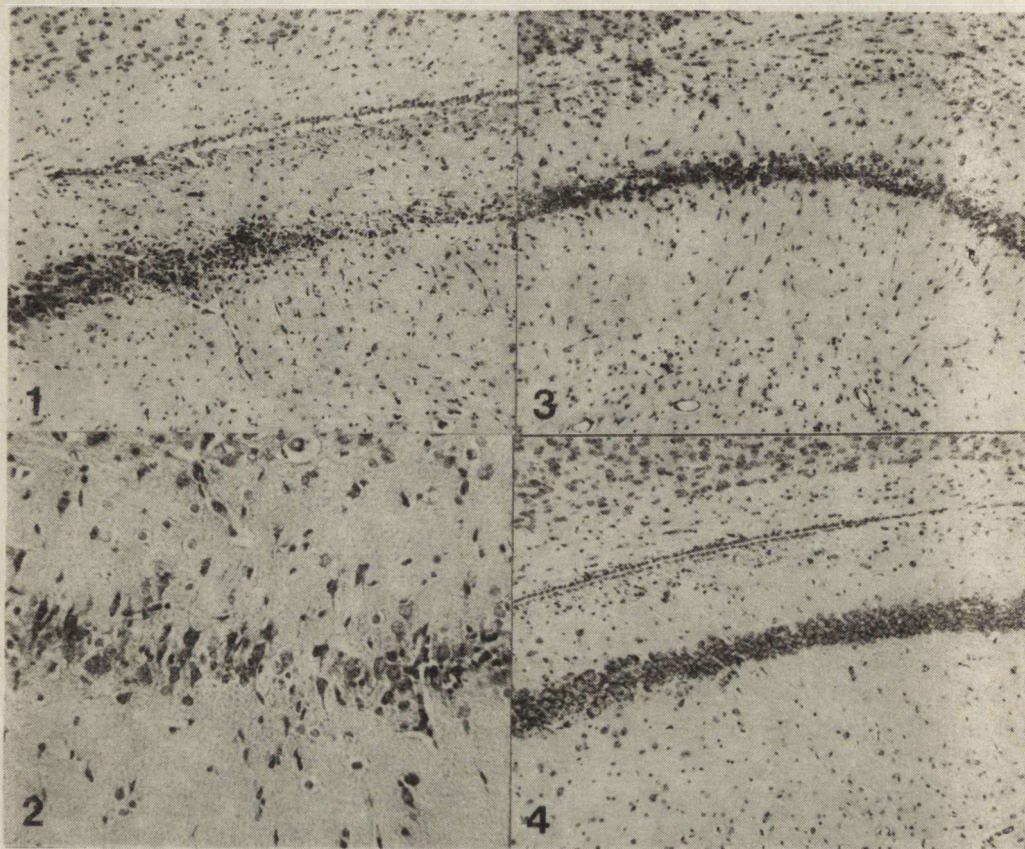
WYNIKI

W grupie kontrolnej obejmującej 6 zwierząt całkowity zanik komórek nerwowych obserwowano w 3 przypadkach, a częściowy w 2, w tym po jednym przypadku w stopniu 1 i 3. U jednego ze zwierząt populacja komórek nerwowych była całkowicie niezmienną.

W grupie doświadczalnej 1, na 6 zwierząt badanych u dwóch obserwowano całkowity ubytek neuronów (ryc. 1), a u dwóch częściowy o nasileniu 3° (ryc. 2). Jedynie u dwóch sektor CA₁ rogu Amona nie wykazywał zmian morfologicznych.

W grupie doświadczalnej 2 sytuacja przedstawiała się podobnie. Spośród 5 badanych chomików mongolskich u 3 obserwowano całkowity ubytek neuronów sektora CA₁, u jednego, z częściowym zanikiem komórek, nasilenie uszkodzeń miało cechy 1° (ryc. 3). Tylko jedno zwierzę charakteryzowało się brakiem zmian sektora CA₁.

W grupie doświadczalnej 3 wszystkie 5 zwierząt wykazywało niezmienny obraz morfologiczny sektora CA₁ rogu Amona (ryc. 4).



Ryc. 1. Zwierzę z grupy doświadczalnej 1. Pogranicze sektora CA₁ i CA₂. W CA₁ kompletny brak neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 1. Experimental group 1. Borderline between CA₁ and CA₂ sectors. Sector CA₁ totally devoid of pyramidal neurons. Klüver—Barrera. × 100

Ryc. 2. Zwierzę z grupy doświadczalnej 1. W sektorze CA₁ zachowanych około 30% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 2. Experimental group 1. In sector CA₁, about 30 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 200

Ryc. 3. Zwierzę z grupy doświadczalnej 2. W sektorze CA₁ zachowanych około 70% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 3. Experimental group 2. In sector CA₁, about 70 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 100

Ryc. 4. Zwierzę z grupy doświadczalnej 3. Pogranicze CA₁ i CA₂. W CA₁ zachowanych 100% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 4. Experimental group 3. Borderline between CA₁ and CA₂ sectors. In sector CA₁ 100 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 100

Tabela 1. Porównanie wyników uzyskanych u zwierząt leczonych i nieleczonych

Table 1. Comparison of results obtained in treated and untreated animals

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Brak zmian patologicznych No pathological changes	Częściowe uszkodzenie neuronów sektora CA ₁ Partial damage of sector CA ₁ neurons			Całkowity ubytek neuronów CA ₁ Total loss of CA ₁ neurons
			1°	2°	3°	
			Zwierzęta nieleczone Untreated animals	6	1	
Zwierzęta leczone Treated animals	21	11	2	1	2	5

Tabela 2. Porównanie wyników u zwierząt leczonych w zależności od schematu stosowania Nimotopu

Table 2. Comparison of results obtained in treated animals in dependence on the program of Nimotop application

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Brak zmian patologicznych No pathological changes	Częściowe uszkodzenie neuronów sektora CA ₁ Partial damage of sector CA ₁ neurons			Całkowity ubytek neuronów sektora CA ₁ Total loss of CA ₁ neurons
			1°	2°	3°	
			Zwierzęta kontrolne Control animals	6	1	
Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	21	11	2	1	2	5
grupa 1 group 1	6	2	—	—	2	2
grupa 2 group 2	5	1	1	—	—	3
grupa 3 group 3	5	5	—	—	—	—
grupa 4 group 4	5	3	1	1	—	—

W grupie doświadczalnej 4 przy późnym, lecz jednorazowym podaniu nimodipiny, wyniki były mniej korzystne, choć lepsze niż w dwóch pierwszych grupach doświadczalnych. Spośród 5 badanych zwierząt nie zmieniony sektor CA₁ rogu Amona stwierdzono u 3, a u 2 pozostałych z częściowym zanikiem neuronów, ich nasilenie odpowiadało stopniowi pierwszemu i drugiemu.

Sumaryczne zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 1 i 2.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie osłaniającego działania nimodipiny (Nimotopu) w stosunku do wybiórczych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona, stanowiących następstwo krótkotrwałego niedokrwienia przodomózgowia u chomików mongolskich. Spostrze-

zenia nasze potwierdzają w tym względzie obserwacje takich autorów, jak Hoffmeister i wsp. (1979), Kazda i wsp. (1979, 1982), Steen i wsp. (1983, 1984), Borgers (1985), Giesvold i Steen (1985), Baethmann i Jansen (1986), Fujisawa i wsp. (1986), Mabe i wsp. (1986), poczynione u różnych zwierząt w odmiennych modelach doświadczalnego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Na osłaniające działanie nimodipiny w naszych badaniach wskazuje porównanie proporcji zwierząt z nie zmienioną, częściowo uszkodzoną i całkowicie zanikłą populacją neuronów sektora CA₁ u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Wśród zwierząt kontrolnych, które nie otrzymywały leku, w połowie przypadków występował zupełny zanik komórek piramidowych sektora CA₁, w jednej trzeciej ich częściowe uszkodzenie, a tylko u jednego z sześciu chomików nie stwierdzono w ogóle uszkodzeń komórkowych. W przeciwieństwie do tego u zwierząt doświadczalnych, którym podawano nimodipinę, obraz komórkowy sektora CA₁ w połowie przypadków nie odbiegał od stwierdzanego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom. Całkowity zanik neuronów występował w jednej czwartej przypadków. W takiej samej proporcji obecne były uszkodzenia częściowe.

Zestawienie wyników uzyskanych w poszczególnych grupach doświadczalnych wskazuje jednakże na zależność ochraniającego wpływu nimodipiny od schematu jej stosowania, dotyczącego zarówno częstości podawania leku, jak i jego okresu w stosunku do przebytego incydentu niedokrwiennego. W dwóch pierwszych grupach doświadczalnych, w których lek podawano na krótko przed podwiązaniem tętnic szyjnych (odpowiednio 60 i 15 min) oraz we wczesnym okresie restytucji krążenia (odpowiednio 5 i 3 godz.), uzyskano wynik negatywny, a proporcje poszczególnych rodzajów zmian komórkowych nie odbiegały zasadniczo od spostrzeganych u zwierząt bez stosowania leku. Najkorzystniejszy wynik, wyrażający się utrzymaniem niezmienionej populacji neuronów CA₁ u wszystkich zwierząt, obserwowano w grupie doświadczalnej 3, w której schemat grupy 2 uzupełniono dodatkową dawką leku podaną w 24 godz. po niedokrwieniu. Również korzystny, jakkolwiek mniej przekonujący niż w grupie 3, efekt działania leku uzyskano u zwierząt, które otrzymywały jego pojedynczą dawkę w 24 godz. po przywróceniu krążenia mózgowego. W grupie tej nie otrzymano wprawdzie całkowitego zahamowania uszkadzających efektów niedokrwienia, lecz proporcja zwierząt bez zmian strukturalnych sektora CA₁, była znacznie większa niż w grupie kontrolnej i w dwóch pierwszych grupach doświadczalnych, a stwierdzone uszkodzenia miały nikłe nasilenie, uchwytne dopiero w ocenie morfometrycznej.

Ta właśnie rozbieżność wyników między grupami z „wczesnym” i „późnym” stosowaniem leku zasługuje na odrębną uwagę, tym bardziej, że różnica schematu doświadczalnego w negatywnej grupie 2 i wysoce pozytywnej grupie 3 sprowadzała się wyłącznie do podania dodatkowej

dawki leku w późnym okresie po restytucji krążenia mózgowego, podczas gdy schemat ten w przypadku obu korzystnych grup 3 i 4 odbiegał od siebie zasadniczo zarówno łączną dawką nimodipiny, jak i całkowitym pominięciem w grupie 4 wczesnego podawania leku.

Wydaje się, że rozbieżności te, podobnie jak i różnice w stosunku do licznych prac wykazujących korzystny osłaniający efekt nimodipiny w warunkach niedokrwienia mózgu (Hoffmeister i wsp. 1979; Kazda i wsp. 1979, 1982; Steen i wsp. 1983, 1984; Borgers 1985; Baethmann, Jansen 1986; Fujisawa i wsp. 1986; Mabe i wsp. 1986), rozpatrywać należy w kontekście właściwości zastosowanego przez nas modelu doświadczalnego, mechanizmów tzw. opóźnionej śmierci neuronów (delayed neuronal death — Petito, Pulsinelli 1984; Suzuki i wsp. 1985; Kirino i wsp. 1985) oraz czasowej sekwencji zmian zachodzących w uszkodzonej komórce (Suzuki i wsp. 1984; Mossakowski i wsp. 1987).

Cechą znaną reakcji neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona w następstwie krótkotrwałego niedokrwienia jest ich bioelektryczna hiperaktywizacja w pierwszej dobie po przywróceniu krążenia mózgowego (Suzuki i wsp. 1983), której w obrazie mikroskopowo-elektronowym towarzyszą ultrastrukturalne wykładniki metabolicznego pobudzenia (Mossakowski i wsp. 1987). Dopiero druga doba po niedokrwieniu przynosi wygasanie aktywności bioelektrycznej i pojawianie się ultrastrukturalnych cech uszkodzenia neuronu. Wśród tych ostatnich zwraca uwagę śródplazmatyczne gromadzenie się elektronowo gęstych, amorficznych struktur, uznanych przez Kirino i wsp. (1985) za odkładające się złoży wapnia. Dokomórkowa penetracja wapnia, przyczynowo związana ze zjawiskiem hiperaktywności bioelektrycznej neuronów, w zastosowanym przez nas modelu doświadczalnym wydaje się zjawiskiem późnym. Na późne gromadzenie się wapnia w neuronach w następstwie niedokrwienia zwracali uwagę również inni autorzy, między innymi Yanagihara i McCall (1982) oraz Hossmann i wsp. (1985). Ci ostatni uważają zresztą śródkomórkowy napływ wapnia za zjawisko nakładające się na szereg wcześniejszych procesów patologicznych prowadzących do uszkodzenia neuronów.

Doświadczenia nasze wskazują na korzystne oddziaływanie blokowania kanałów wejścia wapnia w 24 godz. po niedokrwieniu, a więc w okresie wygasania hiperaktywności bioelektrycznej komórki nerwowej. W zestawieniu ze wspomnianymi powyżej zmianami ultrastrukturalnymi wydaje się, że jest to okres największego dokomórkowego napływu wapnia. Nimodipina podana parenteralnie szybko gromadzi się w ośrodkowym układzie nerwowym osiągając maksymalne stężenie w 15 min po iniekcji. Spadające do połowy w ciągu kolejnej godziny mózgowe stężenie leku jest nadal wystarczające dla jego farmakologicznej aktywności (Heffez i wsp. 1985). Najkorzystniejszy wynik uzyskany w grupie

doświadczalnej 3 wskazuje równocześnie na zasadność jego wcześniejszego podawania.

W świetle uzyskanych przez nas wyników, wydaje się uzasadnione stwierdzenie, że w warunkach stosowanego modelu doświadczalnego krótkotrwałego niedokrwienia mózgu, mieszczącego się w czasowych granicach odwracalności zmian strukturalnych, a prowadzącego wyłącznie do wybiórczego uszkodzenia neuronów sektora CA₁ rogu Amona, najbardziej skuteczne jest osiągnięcie odpowiedniego tkankowego stężenia leku w końcowym okresie pierwszej doby po przywróceniu krążenia mózgowego. Jego skuteczność wzrasta przy poprzedzającym podawaniu nimodipiny. Wkroczenie ze stosowaniem leku wyłącznie w okresie niedokrwienia i we wczesnych fazach recyrkulacji okazało się nieskuteczne. Wydaje się przy tym, że z różnicami modeli doświadczalnych, głębokości niedokrwienia oraz czasu stosowania substancji blokujących kanały wejścia wapnia w relacji do określonej fazy niedokrwienia i recyrkulacji należy wiązać odmienności efektów uzyskiwanych przez poszczególnych badaczy, w tym również negatywne wyniki opisane przez Barnetta i wsp. (1986) oraz Vibulsrestha i wsp. (1987). W rozważaniach tych uwzględnić należy również opinię Petersa (1987), który uważa, iż w warunkach *in vivo* substancje blokujące wejścia wapniowe opóźniają, a nie zapobiegają penetracji wapnia do komórki. Może to właśnie uzasadnić niezbędność wielokrotnego podawania leku, podtrzymującego opóźnienie wnikania wapnia do czasu funkcjonalnej restytucji błony komórkowej uszkodzonej przez niedokrwienie. Może również stanowić wskazanie do równoczesnego stosowania innych środków farmakologicznych o działaniu membranoprotekcyjnym, np. prostacykliny PGI₂ (Mossakowski, Gadamski 1987).

Mechanizm osłaniającego działania nimodipiny w warunkach niedokrwienia mózgu jest zagadnieniem nie rozstrzygniętym. Znaczna grupa autorów, w tym przede wszystkim Kazda i wsp. (1979), Steen i wsp. (1983, 1984) oraz Giesvold i Steen (1985), stoją na stanowisku, iż u podstaw korzystnego oddziaływania nimodipiny leży jej normalizujący wpływ na mózgowy przepływ krwi. W ostatnich latach ukazały się jednak prace sugerujące metaboliczne działanie, niezależne od czynników krążeniowych (Borgers 1985; Heffez, Passonneau 1985; Mabe i wsp. 1986). Szczególnie przekonujące w tym względzie są spostrzeżenia Heffeza i Passonneau (1985), którzy wykazali zróżnicowany efekt nimodipiny na różne parametry zaburzonego w następstwie niedokrwienia metabolizmu mózgu, odmienny zresztą w poszczególnych jego okolicach, pozwalający jeśli nie na wyłączenie roli czynnika naczyniowego, to przynajmniej na uznanie oddziaływań metabolicznych za niezależne od wpływów krążeniowych. Za bezpośrednim działaniem cytoprotekcyjnym nimodipiny przemawiają również nasze spostrzeżenia. W późnym okresie recyrkulacji, w którym oddziaływanie leku okazało się najskuteczniejsze, w stosowanym modelu doświadczalnym nie występują zaburzenia mikrokrą-

zenia (Mossakowski 1978). Niewielkie zresztą nasilenie nieprawidłowości krążenia mózgowego spotyka się natomiast we wczesnym okresie recyrkulacji, kiedy podawanie leku nie wywierało korzystnego wpływu. Heffez i Passonneau (1985) podkreślają również, iż nimodipina nie działała na zjawisko poniedokrwiennej hiperperfuzji, odgrywającej rolę czynnika uszkodzającego tkankę nerwową. Za cytoprotekcyjnym działaniem nimodipiny przemawiają również wyniki badań prowadzonych na pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej poddanej głębokiemu niedotlenieniu (Renkawek, Łazarewicz 1987). Warto przy tym podkreślić, iż w warunkach anoksji *in vitro* stwierdzono zbliżoną do naszych spostrzeżeń czasową zależność skuteczności cytoprotekcyjnej leku.

INFLUENCE OF THE CALCIUM CHANNEL BLOCKER ON THE ISCHEMIC CHANGES IN SECTOR CA₁ PYRAMIDAL NEURONS OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBILS

Summary

The protective effect of Nimotop (Bayer) — a calcium channel blocker, being an equivalent of nimodipine, on the development of selective damage of CA₁ neurons of Ammon's horn resulting from short-term ischemia of forebrain in Mongolian gerbils was evaluated. The experimental animals, subjected to 7.5 min bilateral ligation of common carotid arteries were given the drug in a dosis of 1 mg/kg body weight in the form of intraperitoneal injection at various periods in relation to cerebral ischemia. In group 1 — Nimotop was administered twice — 60 min before ischemia and 5 h after arterial release. In group 2 a double dosis of the drug was given 15 min prior to carotid occlusion and in 3rd hour of the recirculation. In group 3 the scheme applied in group 2 was supplemented with a third dosis of Nimotop given 24 h following cerebral ischemia. The latter was the time of a single drug dosis application in group 4. The control animals were subjected to cerebral ischemia with no medication.

Experimental and control animals were sacrificed by transcardiac perfusion with 10% neutral formalin 5 days after ischemia. The state of CA₁ neurons of Ammon's horn was morphometrically evaluated in paraffin sections stained according to the Klüver-Barrera method in comparison with the picture characteristic for animals not subjected to any experimental procedure.

It was found that Nimotop exerts a full protective effect on pyramidal neurons of the CA₁ sector only in the case of its repeated application extended over 24 h following cerebral ischemia. A positive, although less conspicuous, effect was obtained with a single drug dosis applied at a late postischemic period, while a double dosis given in the early periischemic state remained ineffective.

Basing on the obtained results the authors suppose that the late effectiveness of the calcium channel blocker demonstrated in the presented results is connected with particularities of the experimental model applied in which the mechanism of neuronal damage and death is related with an excitotoxic action of the amino acid neurotransmitter (s). Delayed death of CA₁ pyramidal neurons is preceded by their hyperactivity lasting for the period of one day following cerebral ischemia. This period of functional neuronal hyperactivity is with all probability con-

nected with intracellular influx of calcium ions, leading to cellular irreversible damage. The results obtained suggest that this period is to be covered by the blocking action of the drug. Results of experiments with a single dose of the blocker given in late postischemic period may indicate its special importance in the development of postischemic pathology.

ВЛИЯНИЕ БЛОКИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ИШЕМИЧЕСКИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕВРОНОВ СЕКТОРА CA_1 АММОНИЕВА РОГА МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА

Резюме

Оценялось предохранительное действие Nimotopa являющегося эквивалентом Nimodipina на развитие селективных повреждений нейронов сектора CA_1 аммониева рога, появляющихся вследствие кратковременной ишемии переднего мозга у монгольских хомяков. Экспериментальные животные подвергнутые на 7,5 минут закупорке обеих общих сонных артерий, получали лекарство в интрабрюшинной инъекции 1 мг/1 кг массы тела в разном времени от ишемии. В I группе лекарство вводилось 2 раза: 60 минут перед ишемией и 5 часов после рециркуляции. Во II группе двухкратная доза применялась 15 минут перед перевязкой сосудов и 3 часа после их освобождения. В группе III схема группы II была дополнена добавочной дозой лекарства 24 часа после рециркуляции. В это же время подавалась однократная доза лекарства в группе IV. Контрольный материал составляли животные с аналогичной ишемией мозга, но не получившие лекарства. Экспериментальные и контрольные животные были умерщвлены интрасердечной перфузией 10% формалина. Состояние нейронов сектора CA_1 аммониева рога оценивалось морфометрически на парафинных срезах окрашенных методом Klivera-Barrery, сопоставляя полученные результаты с образом у животных не подвергнутых никаким экспериментальным процедурам. Выявлено, что применение Nimotopa полностью предохраняет нейроны сектора CA_1 только при многократном его введении в течение 24 часов после ишемии. Полезный, хотя менее убеждающий эффект был получен при разовым поздним введением лекарства. Двухкратное введение в раннем ишемическом периоде было безрезультатно.

На основании полученных результатов авторы предполагают, что эффективность позднего блокирования мембранных кальциевых каналов — это явление, свойственное только в употребленной экспериментальной модели с особым механизмом повреждения и смерти нейронов, связанным с эксцитотоксическим действием аминокислотных невротрансмиттеров. Смерть нейронов предшествует их гиперактивности, выступающая в первый день после ишемии. В этом именно периоде гиперактивности нейронов совершается, по-видимому, приток в клетку кальция, ведущий к ее необратимому повреждению. Полученные результаты внушают, что в этом именно периоде нужно вводить средства блокирующие кальциевые каналы. Результаты полученные при разовом поздним введением лекарства свидетельствуют о особом значении поздней фазы гиперактивности клетки.

PIŚMIENICTWO

1. Baethmann A., Jansen M.: Possible role of calcium entry blockers in brain protection. *Europ. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 102—114.
2. Barnett B. H., Bose B., Little J. R., Jones S. C., Friel H. T.: Effects of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 884—890.
3. Borgers M.: Morphological assessment of tissue protection. W: Calcium entry blockers and tissue protection. Red. T. Godfaind, P. M. Vanhoutte, S. Govoni, R. Paoletti. Raven Press, New York, 1985, str. 173—181.

4. Fujisawa A., Matsumoto M., Matsuyama T., Heda H., Wanaka A., Yoneda S., Kimura K., Komada T.: The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 748—752.
5. Giesvold S. E., Steen P. A.: Drug therapy in brain ischemia. *Brit. J. Anaesth.*, 1985, 57, 96—109.
6. Heffez D. S., Nowak T. S. Jr., Passonneau J.: Nimodipine levels in gerbil brain following parenteral drug administration. *J. Neurosurg.*, 1985, 63, 589—592.
7. Heffez D. S., Passonneau J. V.: Effect of nimodipine on cerebral metabolism during ischemia and recirculation. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 1985, 5, 523—528.
8. Hoffmeister F., Kazda S., Krause H. P.: Influence of nimodipine (Bay e 9736) on the postischemic changes of brain function. *Acta Neurol. Scand.*, 1979, 60, suppl. 72, 358—359.
9. Hossmann K.-A., Gross-Ophoff B., Schmidt-Kastner R., Oschlies Ü.: Mitochondrial calcium sequestration in cortical and hippocampal neurons after prolonged ischemia of the cat brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1985, 68, 230—238.
10. Kazda S., Hoffmeister F., Garthoff B., Toward R.: Prevention of the post-ischemic impaired perfusion of the brain by nimodipine (Bay e 9736). *Acta Neurol. Scand.*, 1979, 60, suppl. 72, 302—303.
11. Kazda S., Garthoff B., Krause H. P., Schlossmann K.: Cerebrovascular effects of the calcium antagonists dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. *Arzheim Forsch. Drug Res.*, 1982, 32, 331—338.
12. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the hippocampus following brief ischemia. W: *Cerebral ischemia*. Red.: A. Bes, P. Braquet, R. Paoletti, B. K. Siesjö, Elsevier, Amsterdam, 1984, 25—34.
13. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia — reversible and irreversible types of ischemic cell damage. W: *Progress in Brain Research.*, Red.: K. Kagure, K. A. Hossmann, B. K. Siesjö, F. A. Welsh. Elsevier, Amsterdam, 1985, 63, 39—58.
14. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W: *Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension*. Red.: M. J. Mossakowski, I. Zelman, H. Kroh. *Pol. Med. Publ.*, Warszawa, 1978, str. 79—86.
15. Mabe H., Nagai H., Takagi T., Amenura S., Ohno M.: Effect of nimodipine on cerebral functional and metabolic recovery following ischemia in the rat brain. *Stroke*, 1986, 17, 501—505.
16. Meldrum B. S.: Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and the causation of epileptic brain damage. W: *Metabolic disorders of the nervous system*. Red.: F. C. Rose. Pitman, London, 1981, str. 175—187.
17. Meldrum B., Evans M., Griffiths T., Simon R.: Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and calcium entry. *Brit. J. Anaesth.*, 1985, 57, 44—46.
18. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*. Red.: J. Cervos-Navarro. Raven Press, New York, 1978, 20, 161—171.
19. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ prostacykliny PGI₂ i indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 21—34.
20. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Cicishvili A.: Ultrastructure of CA₁ sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1987 (in press).

21. Olney J. W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. W: Kainic Acid as a Toll in Neurobiology. Red.: E. G. McGeer, J. W. Olney, P. L. McGeer. Raven Press, New York, 1978, str. 37—70.
22. Peters T.: Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 27—44.
23. Petito C. K., Pulsinelli W. A.: Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 194—205.
24. Renkawek K., Łazarewicz J. W.: Protective effect of the calcium entry blocker, nimodipine on cns organotypic cultures submitted to anoxia. *Neuropat. Pol.*, 1987 w druku.
25. Siesjö B. K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 45—50.
26. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 350—361.
27. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. P.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1983, 3, 38—48.
28. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Cerebral blood flow and neurologic outcome when nimodipine is given after complete cerebral ischemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 82—87.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba Y., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. W: Progress in Brain Research. Red.: K. Kogure, K. A., Hossmann, B. K. Siesjö, F. A. Welsh. Elsevier, Amsterdam, 1985, 63, str. 59—68.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Li C. L., Klatzo I.: The effects 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes of the spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA₁ sector of hippocampus. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1983, 60, 217—222.
31. Vibulsresth S., Dietrich W. D., Busta R., Ginsberg M. O.: Failure of nimodipine to prevent ischemic neuronal damage in rats. *Stroke*, 1987, 8, 210—216.
32. Yanagihara T., McCall J. T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci.*, 1982, 30, 1921—1925.
33. Wieloch T., Siesjö B. K.: Ischemic brain injury: the importance of calcium, lipolytic activities and free fatty acids. *Pathol. Biol.*, 1981, 30, 269—277.
34. Wieraszkowski A.: Biochemiczne przejawy plastyczności synaps w hipokampie ze szczególnym uwzględnieniem roli kwasu glutaminowego jako domniemanego neurotransmitera w niektórych szlakach hipokampalnych. Rozprawa habilitacyjna. Autoreferat. Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa, 1982.

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

MARIA BARCIKOWSKA-LITWIN, STANISŁAW KRAJEWSKI *, EWA DOLIŃSKA,
JANINA RAFAŁOWSKA

LYMPHOCYTES WITHIN THE INFARCT AREA IN HUMAN BRAIN **

Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw * Department of Neuro-
pathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw

The chronological sequence of the ischemic brain tissue breakdown and its morphotic components have been known for a long time (Greenfield 1963; Sörnäs et al. 1972; Levis 1976; Rabinowitz 1979). It has been found, however, that this sequence of events may be determined by the age of patients. In patients over 80 years of age, deceased owing to the brain infarction, the cell reaction occurred later and different morphotic elements remained within infarcted area longer than in the control group of younger patients, who died with the same brain pathology. This cellular reaction was much more protracted than it has been assumed up till now (Barcikowska-Litwin 1984).

In the group of 74 brains of patients with ischemic cerebral infarct, used for the above mentioned studies in 17 cases (23 per cent) presence of lymphocytes, among other cellular elements of the necrotic tissue was noted. The assessment of these cases seemed to be of particular interest, because lymphocytes may represent the exponents of immunological process, accompanying ischemic brain lesion.

MATERIAL AND METHODS

Seventeen brains with lymphocytic infiltration found among 74 brains of patients, who died in the Department of Neurology, School of Medicine in Warsaw, from ischemic brain damage, were examined.

Patients were 50 to 87 years old. The survival period after ischemic brain accident was 5 days to 3 years. In most of the patients this was the only brain infarct. In 3 cases the second ischemic stroke was the fatal one. Arterial hypertension was diagnosed in seven cases and diabetes mellitus in three. Basic clinical characteristics is presented in the Table 1.

** Study supported by Polish Academy of Sciences (Grant No. 06.02.II.1.4).

Table 1. Material

Tabela 1. Materiał

A. Clinical data

Dane kliniczne

No Lp.	Sex Płeć	Age Wiek	Survival time (days) Okres przeżycia (dni)	Previous stroke (years ago) Poprzedni udar	Other diseases Inne choroby						Cause of decease Przyczyna zgonu		
					Arterioscle- rosis Miażdżycza	Arterial hypertension Nadciśnie- nie	Diabetes mellitus Cukrzyca	Arrhythmia Zab. rytmu serca	Heart infarct Zawał serca	Malignant neoplasm Nowotwór złośliwy	Pulmonary artery emb. Zator t. płucnej	Heart infarct Zawał m. serca	Pneumonia Zapalenie płuc
1	M	55	5	2	++	+	+						
2	K	85	10		+			+			+		
3	K	87	11		+	+			+				+
4	K	87	11		+++			+	+		+		
5	M	50	12		+						+		
6	K	82	13		++	+	+				+		+
7	K	87	14		+++	+							
8	K	87	15		+++				+		+		
9	M	77	16		+++		+						+
10	K	85	18		+++						+		
11	K	86	18		++++	+		+			+		
12	K	80	28		++								
13	M	76	28	2	+++	+			+				
14	K	83	32		++	+		+			+	+	
15	K	83	39	10	++			+	+				+
16	M	79	46		++				+		+		+
17	M	60	3 yrs lata		++				+			+	

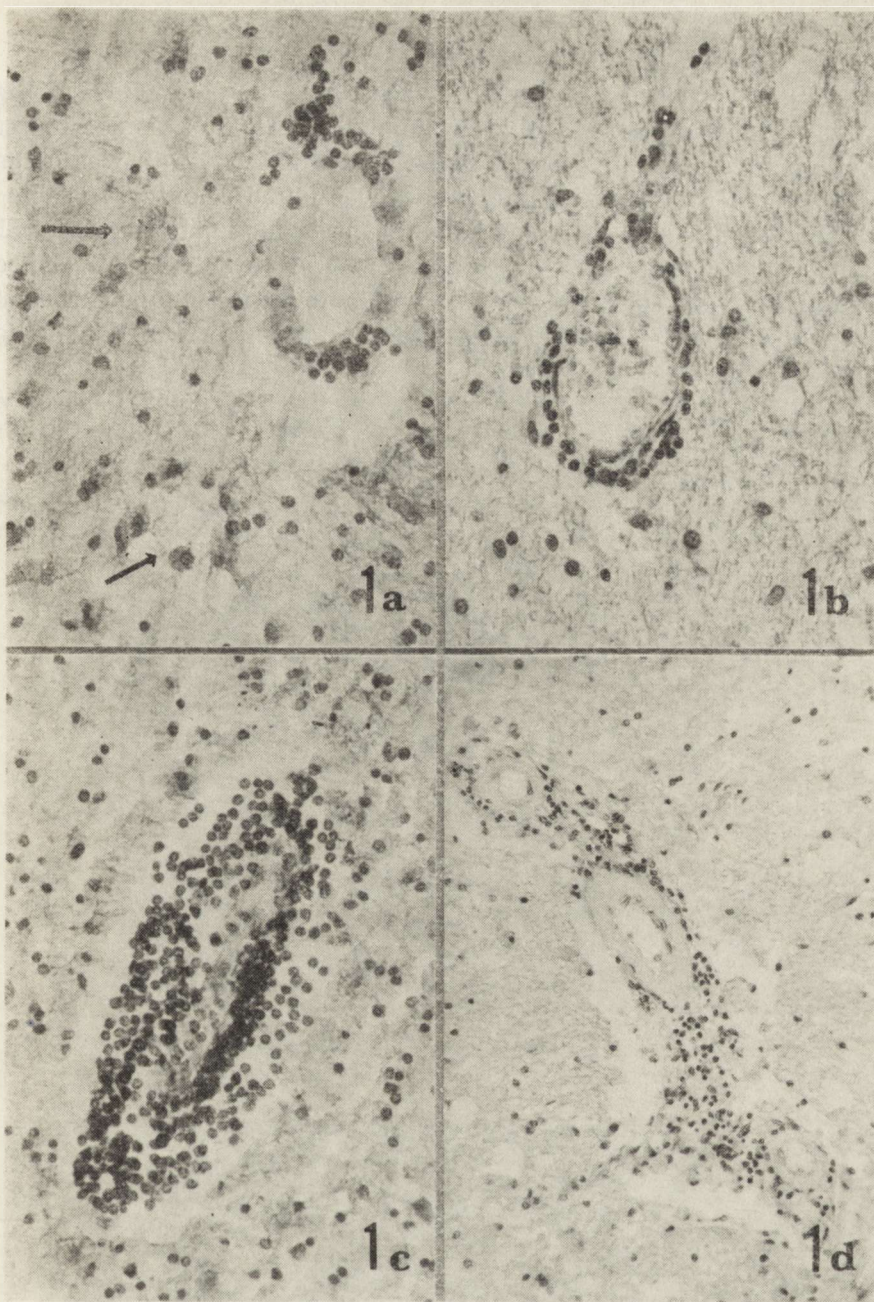


Fig. 1a. Discrete lymphocytic infiltration (+) in the vicinity of small vessel. H—E. $\times 200$

Ryc. 1a. Dyskretny naciek limfocytny w okolicy małego naczynia. H—E. Pow. $200 \times$

Fig. 1b. Mononuclear infiltration classified as monolayer (++) in infarct area. H—E. $\times 200$

Ryc. 1b. Naciek komórek jednojądrzastych, zakwalifikowany jako jednowarstwowy (++) w polu zawału. H—E. Pow. $200 \times$

Fig. 1c. Lymphocytic cuff (+++) around venous vessel in ischemic tissue. H—E. $\times 200$

Ryc. 1c. Wielorządowy okołożylny naciek limfocytny (+++). H—E. Pow. $200 \times$

Fig. 1d. Lymphocytic infiltration grade ++ to +++ around small arterioles. H—E. $\times 200$

Ryc. 1d. Nacieki limfocytny zakwalifikowane jako ++ do +++ dookoła tętniczek. H—E. Pow. $200 \times$

In all cases autopsy was performed within 24 hours after death. Eight patients died because of embolus of pulmonary artery, 2 — due to heart infarct. In 5 cases bilateral pneumonia as a cause of death was diagnosed. In 2 further cases neoplastic disease was found at autopsy (Table 1).

Brains fixed in 10% calcium formaline were examined macroscopically. Paraffin-embedded sections of the damaged cerebral hemisphere and contralateral "healthy" ones were stained with following methods: hematoxylin—eosin, Luxol-fast blue, van Gieson, and then examined in a light microscope.

The intensity of lymphocytic reaction in the perivascular spaces was determined according to a score from 1 + to 3 +:

+ — a few perivascular lymphocytes (Fig. 1a).

++ — single layers of lymphocytes around the vessel (Fig. 1b).

+++ — perivascular lymphocytic cuff (Fig. 1c).

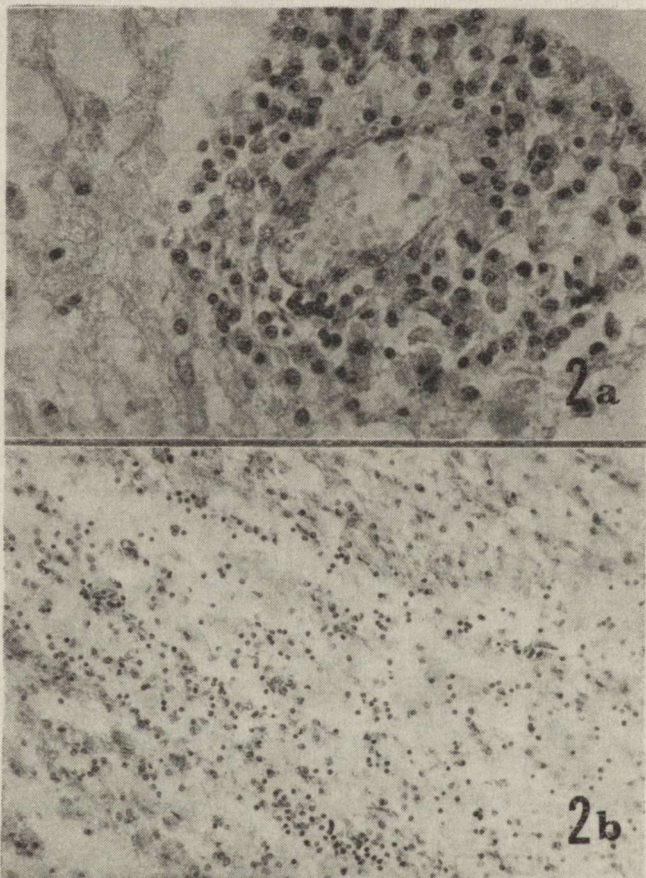


Fig. 2a. Mixed cuff around small vein containing lymphocytes, macrophages and some plasma cells. H—E. $\times 400$

Ryc. 2a. Wielorzędowy naciek dookoła małego naczynia żylnego, składający się z limfocytów, makrofagów i pojedynczych komórek plazmatycznych. H—E. Pow. $400 \times$

Fig. 2b. Infarcted tissue with dispersed lymphocytic infiltration. H—E. $\times 200$

Ryc. 2b. Rozproszony naciek limfocytarny w obszarze zawału. H—E. Pow. $200 \times$

The intensity of macrophage and gemistocytic reaction also was estimated in the same way.

+ — a small number of macrophages and gemistocytes,

++ — moderate number of them,

+++ — severe macrophage and gemistocytic reaction.

RESULTS

Lymphocytes were found between 5 and 9 days (3 cases), after 10—20 days (10 cases), 30—40 days (3 cases) and 3 years (1 case) from the date of the ischemic stroke.

Mononuclear cell infiltration was of different intensity in various cases (Table 2) and also within the same area of the infarct. Lymphocytes, usually observed at the margin of the ischemic focus were mainly

Table 2. Lymphocytic, macrophage and glial reaction in the hemisphere with infarction

Tabela 2. Reakcja limfocytarna, glejowa i makrofagowa w półkuli z zawałem mózgu

B. Morphological examination

Ocena morfologiczna

No Lp.	Sex Płeć	Age Wiek	Survival time (days) Okres przeżycia (dni)	Previous stroke (years ago) Poprzedni udar	Perivascular lymphocytic infiltration Okółonaczyniowy naciek limfocytarny			Other morphological elements within the infarct area Inne elementy mor- fologiczne w obszarze zawału		Subara- chnoideal space pe- rivasculars infiltrations Podpa- jęczynów- kowe nacieki okółona- czyniowe
					Single cells Pojedy- nczyne komórki	Mono- layer infiltra- tion Naciek jedno- rzędowy	Multi- layer infiltra- tion Naciek wielo- rzędowy	Gemisto- cytes Gemisto- cyty	Macro- phages Makro- fagi	
1	M	55	5	2	++	+	+	+	+	
2	K	85	10		++	++		+	+	+
3	K	87	11		++	++	+++	+++	+++	+
4	K	87	11		+					+
5	M	50	12		++	+			+	
6	K	82	13		++	+	++	+	++	+
7	K	87	14		++	+		+	+++	
8	K	87	15		+	+			++	+
9	M	77	16			++	++		+++	+
10	K	85	18		++	+	+	+	+	+
11	K	86	18		++	+	++	+	+	+
12	K	80	28		+	++	++		+++	
13	M	76	28	2	+			+++	+	
14	K	83	32		++	+	+	+	+++	+
15	K	83	39	10	++	+		++		
16	M	79	46			++	+	+		
17	M	60	3 yrs lata		++	+	++	+++	+	

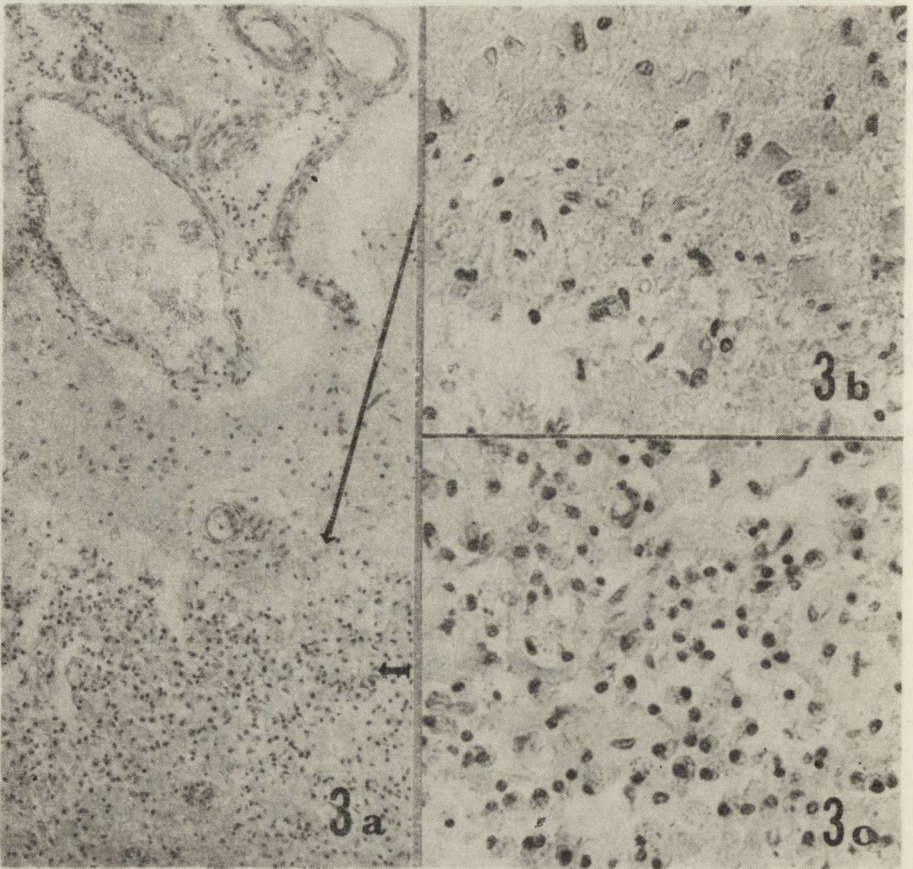


Fig. 3a. Infarcted area in the cortex with slight lymphocytic reaction in the subarachnoid space. H—E. $\times 100$

Ryc. 3a. Niewielka reakcja limfocytarna w przestrzeni podpajęczynówkowej przyległej do obszaru martwicy w korze. H—E. Pow. $100 \times$

Fig. 3b. Higher magnification of the border of ischemic lesion (long arrow in the Fig. 3a) with many gemistocytes and single microglial cells. H—E. $\times 400$

Ryc. 3b. Brzeg ogniska martwiczego (długa strzałka na ryc. 3a) z licznymi gemistocytami oraz pojedynczymi komórkami mikrogleju w większym powiększeniu mikroskopowym. H—E. Pow. $400 \times$

Fig. 3c. Necrotic area (short arrow in the Fig. 3a) with many macrophages and single lymphocytes. H—E. $\times 400$

Ryc. 3c. Obszar martwicy (krótka strzałka na ryc. 3a) z licznymi makrofagami i pojedynczymi limfocytami. H—E. Pow. $400 \times$

discreet and frequently surrounded venous vessels (Figs 1a, b, c). Sporadically mononuclear infiltrations were seen in the vicinity of small arterioles (Fig. 1d). In 10 cases lymphocytic infiltrations were categorized, as cuffs, in which single plasmatic cells appeared (Figs 1c, d, 2a). In case no. 3 perivascular infiltration was extremely intensive. In some cases lymphocytes were dispersed in necrotic tissue without distinct connection with vessels (Fig. 2b). In 10 cases single lymphocytes were found in subarachnoid space in the hemisphere with infarction (Fig. 3a).

Commonly, in the neighborhood of lymphocytic infiltrations glial proliferation with numerous gemistocytes, microglial cells and macrophages were found (Figs 3a, b, c).

Table 2 indicates, that in all cases the lymphocytes were present in the infarcted area containing macrophages and gemistocytes or in the surroundings of both kinds of these cells (Figs 3a, b, c). In heterolateral hemispheres examined at the level of the focus in the damaged hemisphere, only in one case were a few lymphocytes present in the perivascular space.

DISCUSSION

In the brains of 74 patients with ischemic brain stroke, neuropathological examination revealed the presence of mononuclear perivascular and interstitial infiltrations of the infarcted area in 23% of the cases. Lymphocytes were absent in other intact regions of the brain, including the contralateral hemisphere. An exception was the case with additional infarcts seen in both hemispheres (case No. 3). The infiltrations were not connected with hematogenic bacterial or viral perivenous meningoencephalitis. In the majority of cases there were only disseminated vascular changes connected with arteriosclerosis and/or features of hypertensive encephalopathy.

The most interesting findings were noted in case no. 3 in which heavy perivascular and dispersed lymphocytic infiltrations in the interstitial tissue of the infarct were seen. It seems that the presence and intensity of lymphocytic reaction in our material was related only to the appearance and the quantity of macrophages and gemistocytes. This local immune activity was not dependent on the age and survival period of the patients.

In the available literature we did not find any date on this kind of morphological and immunological reactions in brain infarcts. Similar infiltrations in brain tumors were considered as a reaction towards the invasion of tumor cells, which are characterized by special foreign antigens and immune complexes (Hitchcock et al. 1977; Martin-Achord et al. 1980; Krajewski et al. 1986). It is possible, that the breakdown of the nerve tissue in the ischemic brain lesions becomes a source of normal and modified antigens of the CNS. Due to simultaneous blood-brain barrier disturbances this can cause an immunological response, similar to the response observed in the CNS tumors.

Additional confirmation of the hypothesis concerning antigen release from necrotic tissue may be the fact that lymphocyte occurrence was constantly accompanied by gemistocytes and/or macrophages. One of the roles of macrophages is presentation of antigens in the process of immu-

nological memory and in the transfer of information to the peripheral immunological system for production of specific antibodies.

The role of astrocytes and their gemistocytic forms was widely studied, however, it seems still to be insufficiently recognized. Recently, there are reports concerning the macrophageal function of astrocytes in primary tissue culture (Noske et al. 1982) with expression of special superficial membrane markers and presentation of myelin basic protein antigen to T-cells in multiple sclerosis brains (Woodroof et al. 1986) or to the encephalitogenic T-cell line in tissue culture (Fontana et al. 1984).

Probably in other pathological processes in the brain they may also take part in such cooperation with the immune system, presenting for example, as in our case, antigens from necrotic CNS tissues.

The circulation of specific anticerebral antibodies in sera of patients with stroke has already been reported (Makinodan 1976; Redei et al. 1979; Cohen, Eisdorfer 1980; Dwilewicz-Trojaczek 1981; Goodwin et al. 1982; Nandy 1982).

In this context one can presume that the second infarct, because of previous contact with CNS antigens should be a provoking factor for a fast and extensive antibody-cell mediated reaction. However, our three cases with the repeated brain infarcts showed only a moderate intensity of the lymphocytic reaction. We do not know, however, exactly the whole immunological status, e.g. serology, of our patients. Maybe the above observation is connected with a very early (5 days) or very late (28 and 39 days) period of necrotic lesion organisation. The small number of these cases does not allow conclusions on the dependence between the cellular immune response and the duration of the disease. This relationship could not be noted in all of our cases, either in the first, or in the second ischemic stroke. It may be an argument for great individual differences in the immunological system function.

Summarizing our observations we suggest a local activity of the immunological and nervous system in organization of the necrotic focus caused by cerebral ischemia.

LIMFOCYTY W OBSZARZE ZAWAŁU MÓZGU U LUDZI

Streszczenie

Z grupy 74 mózgów chorych zmarłych wskutek zawału mózgu, wyodrębniono 17 przypadków (23%), w których w ognisku rozmiękania, znajdującym się w różnej fazie procesu rozbiórkowego i organizacji, oprócz typowych elementów komórkowych procesu patologicznego, występowały limfocyty. Nacieki limfocytarne, przeważnie okołozylne, zlokalizowane były w obszarze zawału, na jego obrzeżu i niekiedy w przestrzeni podpajęczynówkowej w pobliżu ogniska martwicy. Czasem w martwiczych tkankach występował rozproszony naciek limfocytarny. We wszyst-

kich przypadkach stwierdzono obecność makrofagów lub/i gemistocytów. Obrazy powyższe wskazują na miejscową reakcję immunologiczną, w której źródłem antygeny są prawdopodobnie martwicze tkanki. Wzięto pod uwagę możliwość udziału gemistocytów w prezentacji antygeny w reakcji immunologicznej stanowiącej następstwo zawału mózgu.

Niewielka stosunkowo proporcja przypadków naczyniopochodnej martwicy mózgu z okołonaczyniowymi naciekami limfocytarnymi może świadczyć o znacznych różnicach indywidualnych w reakcji układu immunologicznego.

ЛИМФОЦИТЫ В ОЧАГЕ МОЗГОВОГО ИНФАРКТА У ЛЮДЕЙ

Резюме

В мозгах 74 случаев умерших вследствие ишемического инсульта, обнаружено 17 случаев (23%), в которых в полушарии с инфарктом кроме обыкновенных морфотических элементов инфаркта были найдены лимфоциты. Лимфоцитарные инфильтраты, главным образом околоуенозные, были размещены в очаге некроза, в окружающих его тканях и, иногда, в субарахноидальном пространстве вблизи очага некроза. Иногда в некротических тканях был обнаружен рассеянный лимфотический инфильтрат. Во всех случаях были найдены макрофаги и/или гемистойиты. Эти данные внушают местную иммунологическую реакцию, в которой источником антигена являются, вероятно, некротические ткани. Рассматривается возможность участия гемисточитов в представлении антигена в иммунологической реакции.

Небольшая часть случаев некроза мозга сосудистого происхождения с обнаруженными околососудистыми лимфоцитарными инфильтратами свидетельствует о значительных индивидуальных отклонениях в реакции иммунологической системы.

REFERENCES

1. Barcikowska-Litwin M.: Obraz morfologiczny ogniska rozmiękania mózgowego w wieku starczym. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 4, 564—582.
2. Cohen D., Eisdorfer C.: Autonuclear antibodies in the cognitively impaired elderly. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 1980, 168, 179—180.
3. Dwilewicz-Trojaczek J.: Badania nad stanem układu immunologicznego w okresie starzenia się. *Pol. Tyg. Lek.*, 1981, 24, 1289—1291.
4. Fontana A., Fierz W., Vekerle A.: Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature*, 1984, 307, 273—276.
5. Goodwin J. S., Searles R. P., Tung K. S. K.: Immunological response of a healthy elderly population. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, 48, 403—410.
6. Greenfield J. G.: Vascular disease of the central nervous system. In: Greenfield's *Neuropathology*. Eds: W. Blackwood, W. H. McMenemey, A. Meyer, R. H. Norman, D. S. Russell, E. Arnold, London, 1963, pp. 71—111.
7. Hitchcock M. M., Hollinshead A. C., Chretien P., Rizzoli H. V.: Soluble membrane antigens of brain tumors. I. Controlled testing for cell-mediated immune response in a longsurviving glioblastoma multiforme patient. *Cancer*, 1977, 40, 660—666.
8. Krajewski S., Schwendemann G., Weizsäcker M., Wechsler W., de Tribolet N.: Binding specificity of two monoclonal antiglioma antibodies: immunocytochemical studies using a new tissue embedding technique. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1986, 69, 124—131.
9. Levis A. J.: *Mechanismus of neurological disease*. Little Brown, Boston, 1976, pp. 279—280.

10. Makinodan T.: Immunobiology of aging. *J. Am. Geriat. Soc.*, 1976, 24, 249—252.
11. Martin-Achard A., Diserens A. C., De Trobolet N., Carrel S.: Evaluation of the humoral response of glioma patients to a possible common tumor-associated antigen(s). *Int. J. Cancer*, 1980, 25, 219—224.
12. Nandy K.: Neuroimmunology and the aging brain. *Exp. Brain Res.*, Suppl. 5, 1982, 123—127.
13. Noske W., Lentzen H., Herken H.: Phagocytosis and morphological development of rat astrocytes in primary cultures. *Cell Mol. Biol.*, 1982, 28, 235—244.
14. Rabinowitz T.: Strokes, some pathological aspects. In: *Advances in Neurology. Cerebrovascular Disorders and Stroke*. Eds: M. Goldstein, L. Bolis, C. Fieschi, S. Gorini. Raven Press, New York 1979, 25, 65—93.
15. Redei A., Biro J, Kun Z.: Alterations of two parameters of cellular immunity in the aged men. *Gerontol.*, 1979, 9, 477—479.
16. Sörnäs R., Östlund H., Müller R.: Cerebrospinal fluid cytology after stroke. *Arch. Neurol.*, 1972, 26, 489—501.
17. Woodrooffe M. N., Bellamy A. S., Feldman M., Davison A. N., Curner M. L.: Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J. Neurol. Sci.*, 1986, 74, 135—152.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 1A Banacha Str., 02-097 Warsaw.

MIECZYŚLAW WENDER, ANTONI GODLEWSKI, JÓZEF SZCZECH

OLIGODENDROGLIA OF THE AGEING HUMAN BRAIN.
KARYOMETRIC AND CYTOPHOTOMETRIC STUDIES

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań, Poland

Senile alterations of the myelin-oligodendroglia complex have not been frequently studied. In microscopical studies of the ageing human and dog brains changes in the myelin sheaths stainability and, more rarely, some demyelination were noticed by Iwanowski and Ostenda (1974), Tarnowska-Dziduszko (1973) and Taraszewska et al. (1971). Ultrastructural investigation of ageing myelin demonstrated disintegration of the intraperiod line, formation of loops, vesicles and irregular multivesicular structures (Iwanowski 1984).

In our studies of the myelin lipid pattern of the ageing brain we have found three main types of alterations: increased content of lysophosphatidylcholine, rise of cholesterol esters level as well as relative increase in total phospholipid content (Wender et al. 1987b). Samorajski and Ordy (1972) emphasized a relative increase in the proportion of monoenoic fatty acids (18:1 and 20:1) and a decrease in the proportion of polyunsaturated fatty acids (20:4, 22:4 and 22:6) in phosphatidyl ethanolamine and glycerophospholipids of the myelin, isolated from aged human brain as compared with the myelin of the younger age groups. More pronounced changes in the white matter were described in cases of senile Alzheimer dementia (England, Brun 1986). The authors noticed a significant decline in cerebroside and sulfatide contents in the white matter as well as a reduction of the oligodendroglia number. The relation between the changes in the oligodendroglia and those seen in myelin sheaths is unknown.

Extending our research program concerning alterations of the cerebral white matter in the course of the ageing process, we have performed karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia on human autoptic material.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on the autoptic material of 12 patients, deceased at the age of 74 to 86 years (mean age 79.6 years). The autopsies were performed 6 to 16 hours after death. The results were compared with those obtained for the autoptic material of 5 patients aged 28 to 44 years (mean age 33.6 years), who died of diseases not involving the nervous system. Sections were taken from the cerebral white matter of the frontal lobe as well as from the cerebellar white matter and were submitted to histological, karyometric and cytophotometric studies.

Histological studies. Morphological evaluation was performed on material embedded in paraffin and stained by the following methods: Nissl, Weil, hematoxylin—eosin, Kanzler, van Gieson, and PAS. Frozen sections were silver-impregnated according to Bielschowsky.

Karyometric and cytophotometric studies. Small brain slices were fixed in Baker's solution at room temperature. Paraffin sections, 7 μm in thickness were stained with cresyl violet. Other sections were subjected to the Feulgen reaction for detection of DNA. The acid hydrolysis time of 3.5 h at 37°C was chosen for the Feulgen method with the use of the hydrolysis curve established earlier, according to Krygier-Stojalska (1982).

Morpho- and cytophotometric studies were carried out in monochromatic light, at 560 nm wavelength using the automatic analyser of microscopic images "Morphoquant" (VEB Carl Zeiss Jena, GDR). The following parameters of the cells were measured according to the MOSAIK programme (Voss et al. 1979).

KONL — length of nuclear circumference determined by the number of raster points covering the circumference of the examined structure,

KOFL — cross-section area of cell nucleus expressed by the total number of raster points on and inside the circumference of the examined object,

FOFA — shape index of cell nucleus representing the quotient of the squared circumference to the cross-section area,

DMVH — elongation index determined by the quotient of minimal to maximal diagonals. The extent of elongation is inversely proportional to the value of this index,

FLVH — shape regularity index of cell nucleus determined by the quotient of the cross-section area to the area of the smallest octagon circumscribed on the cross-section of the examined object; it illustrates the extent of folding of the examined object surface,

EXTS — sum of extinctions of all points of the examined object, expressed in working units used in cytophotometry,

KOMP — index determining compactness of nuclear chromatin,

ZNTR — index determining rate of chromatin concentration around centre of the nucleus.

The results of measurements of oligodendrocytes in aged brains were compared with those in control material of adult brains using the Kolmogorov-Smirnov nonparametric test.

The observed changes were considered significant at the level of $p \leq 0.05$.

RESULTS

Table 1 lists the neuropathological findings in the studied material of aged persons (more than 70 years old). According to the morphological characteristics it has been possible to categorize the material into two subgroups: the first in which only vascular changes were noted in the brain (atheromatosis, arteriosclerosis and/or amyloid angiopathy with its ischemic sequelae in the nervous tissue) and the second one showing not only vascular changes, but also degenerative features of senile atrophy. Characteristic signs of the latter, visible in the cerebral and cerebellar cortex, include the presence of senile plaques as well as dystrophy of neurocytes, mainly of pigment type. Some neurocytes exhibit also fibrillary tangles of Alzheimer type. In all studied cases the white matter shows only minor changes such as some perivascular myelin pallor and/or the existence of small scattered shadowed foci in the cerebral and cerebellar white matter.

Morphometric studies. Results of karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia in the cerebral white matter of the frontal lobe are presented in Table 2 and those of the cerebellar white matter in Table 3.

The length of the nuclear circumference (KONL) showed marked changes in the ageing brain when compared with the control material of patients who died in adult age of non-neurological diseases. The most pronounced changes — extensive elongation of the circumference (KONL) and increase of cross-section area (KOFL) of cell nuclei were observed in the brains with vascular changes only. Less pronounced, although also significant, proved the deviations, when the whole group of aged brains, or the subgroup with vascular and senile atrophy were compared with the control material.

Deviations in the index of nuclear shape (FOFA), in the form of its decrease and in DMVH values (elongation index) indicating spheric transformation of cell nuclei, were almost identical in both subgroups of ageing brains (the subgroup with vascular changes only as compared with the subgroup with both vascular and senile changes). The index of shape regularity (FLVH) was unchanged in the ageing brains.

Results of cytophotometric estimation of relative DNA content in

Table 1. Neuropathological characteristics of the studied material

Tabela 1. Charakterystyka neuropatologiczna badanego materiału

Age Wiek	Sex Płeć	Diagnosis Rozpoznanie
Subgroup I Podgrupa I		
Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami naczyniowymi		
74	Female Kobieta	Cerebral atheromatosis. Encephalomalacia. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu.
85	Male Mężczyzna	Arteriosclerosis. Haemorrhagia subarachnoidealis. Stwardnienie tętnic. Krwotok podpajęczynówkowy.
86	Male Mężczyzna	Arteriosclerosis. Haemorrhagia cerebro-subarachnoidealis. Stwardnienie tętnic. Krwotok mózgowo-podpajęczynówkowy.
78	Female Kobieta	Cerebral atheromatosis. Encephalomalacia. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu.
84	Female Kobieta	Cerebral atheromatosis. Encephalomalacia. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu.
84	Female Kobieta	Cerebral atheromatosis. Encephalomalacia. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu.
Subgroup II Podgrupa II		
Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi		
74	Female Kobieta	Cerebral atheromatosis. Encephalomalacia. Senile degeneration. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu. Zwyrrodnienie starcze.
85	Male Mężczyzna	Arteriosclerosis. Haemorrhagia cerebro-subarachnoidealis. Senile degeneration. Stwardnienie tętnic. Krwotek mózgowo-podpajęczynówkowy. Zwyrrodnienie starcze.
86	Male Mężczyzna	Arteriosclerosis. Haemorrhagia cerebro-subarachnoidealis. Senile degeneration. Stwardnienie tętnic. Krwotok mózgowo-podpajęczynówkowy. Zwyrrodnienie starcze.
78	Female Kobieta	Atheromatosis. Encephalomalacia. Senile degeneration. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu. Zwyrrodnienie starcze.
84	Female Kobieta	Atheromatosis. Encephalomalacia. Senile degeneration. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu. Zwyrrodnienie starcze.
84	Female Kobieta	Atheromatosis. Encephalomalacia. Senile degeneration. Miażdżycza mózgu. Rozmiękanie mózgu. Zwyrrodnienie starcze.

oligodendroglial nuclei showed several deviations. An increase in the sum of extinctions at all points over an examined cell nucleus (EXTS) was disclosed in the ageing brains, with most pronounced changes seen in the subgroup of vascular changes only. In the latter subgroup a marked decrease in KOMP value was found indicating some loosening of the chromatin structure. The ZNTR index was slightly increased only in the subgroup of ageing brains with both vascular and senile changes, indicating a shift of chromatin granules to the cell nucleus center.

Table 2. Results of karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia in the cerebral white matter (frontal lobe) of the ageing brain

Tabela 2. Wyniki badań kariometrycznych i cytofotometrycznych oligodendrogleju istoty białej (płat czołowy) starzejącego się mózgu

Group Grupa	Value Wartości	KONL	KOFL	FOFA	DMVH	FLVH	EXTS	KOMP	ZNTR*
Control material (5 cases)	$\bar{x} \pm SD$	83±3.5	229±18.3	154±2.5	82±1.2	87±0.5	74±13.9	84±4.3	64±0.5
Materiał kontrolny (5 przypadków)	min.	64	143	132	53	85	38	45	35
	max.	116	383	180	100	95	154	78	100
Ageing brains total (12 cases)	$\bar{x} \pm SD$	88±7.3	264±41.1	150±3.6	85±1.9	88±0.5	91±15.6	82±5.3	65±2.4
Starzejący się mózg ogółem (12 przypadków)	min.	63	138	129	55	85	37	52	43
	max.	122	455	180	100	95	179	83	100
Brains with vascular changes only (6 cases)	$\bar{x} \pm SD$	91±8.4	280±48.1	151±2.8	85±0.9	88±0.4	95±17.5	80±5.6	65±2.8
	min.	63	144	129	56	85	37	51	42
Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi (6 przypadków)	max.	123	455	180	100	95	179	83	100
	$p <$	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Brains with vascular changes and senile atrophy (6 cases)	$\bar{x} \pm SD$	85±4.6	248±23.8	149±4.2	85±2.4	88±0.6	87±11.9	85±4.3	66±1.7
	min.	64	138	128	55	85	38	51	43
Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi (6 przypadków)	max.	117	395	188	100	94	139	82	100
	$p <$	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	ns

* Abbreviations in text

* Objaśnienia w tekście

Table 3. Results of karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia in the cerebellar white matter of the ageing brain
 Tabela 3. Wyniki badań kariometrycznych i cytofotometrycznych oligodendrogleju istoty białej mózgdzku w starzejącym się mózgowiu

Group Grupa	Value Wartości	KONL	KOFL	FOFA	DMVH	FLVH	EXTS	KOMP	ZNTR*
Control material (5 cases) Materiał kontrolny (5 przypadków)	$\bar{x} \pm SD$ min. max.	87 ± 5.7 59 118	242 ± 35.4 126 438	157 ± 3.8 132 180	83 ± 2.0 50 100	87 ± 0.6 85 94	67 ± 20.6 18 112	81 ± 5.5 48 80	65 ± 2.3 22 100
Ageing brains total (12 cases) Starzejący się mózg ogółem (12 przypadków)	$\bar{x} \pm SD$ min. max. p <	90 ± 6.7 63 132 0.01	272 ± 37.2 146 498 0.01	150 ± 4.2 129 180 0.01	86 ± 1.7 53 180 0.01	88 ± 0.5 85 95 0.01	89 ± 17.0 36 176 0.01	80 ± 8.1 48 81 0.01	65 ± 2.7 36 100 ns
Brains with vascular changes only (6 cases) Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi (6 przypadków)	$\bar{x} \pm SD$ min. max. p <	88 ± 6.3 63 118 0.01	267 ± 39.4 146 451 0.01	148 ± 2.8 129 180 0.01	85 ± 1.9 57 180 0.01	88 ± 0.5 85 95 0.01	90 ± 16.1 48 176 0.01	83 ± 7.1 48 81 0.01	64 ± 1.8 41 100 0.01
Brains with vascular changes and senile atrophy (6 cases) Przypadki ze zmianami na- czyniowymi i starczymi (6 przypadków)	$\bar{x} \pm SD$ min. max. p <	91 ± 6.9 64 132 0.01	278 ± 34.4 149 498 0.01	151 ± 5.0 130 180 0.01	86 ± 0.9 53 100 0.01	88 ± 0.5 85 95 0.01	88 ± 17.8 36 153 0.01	77 ± 8.2 49 81 0.01	65 ± 3.2 36 100 0.01

* Abbreviations in text

* Objaśnienia w tekście

Table 4. Cell nuclei of oligodendroglia in the cerebral white matter (frontal lobe) of the ageing brain categorized into classes according to value of KOFL (cross-section of area of cell nucleus)

Tabela 4. Jądra komórek oligodendrogleju istoty białej (płat czołowy) starzejącego się mózgu podzielone na klasy stosownie do wartości KOFL (przekrój poprzeczny pola jądra komórkowego)

Classes Klasy	Individual nuclei Poszczególne jądra					
	Absolute number Liczby bezwzględne			%		
	Control Grupa kontrolna	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi	Control Grupa kontrolna	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi
0— 136	0	0	0	0	0	0
137— 154	18	8	9	12	4	5
155— 172	47	29	39	31	16	21
173— 190	139	85	99	92	47	55
191— 208	258	117	162	172	65	90
209— 226	283	157	191	188	87	106
227— 244	254	183	228	169	101	126
245— 262	230	176	212	153	97	117
263— 280	135	202	222	90	112	123
281— 298	73	173	168	48	96	93
299— 316	38	150	125	25	83	69
317— 334	14	137	110	9	76	61
335— 352	5	124	93	3	68	51
353— 370	3	88	55	2	48	30
371— 388	3	75	47	2	41	26
389— 406	0	54	25	0	30	13
407— 424	0	29	9	0	16	5
425— 442	0	8	4	0	4	2
443— 460	0	5	2	0	2	1
461— 478	0	0	0	0	0	0
479— 496	0	0	0	0	0	0
497— 514	0	0	0	0	0	0
515— 532	0	0	0	0	0	0
533— 550	0	0	0	0	0	0
551— 568	0	0	0	0	0	0
569— 586	0	0	0	0	0	0
587—2047	0	0	0	0	0	0

Table 5. Cell nuclei of oligodendroglia in the cerebral white matter of the ageing brain categorized into classes according to value of EXTS (sum of extinctions of all points of the examined object, expressed in working units used in cytophotometry)

Tabela 5. Jądra komórek oligodendrogleju istoty białej starzejącego się mózgu podzielone na klasy stosownie do wartości EXTS (suma ekstynkcji wszystkich punktów badanego obiektu, wyrażona w jednostkach roboczych używanych w cytofotometrii)

Classes Klasy	Individual nuclei Poszczególne jądra					
	Absolute number Liczby bezwzględne			%		
	Control Grupa kontrolna	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi	Control Grupa kontrolna	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami tylko naczyniowymi	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi
0— 28	0	0	0	0	0	0
29— 34	1	0	0	0	0	0
35— 40	3	1	2	0.2	0	0.1
41— 46	15	0	14	1.0	0	0.7
47— 52	91	10	9	6.0	0.5	0.6
53— 58	191	11	22	12.7	0.6	1.2
59— 64	127	60	70	8.4	3.3	3.8
65— 70	219	101	146	14.6	5.6	8.1
71— 76	212	165	212	14.1	9.1	11.7
77— 82	155	204	273	10.3	11.3	15.1
83— 88	158	231	235	10.5	12.8	13.0
89— 94	100	148	280	6.6	8.2	15.5
95— 100	102	101	249	6.8	5.6	13.8
101— 106	73	116	95	4.8	6.4	5.2
107— 112	39	142	61	2.6	7.8	3.3
113— 118	8	208	49	0.5	11.5	2.7
119— 124	2	162	40	0.1	9.0	2.2
125— 130	2	99	30	0.1	5.5	1.6
131— 136	0	36	10	0	2.0	0.5
137— 142	1	3	3	0	0.1	0.1
143— 148	0	0	0	0	0	0
149— 154	1	0	0	0	0	0
155— 160	0	0	0	0	0	0
161— 166	0	1	0	0	0	0
167— 172	0	0	0	0	0	0
173— 178	0	0	0	0	0	0
179—2047	0	1	0	0	0	0

The briefly presented deviations in mean values of karyometric and cytophotometric estimations, resulted also in absolute and relative alterations in the categorisation of individual cells to distinct size classes. Two examples of these shifts may be seen in Tables 4 and 5.

DISCUSSION

In the studies presented heretofore we have established karyometric and cytophotometric changes of oligodendroglia nuclei in the ageing brain: enlargement of the cell nucleus, its spheric transformation, as well as an increase in relative DNA extinction values concomitant with some loosening of the chromatine structure. Explanation of these findings, especially concerning the results of cytophotometric estimations is very difficult.

The first point which should be raised is the marked preponderance of deviations in the subgroup exhibiting only vascular changes. It must mean, firstly, that, in the pathomechanism of oligodendroglia alterations in the ageing brain, the vascular factor plays a decisive role and, secondly, that the vasogenic and senile changes exert reciprocal effects on the oligodendroglia. This leads to the situation that deviations are markedly smaller in brains affected by both pathological processes together.

A possible role of the vasogenic factor in the mechanism of white matter changes in senility may be deduced from many investigations. In our studies of myelin lipids in the ageing brain (Wender et al. 1987b) we found a striking similarity of the detected alterations with the effect of hypoxia on myelin lipids of the rat: both include lesions of the molecular myelin structure without clear cut demyelination. Iwanowski and Ostenda (1974) and Iwanowski (1984), considering morphological observations indicating an increased permeability of vessel walls due to degenerative changes in ageing brain, have also advocated the view that vascular alterations are the primary factor leading to axon damage and subsequently, to myelin lesion.

Multiple experimental data indicate that oligodendroglia cells are very sensitive to the action of hypoxia (Korthals et al. 1973; Hoppe 1974). In tissue culture studies, Mossakowski and Gajkowska (1976) observed alterations in mitochondria as the predominating changes in the oligodendroglia under the effect of cyanide, contrasting with a relatively good preservation of these structures in astroglia. Similar results have been obtained in studies of the effect of sodium cyanate on glia in tissue culture (Mossakowski 1978). The main conclusion of the author points to cell swelling and vesicular degeneration as basic oligodendroglia lesions, probably indicating disturbances in cell membrane permeability.

In our studies of the oligodendroglia in the corpus callosum of rats after acute and moderate hypoxia (Wender et al. 1987a) we have observed enlargement of cell nuclei in the early period after hypoxia and some nuclear shrinkage in the later period. Cytophotometric analysis of the relative DNA content in cell nuclei of oligodendroglia has demonstrated an increased extinction of DNA in the early period and a decreased extinction in the late period after acute or moderate hypoxia.

An additional discussion seems necessary concerning the observation that in the aged brain an increase occurs in the sum of extinction at all points of the examined cell nucleus in cytophotometric estimations of relative DNA content in oligodendroglia together with some loosening of chromatin structure. We cannot definitely explain these findings and may suggest only that the obtained results reflect changes in DNA configuration in the oligodendroglia nuclei of an ageing brain, associated with some shift between the metabolically more active, loose and less active, heterochromatic, DNA fractions.

CONCLUSIONS

1. The length of the nuclear circumference is longer and cross-section area larger in the oligodendroglia of the ageing brain as compared with those established for adult age.
2. The oligodendroglial cell nuclei in the ageing brain show a tendency to spheric transformation.
3. In the ageing brain, oligodendroglial cell nuclei show an increase in the sum of extinction and some loosening of chromatin structure in cytophotometric estimations of relative DNA content.
4. The karyo- and cytophotometric changes of the oligodendroglial nuclei are more pronounced in the ageing brains exhibiting only vascular changes than in those with both vasogenic and senile alterations.
5. The vasogenic factor plays a decisive role in the pathomechanism of oligodendroglial alterations in the ageing brain.

OLIGODENDROGLEJ W STARZEJĄCYM SIĘ MÓZGU CZŁOWIEKA. BADANIA KARIOMETRYCZNE I CYTOFOTOMETRYCZNE

Streszczenie

Przeprowadzono badania 12 mózgów chorych zmarłych w wieku powyżej 70 roku życia. Wyniki porównano z materiałem autopsyjnym 5 chorych w wieku dojrzałym zmarłych z powodu chorób nieneurologicznych.

Badania kariometryczne i cytofotometryczne jąder oligodendrogleju przeprowadzono na aparacie „Morphoquant” według programu MOSAIK.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Długość obwodu jądra jest dłuższa, a pole powierzchni większe w oligodendrogleju mózgu starczego w porównaniu ze stwierdzanym w wieku dojrzałym.
2. W mózgu starczym jądra oligodendrogleju wykazują tendencję do transformacji sferycznej.
3. W badaniach cytofotometrycznych względnej zawartości DNA jądra oligodendrogleju w mózgu starczym charakteryzują się wzrostem sumy ekstynkcji i pewnym rozluźnieniem struktury chromatyny.
4. Zmiany kario- i cytofotometryczne jąder oligodendrogleju są bardziej zaznaczone w mózgach starczych, w których obrazie histologicznym stwierdza się tylko zmiany naczyniowe niż w tych, w których występują łącznie zmiany naczyniopochodne i zwyrodnienie starcze.
5. Czynniki naczyniowy odgrywa decydującą rolę w patomechanizmie zmian oligodendrogleju w starzejącym się mózgu.

ОЛИГОДЕНДРОГЛИЯ В СТАРЕЮЩИМ СЯ МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА. КАРИОМЕТРИЧЕСКИЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

Проведены исследования 12 мозгов больных умерших в возрасте выше 70 лет. Результаты были сравнены с секционным материалом 5 больных в зрелом возрасте, умерших вследствие неврологических болезней.

Кариометрические и цитوفотометрические исследования были проведены аппаратом „Morphoquant” по программе Mosaik.

Результаты исследования привели к следующим выводам:

1. Длина окружности ядра длиннее, а его площадь больше в олигодендроглии старческого мозга по сравнению с обнаруженными в мозгу зрелого возраста.
2. В старческом мозгу ядра олигодендроглии имеют тенденцию к сферической трансформации.
3. В цитوفотометрических исследованиях относительного содержания ДНА, ядра олигодендроглии старческого мозга проявляют увеличение суммы экстинкции и некоторое разрежение структуры хроматина.
4. Карио- и цитوفотометрические изменения ядер олигодендроглии более выразительные в старческих мозгах, в гистологической картине которых обнаружены только сосудистые изменения, чем в мозгах, в которых сосудистые изменения выступают наряду со старческой дегенерацией.
5. Сосудистый фактор играет решающую роль в патомеханизме изменений олигодендроглии старческого мозга.

REFERENCES

1. England E., Brun A.: The white matter changes in senile dementia of Alzheimer type: Neuropathological and biochemical correlates. X Intern. Congr. Neuropathol. Abstracts, Stockholm 1986, 291.
2. Hoppe B.: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego *in vitro* poddanego działaniu tlenku węgla. Neuropat. Pol., 1974, 12, 371—384.
3. Iwanowski L., Ostenda M.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old age. Alternsveränderungen des zentralen Nervensystems. Material der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR. Mülhausen (Thür.), 1974, 121—122.

4. Iwanowski L.: Myelin in the senile rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 219—223.
5. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Electron microscopic studies on the toxic effect of carbon monoxide on the glial tissue cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 315—322.
6. Krygier-Stojalowska A.: Principle of cytophotometry. In: *Topochemical methods in cell and tissue studies*. PWN, Warszawa, 1982, 114—134.
7. Mossakowski M. J.: Morphology and histochemistry of glia alterations evoked by sodium cyanate in tissue culture. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 53—63.
8. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Electron microscopic picture of glial lesions induced with cyanide in tissue culture. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 441—449.
9. Samorajski T., Ordy J.: *Neurochemistry of ageing*. Ed. Ch. Gaiti. Plenum Press, New York, London, 1972, pp. 41—63.
10. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w procesie starzenia się. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 199—208.
11. Taraszewska A., Lewicka-Wysocka H., Nozdryn-Piotnicki B.: Analiza neuropatologiczna zmian u psów starczych z nowotworami narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 219—230.
12. Voss K., Neumann E., Witsack W.: „Universelles Programmsystem” für den automatischen Mikroskopbildanalysator Morphoquant. *Jenauer Rundsch.*, 1979, 24, 167—169.
13. Wender M., Szczech J., Godlewski A., Grochowalska A.: Karyometric and cytophotometric studies of the oligodendroglia in the corpus callosum of rats after hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1987a (in press).
14. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz L., Stanisławska J., Szczech, J., Godlewski A.: Pattern of myelin lipids in the aging brain. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 235—245.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 60-355 Poznań, Przybyszewskiego 49, Poland.

JÓZEF SZCZECH

COMPARATIVE APPRAISAL OF OLIGODENDROGLIA
IN VARIOUS BRAIN STRUCTURES IN RATS EXPOSED
TO HYPOXIA
KARYOMETRIC AND CYTOPHOTOMETRIC STUDIES

Laboratory of Neuropathology, Department of Neurology, School of Medicine,
Poznań, Poland

Hypoxia, representing a process seriously injuring nervous tissue, has provided a subject for numerous morphological and neurochemical studies within the scopes of both experimental pathology (Albrecht, Śmiałek 1975; Mossakowski 1978) and casuistics (Ingvar, Brun 1972). Glia injury and associated with it changes in the white matter, mainly in myelin sheaths, represent some of the morphological exponents of injuries induced, together with the better recognized neuronal alterations (Koenig, Koenig 1952) by anoxia. Interrelations between injuries in oligodendroglia and in myelin which take place in hypoxia have been studied using numerous experimental models (Kraśnicka, Renkawek 1972; Mossakowski, Gajkowska 1976; Wender et al. 1978). The topographically variable response of nervous tissue to the action of noxious agents, indicated by morphological (Gilles 1963), neurochemical (Friede 1966) and neurohistochemical results (Hassler 1964), prompted us to undertake studies on lesions induced by hypoxia in various brain structures with an attempt to evaluate selectively the sensitivity of some white matter regions to hypoxia.

MATERIAL AND METHODS

Studies on the effect of hypoxia on oligodendroglia of brain white matter structures were conducted on 63 adult rats of Wistar strain, weighing each 200 to 250 g. The animals were exposed to hypoxia in a chamber of 79.2 l. capacity, in two experimental groups. Moderate hypoxia was induced by flushing the chamber with a gas mixture containing 7% O₂, 92.9% N₂ and 0.1% CO₂ for 30 min and acute hypoxia —

with a gas mixture containing 2% O₂, 97.9% N₂ and 0.1% CO₂ for 3 min. During exposure, abnormalities in animal behaviour were registered, in the form of motor excitation, followed by slowed down movements, akinesia and, finally, flaccidity and disturbed respiratory rhythm. Changes in blood following the hypoxia were evaluated gasometrically, using BKS-2 apparatus (Radiometer).

The control group consisted of 7 rats, kept in standard laboratory conditions.

Animals of both experimental groups were sacrificed in light ether anesthesia 4 and 24 h, and 14 and 60 days after hypoxia. The brains were taken for studies and fixed in Baker's fluid, embedded in paraffin. Sections 7 μm thick were stained according to hematoxylin and eosin, Nissl and Weil techniques or subjected to Feulgen reaction (Krygier-Stojałowska 1982). The sections served for karyometric and cytophotometric studies. The measurements were performed on cell nuclei of oligodendroglia in corpus callosum, fimbria hippocampi and in fornix columns. Measurements were performed in monochromatic light of 560 nm wavelength, using a Morphoquant microscope (VEB Carl Zeiss, Jena), coupled to a KSR 4100 computer and MOSAIK computer program (Voss et al. 1979). The following parameters of oligodendroglial cell nuclei were estimated.

1. Size indices:

KONL* — length of cell nucleus cross-section contour expressed by the number of raster points positioned over the contour,

KOFL — area of cell nucleus cross-section expressed by the number of measuring raster points positioned over the cross-section,

2. Shape indices:

FOFA — ratio of KONL square to KOFL, reflecting elongation of cell nucleus and regularity of cell nucleus contour,

DMVH — ratio of diagonals in the smallest octagon circumscribed on the cell nucleus, reflecting its elongation,

FLVH — ratio of the area of cell nucleus cross-section to the area of the smallest octagon circumscribed on the cell nucleus, reflecting the regularity of the cross-section shape and degree of folding of its outline,

3. Extinction indices:

KOMP — index reflecting compactness of nuclear chromatin,

ZNTR — index reflecting concentration of nuclear chromatin around cell nucleus center.

Each index and coefficient, based on measurements made in 300 cells within any experimental groups and any white matter structures, was compared with the respective index or coefficient in the control group.

* Letter designations of the indices originate from MOSAIK program (Voss et al. 1979).

Statistical appraisal of karyometric and cytophotometric alterations after hypoxia was conducted using Snedecor's statistics F and trifactorial analysis of variance (Greń 1962; Oktaba 1966). The calculations were performed using a MERA 400 computer. The mean ratio of a studied trait value in an experimental group to that in the control group (Q) provided grounds for plotting curves of trait variability as dependent upon degree of hypoxia and upon time, elapsed after hypoxia. Changes were regarded significant at the probability level of $p \leq 0.05$.

RESULTS

Histopathological studies

Hypoxia caused morphological alterations in the rat brain, in the form of hyperemia, with occasional erythrorrhages, widening of vascular lumen in the choroid plexus and swelling of epithelial cells in the plexus (Fig. 1). Numerous neurocytes were affected, principally within

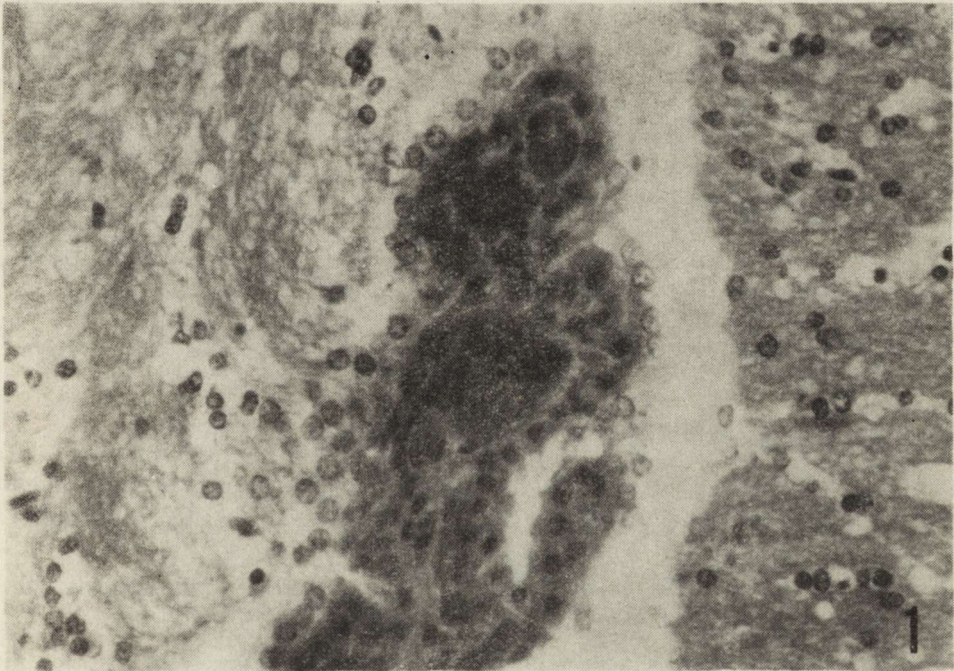


Fig. 1. Choroid plexus, corpus callosum and fimbria hippocampi 4 hrs after acute hypoxia. Hyperemia and swelling of epithelial cells in the choroid plexus. Oligodendroglial nuclei in the white matter structures with a normal appearance. Corpus callosum on the left. H—E. $\times 500$

Ryc. 1. Splot naczyniówkowy, spoidło wielkie i strzępek hipokampa 4 godziny po ostrym niedotlenieniu. Zastój krwi i obrzmienie nabłonka w splocie naczyniówkowym. Oligodendroglej istoty białej o zwykłym wyglądzie. Spoidło wielkie po lewej stronie. H—E. Pow. 500 \times

brain cortex, developing chronic ischemic sequelae and exhibiting vacuoles. The injuries were more evident in the group subjected to acute hypoxia. Beginning with the 14th day after hypoxia, the vascular changes began to disappear (Fig. 2) but high numbers of injured neurocytes were still present. No microscopic alterations were observed in oligodendroglia or in myelin of the studied brain structures.

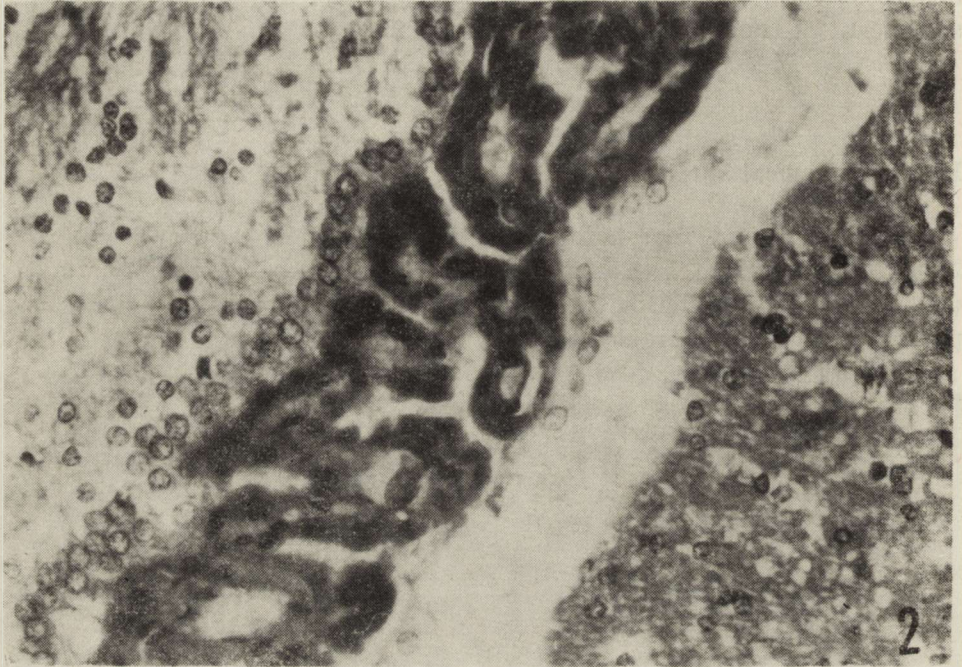


Fig. 2. Normal pattern of choroid plexus, corpus callosum and fimbria hippocampi 60 days after acute hypoxia. Corpus callosum on the left. H—E. $\times 500$

Ryc. 2. Splot naczyniówkowy, spoidło wielkie i strzępek hipokampa 60 dni po ostrym niedotlenieniu. Prawidłowy obraz histologiczny. H—E. Pow. 500 \times

Karyometric and cytophotometric studies

Mean values, standard deviations of indices and corresponding values of quotient Q in trifactorial analysis of variance are listed in Tables 1 to 7.

Alteration dynamics for some morphometric and cytophotometric indices following hypoxia is presented in Figures 3 to 5.

Estimation of cell nuclei size coefficients in oligodendroglia (Tables 1 and 2, Fig. 3)

Following moderate hypoxia (7% O_2 in respiratory mixture), the cell nucleus outline (KONL) and cell nucleus cross-section area were significantly augmented in the oligodendroglia in corpus callosum and in for-

Table 1. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei contour length (KONL) after hypoxia

Tabela 1. Trójczynnikowa analiza wariancji zmian długości obwodu jąder oligodendrogleju (KONL) po niedotlenieniu

Region Okolica	Control Grupa kontrolna $\bar{x} \pm SD$	% O ₂	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	85 ± 9	7%	90 ± 9	1.0512	91 ± 9	1.0702	85 ± 7	0.9989	78 ± 8	0.9120
		2%	96 ± 7	1.1279	104 ± 8	1.2206	76 ± 8	0.8963	78 ± 5	0.9242
spoidło wielkie										
fimbria	92 ± 8	7%	84 ± 9	0.9127	88 ± 6	0.9570	87 ± 6	0.9372	76 ± 6	0.8208
hippocampi		2%	96 ± 8	1.0384	99 ± 7	1.0740	75 ± 7	0.8109	78 ± 7	0.8385
strzepek hipokampa										
columnae	84 ± 10	7%	86 ± 7	1.0711	93 ± 7	1.1557	86 ± 10	1.0689	73 ± 6	0.9022
fornicis		2%	91 ± 10	1.1198	100 ± 10	1.2411	68 ± 7	0.8449	73 ± 8	0.9068
kolumny sklepienia										

$$F_{0.01} = 2.80$$

$$F_{\text{calc.}} = 15.56$$

$$NIR_{0.05} = 0.0149$$

$$p_{0.05} \quad 0.9851 > Q > 1.0149$$

Explanation: $\bar{x} \pm SD$ = arithmetical mean and standard deviation for numerical value of measurements

średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe wartości liczbowych pomiarów

$F_{0.01}$ = table value of Snedecor F test at the statistical significance level 0.01 tabelaryczna wartość testu F Snedecora dla poziomu istotności statystycznej 0,01

$F_{\text{calc.}}$ = the calculated value of Snedecor F test as quotient of mean square of experimental factors (region, % of oxygen and time) to mean square of error

obliczona wartość testu F Snedecora jako iloraz średniego kwadratu czynników doświadczalnych (okolica, % tlenu i czas) do średniego kwadratu błęd

$NIR_{0.05}$ = minimal significant difference at the statistical significance level 0.05 najmniejsza istotna różnica na poziomie istotności statystycznej 0,05

Q = mean ratio of investigated parameter values in experimental and control groups. Q in control group is 1.0000

średni stosunek badanej cechy grupy doświadczalnej do grupy kontrolnej. Q w grupie kontrolnej równa się 1,0000

$p_{0.05}$ = the value of Q quotient for the changes at statistical significance level $p < 0.05$

wartość ilorazu Q dla zmian na poziomie istotności statystycznej $p < 0,05$

nix columns. The changes persisted till the 14th day after hypoxia. On the 60th day after hypoxia the values of the studied coefficients decreased below those obtained in control rats. Cell nuclei of oligodendroglia in fimbria hippocampi showed a distinct reaction to the lowered oxygen content in the respiratory mixture. For the whole period of observation the cross-section area of the cell nuclei was lower than that in the control rats.

Table 2. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei cross-section area (KOFL) after hypoxia

Tabela 2. Trójczynnikiowa analiza wariancji zmian pola przekroju poprzecznego jąder oligodendrogleju (KOFL) po niedotlenieniu

Region Okolica	Control Grupa kontrolna $\bar{x} \pm SD$	% O ₂	Time Czas							
			4h		24h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	245±40	7%	282±44	1.1450	283±47	1.1577	282±35	1.1533	208±36	0.8511
spoidło wielkie		2%	296±30	1.2058	342±39	1.3956	182±32	0.7470	223±26	0.9120
fimbria hippocampi	273±38	7%	248±41	0.9104	274±33	1.0032	261±32	0.9534	200±24	0.7298
strzępek hipokampa		2%	292±37	1.0692	301±36	1.1050	190±27	0.6950	211±30	0.7701
columnae fornicis	243±35	7%	248±32	1.0229	267±40	1.1022	242±31	0.9974	199±23	0.8169
kolumny sklepienia		2%	256±30	1.0560	297±46	1.2271	154±28	0.6385	186±29	0.7684

$$F_{0.01} = 2.80$$

$$F_{calc.} = 34.53$$

$$NIR_{0.05} = 0.0221$$

$$p_{0.05} \quad 0.9779 > Q > 1.0221$$

Explanations: see Table 1

Objaśnienia jak do Tabeli 1

An acute hypoxia-induced marked increase of the cell nuclei cross-section area in the oligodendroglia was observed in all studied brain structures. This was more pronounced in the 24th h of observation and less intense in fimbria hippocampi than in the remaining structures. On days 14 and 60 after hypoxia oligodendroglial cell nuclei clearly decreased in size as compared with those of the control group.

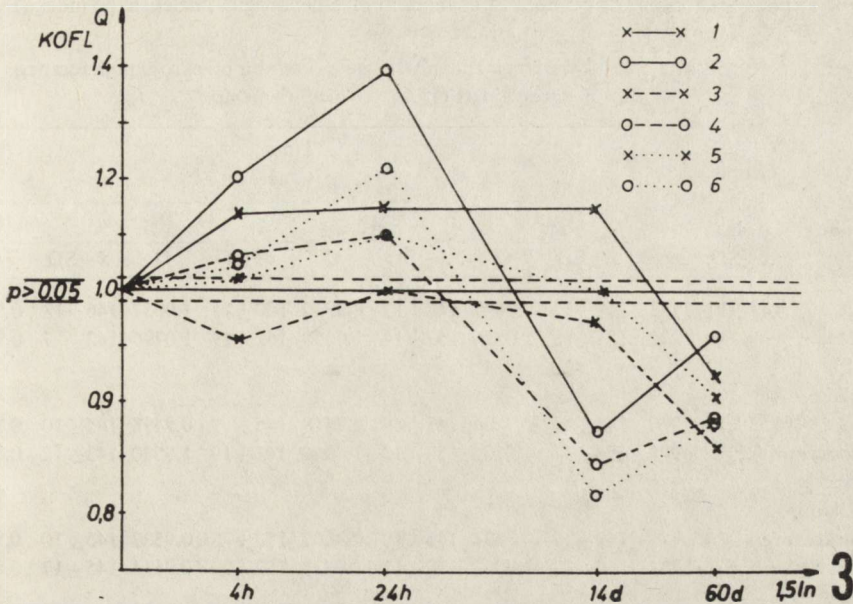


Fig. 3. Q quotient changes in trifactorial analysis of variance of oligodendroglia nuclei cross-section area (KOFL) measurements, in dependence upon time after hypoxia.

1 — value Q of corpus callosum oligodendroglia nuclei, moderate hypoxia,
 2 — value Q of corpus callosum oligodendroglia nuclei, acute hypoxia,
 3 — value Q of fimbria hippocampi oligodendroglia nuclei, moderate hypoxia,
 4 — value Q of fimbria hippocampi oligodendroglia nuclei, acute hypoxia,
 5 — value Q of columnae fornicis oligodendroglia nuclei, moderate hypoxia,
 6 — value Q of columnae fornicis oligodendroglia nuclei, acute hypoxia,
 $p > 0.05$ the field of statistically insignificant Q quotient values

Ryc. 3. Zmiany wartości ilorazu Q trójczynnikowej analizy wariancji pomiarów pola powierzchni przekrojów poprzecznych jąder oligodendrogleju (KOFL), w zależności od czasu po niedotlenieniu.

1 — wartość Q oligodendrogleju spoidła wielkiego mózgu, niedotlenienie umiarkowane,
 2 — wartość Q oligodendrogleju spoidła wielkiego mózgu, niedotlenienie ostre,
 3 — wartość Q oligodendrogleju strzępka hipokampa niedotlenienie umiarkowane,
 4 — wartość Q oligodendrogleju strzępka hipokampa, niedotlenienie ostre,
 5 — wartość Q oligodendrogleju kolumn sklepienia, niedotlenienie umiarkowane,
 6 — wartość Q oligodendrogleju kolumn sklepienia, niedotlenienie ostre
 $p > 0,05$ pole zmian wartości Q nieistotnych statystycznie

Estimation of shape and outline regularity of cell nuclei in oligodendroglia (Tables 3 to 5, Fig. 4)

Following moderate hypoxia, oligodendroglial cell nuclei showed spheric transformation (increased DMVH), increased regularity of cross-section outline (increased FLVH) and lowered ratio of squared circumference to cross-section area (decreased FOFA) as compared with the control group. The alterations were expressed more clearly in oligoden-

Table 3. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei shape index (FOFA) after hypoxia

Tabela 3. Trójczynnikiowa analiza wariancji zmian wskaźnika kształtu przekroju poprzecznego jąder oligodendrogleju (FOFA) po niedotlenieniu

Region Okolice	Control Grupa kontrolna	% O ₂	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	149 ± 11	7%	147 ± 12	0.9847	148 ± 13	0.9930	150 ± 13	1.0057	146 ± 13	0.9786
		2%	157 ± 13	1.0526	159 ± 14	1.0650	162 ± 19	1.0796	142 ± 7	0.9541
spoidło wielkie										
fimbria	152 ± 13	7%	143 ± 13	0.9469	143 ± 9	0.9418	145 ± 9	0.9498	144 ± 10	0.9506
hippocampi		2%	154 ± 11	1.0120	153 ± 12	1.0060	161 ± 19	1.0590	143 ± 12	0.9415
strzępek hipokampa										
columnae fornicis	160 ± 30	7%	141 ± 9	0.8831	146 ± 10	0.9167	153 ± 28	0.9539	145 ± 10	0.9058
		2%	160 ± 27	1.0062	170 ± 17	1.0628	152 ± 20	0.9514	145 ± 17	0.9067
kolumny sklepienia										

$$F_{0.01} = 2.80$$

$$NIR_{0.05} = 0.0154$$

$$F_{calc.} = 33.13$$

$$P_{0.05} = 0.9846 > Q > 1.0154$$

Explanations: see Table 1

Objaśnienia jak do Tabeli 1

Table 4. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei elongation index (DMVH) after hypoxia

Tabela 4. Trójczynnikiowa analiza wariancji zmian wskaźnika wydłużenia kształtu przekroju poprzecznego jąder oligodendrogleju (DMVH) po niedotlenieniu

Region Okolice	Control Grupa kontrolna	% O ₂	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	69 ± 10	7%	75 ± 11	1.0859	74 ± 11	1.0809	71 ± 11	1.0236	73 ± 12	1.0457
		2%	75 ± 10	1.0818	76 ± 10	1.0934	61 ± 13	0.8893	77 ± 10	1.1103
spoidło wielkie										
fimbria	75 ± 9	7%	82 ± 10	1.0872	81 ± 9	1.0760	82 ± 9	1.0914	74 ± 11	0.9767
hippocampi		2%	84 ± 8	1.1206	83 ± 8	1.1097	64 ± 11	0.8566	77 ± 8	1.0302
strzępek hipokampa										
columnae fornicis	85 ± 3	7%	80 ± 10	1.0695	77 ± 10	1.0338	75 ± 10	1.0063	76 ± 10	1.0118
		2%	81 ± 9	1.0894	77 ± 10	1.0322	83 ± 11	0.9809	78 ± 8	1.0448
kolumny sklepienia										

$$F_{0.01} = 2.80$$

$$NIR_{0.05} = 0.0229$$

$$F_{calc.} = 25.98$$

$$P_{0.05} = 0.9771 > Q > 1.0154$$

Explanations: see Table 1

Objaśnienia jak do Tabeli 1

droglial cell nuclei of fimbria hippocampi and of fornix columns than in those of corpus callosum. Beginning on the 14th day after hypoxia, differences in DMVH and FLVH indices observed between experimental and control groups diminished while the value of FOFA index resembled that noted at the 4th hour after hypoxia.

Twenty-four hours after acute hypoxia, spheric transformation of oligodendroglial cell nuclei (increased DMVH value) was noted in all examined structures. In corpus callosum and in fornix columns it was associated with an increase in squared circumference of cell nucleus cross-section related to the area of the cross-section (increased FOFA index). Moreover, in corpus callosum oligodendroglia a decreased value of shape regularity index (FLVH) was observed. In oligodendroglial cell nuclei of fimbria hippocampi, their increasingly spheric character was associated with an increase in the shape regularity index. On the 14th day after hypoxia, oligodendroglial cell nuclei in the studied white matter structures became elongated (DMVH value decreased below the control group level) this being associated with increased FOFA index and a decreased shape regularity index (FLVH) in oligodendroglia of corpus callosum and that of fimbria hippocampi. Shape alterations were definitely less pronounced in oligodendroglia of fornix columns. On the 60th

Table 5. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei shape regularity index (FLVH) after hypoxia

Tabela 5. Trójczynnnikowa analiza wariancji zmian wskaźnika regularności kształtu przekroju poprzecznego jąder oligodendrogleju (FLVH) po niedotlenieniu

Region Okolica	Control Grupa kontrolna $\bar{x} \pm \delta D$	%	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	88 ± 3	7%	89 ± 3	1.0092	89 ± 3	1.0070	89 ± 2	1.0098	88 ± 3	1.0006
spoidło wielkie		2%	87 ± 2	0.9948	87 ± 2	0.9929	85 ± 4	0.9613	89 ± 2	1.0101
fimbria hippocampi	87 ± 2	7%	89 ± 2	1.0289	89 ± 2	1.0316	89 ± 2	1.0292	88 ± 2	1.0201
strzępek hipokampa		2%	88 ± 2	1.0160	88 ± 2	1.0109	84 ± 5	0.9726	88 ± 2	1.0220
columnae fornicis	85 ± 2	7%	89 ± 2	1.0452	89 ± 2	1.0375	88 ± 3	1.0270	88 ± 2	1.0290
kolumny sklepienia		2%	87 ± 3	1.0195	86 ± 3	1.0019	86 ± 4	1.0028	88 ± 4	1.0273

$$F_{0.01} = 2.80$$

$$F_{calc.} = 19.53$$

$$NIR_{0.05} = 0.0055$$

$$P_{0.05} \quad 0.9945 > Q > 1.0055$$

Explanations: see Table 1

Objaśnienia jak do Tabeli 1

day after acute hypoxia, the oligodendroglia of studied structures showed spheric transformation of cell nuclei cross-sections (increased DMVH, lowered FOFA) and increased shape regularity (increased FLVH), as compared with the control group.

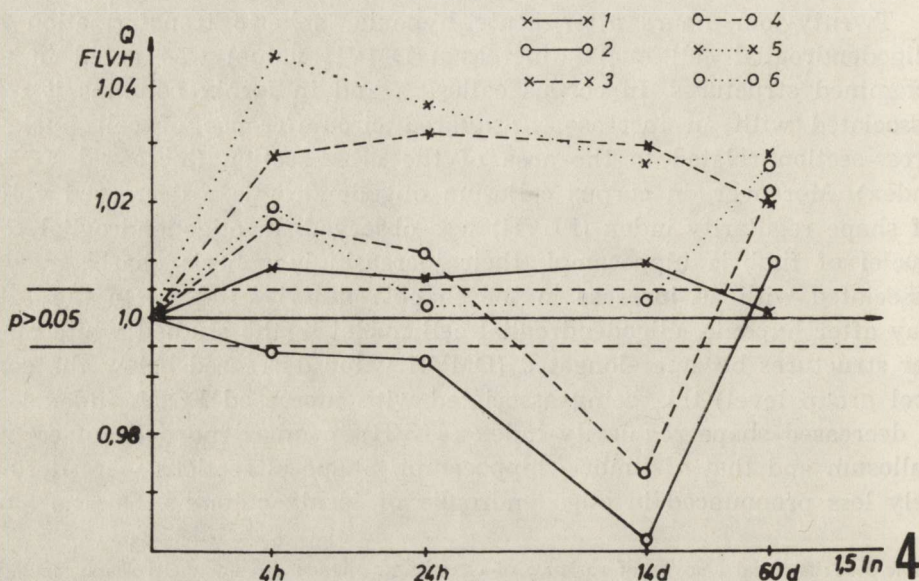


Fig. 4. Q quotient changes of trifactorial analysis of variance of oligodendroglia nuclei cross-section regularity index (FLVH) measurements, in dependence upon time after hypoxia. For explanation: see Fig. 3

Ryc. 4. Zmiany wartości ilorazu Q trójczynnikowej analizy wariancji pomiarów wskaźnika regularności kształtu przekrojów poprzecznych jąder oligodendrogleju (FLVH), w zależności od czasu po niedotlenieniu. Objaśnienia jak do ryc. 3

Estimation of extinction indices of oligodendroglia cell nuclei (Tables 6 and 7, Fig. 5)

The compactness index of nuclear chromatin (KOMP) showed, after moderate hypoxia, a decreased value in oligodendroglial cell nuclei of corpus callosum, this was noticeable till the 14th day of observation. After the 60th day following hypoxia the index did not vary from that noted in the control group. In oligodendroglia of fimbria hippocampi and of fornix columns the values of the index were markedly higher at all periods after hypoxia than the results obtained in the structures of control animals. Changes in the nuclear chromatin compactness index were paralleled by a corresponding decrease or increase in nuclear chromatin concentration (ZNTR). Four and 24 hours after acute hypoxia, a marked decrease in compactness and concentration of nuclear chromatin was observed in oligodendroglia of all examined structures, particularly in corpus callosum. On the 14th and 60th day after acute hypoxia, fimbria hippocampi and fornix columns exhibited greater compactness

Table 6. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei density of chromatin (KOMP) after hypoxia

Tabela 6. Trójczynnikowa analiza wariancji zmian wskaźnika zbitości chromatyny jądrowej jąder oligodendrogleju (KOMP) po niedotlenieniu

Region Okolica	Control Grupa kontrolna $\bar{x} \pm SD$	% O ₂	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	65 ± 3	7%	64 ± 5	0.9797	63 ± 5	0.9672	65 ± 5	0.9928	66 ± 4	1.0068
spoidło wielkie		2%	60 ± 4	0.9217	57 ± 5	0.8833	65 ± 3	0.9993	63 ± 3	0.9627
fimbria hippocampi	62 ± 4	7%	67 ± 5	1.0769	65 ± 5	1.0410	67 ± 5	1.0718	65 ± 3	1.0432
strzepek hipokampa		2%	60 ± 5	0.9661	59 ± 4	0.9520	64 ± 3	1.0307	64 ± 3	1.0299
columnae fornicis	63 ± 4	7%	67 ± 4	1.0687	65 ± 4	1.0320	68 ± 4	1.0896	65 ± 3	1.0453
kolumny sklepienia		2%	59 ± 3	0.9403	59 ± 4	0.9379	65 ± 3	1.0302	64 ± 3	1.0377

$F_{0.01} = 2.80$

$F_{calc.} = 23.67$

$NIR_{0.05} = 0.0107$

$p_{0.05} = 0.9893 > Q > 1.0107$

Explanations: see Table 1
Objaśnienia jak do Tabeli 1

Table 7. Trifactorial analysis of variance of changes in oligodendroglia nuclei concentration of chromatin (ZNTR) after hypoxia

Tabela 7. Trójczynnikowa analiza wariancji zmian wskaźnika koncentracji chromatyny jądrowej jąder oligodendrogleju (ZNTR) po niedotlenieniu

Region Okolica	Control Grupa kontrolna $\bar{x} \pm SD$	% O ₂	Time Czas							
			4 ^h		24 ^h		14 ^d		60 ^d	
			$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q	$\bar{x} \pm SD$	Q
corpus callosum	77 ± 7	7%	72 ± 11	0.9296	68 ± 13	0.8816	66 ± 9	0.8617	78 ± 9	1.0128
spoidło wielkie		2%	63 ± 9	0.8168	61 ± 11	0.7917	85 ± 7	1.1035	70 ± 8	0.9143
fimbria hippocampi	70 ± 9	7%	75 ± 10	1.0584	70 ± 10	0.9923	73 ± 9	1.0303	77 ± 7	1.0866
strzepek hipokampa		2%	66 ± 8	0.9280	63 ± 9	0.9006	85 ± 4	1.2124	78 ± 7	1.1043
columnae fornicis	73 ± 8	7%	80 ± 6	1.0937	76 ± 8	1.0322	75 ± 9	1.0279	80 ± 7	1.0952
kolumny sklepienia		2%	66 ± 7	0.9030	67 ± 8	0.9180	90 ± 5	1.2261	77 ± 8	1.0573

$F_{0.01} = 2.80$

$F_{calc.} = 18.84$

$NIR_{0.05} = 0.0188$

$p_{0.05} = 0.9812 > Q > 1.0188$

Explanations: see Table 1
Objaśnienia jak do Tabeli 1

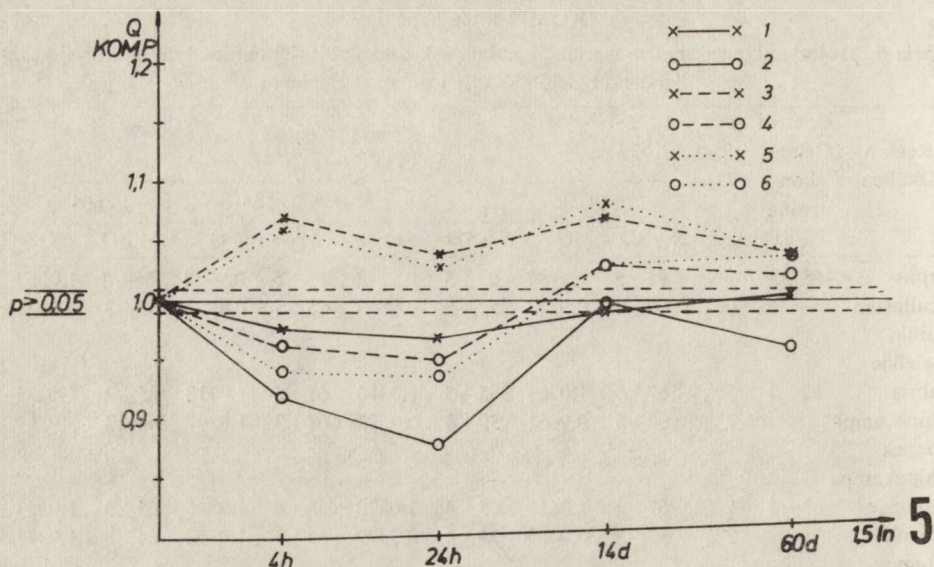


Fig. 5. Q quotient changes of trifactorial analysis of variance of oligodendroglia nuclei chromatin compactness (KOMP) measurements, in dependence upon time after hypoxia. For explanation: see Fig. 3

Ryc. 5. Zmiany wartości ilorazu Q trójczynnikowej analizy wariancji pomiarów wskaźnika zbitości chromatyiny (KOMP) w jądrach oligodendrogleju w zależności od czasu po niedotlenieniu. Objasnienia jak do ryc. 3

and concentration of nuclear chromatin than these observed in the control group. On the other hand, oligodendroglia of corpus callosum showed nuclear chromatin compactness identical to that observed in the control group on the 14th day after hypoxia and a decreased one on the 60th day after hypoxia.

DISCUSSION

It remains a matter of dispute whether oligodendroglia is injured in the course of hypoxia. Brierley (1976), basing on light-microscopical observations, is of the opinion that oligodendroglia injury is insignificant and is restricted to swelling of the cells.

However, histochemical and histoenzymatic observations have provided numerous data on altered enzymatic activity in oligodendroglia in experimental models of hypoxia and in human pathology (Mossakowski 1978; Wender, Kozik 1978). Electron microscopic studies have pointed to injury of intracellular structures such as mitochondria and endoplasmic reticulum (Mossakowski, Gajkowska 1976). The presented appraisal of changes in oligodendroglia cell nuclei after hypoxia is based on compu-

terized measurements made on a large number of cells, what was not possible when using conventional light microscopy. Application of computerized microscopical image analysis has permitted to register a number of alterations dependent upon the degree of hypoxia and the time elapsing after hypoxia.

One day after acute hypoxia a definite increase in size of oligodendroglial cell nuclei took place, being associated with their spheric transformation and elongation of their cross-section circumference. The changes were associated with a decreased density and concentration of nuclear chromatin. The whole pattern of karyometric and cytophotometric changes corresponds to swelling of oligodendroglial cell nuclei. Fourteen days after acute hypoxia, reciprocal alterations were noted in the oligodendroglia of the experimental animals: a decreased circumference of cell nucleus cross-section, decreased area of the cross-section and elongation of cell nuclei, together with an increased compactness and concentration of nuclear chromatin. The pattern may correspond to degenerative lesions in cell nuclei, known in histopathology as pyknotic lesions.

It should be stressed that karyometric and cytophotometric indices tended to return to control values on the 60th day after hypoxia. However, the tendency was expressed unequally in individual structures of the cerebral white matter.

In the presented model of moderate hypoxia, a less pronounced oxygen deficit was counterbalanced by a longer exposure of the animals. As compared with acute hypoxia, karyometric indices showed less pronounced or no swelling of oligodendroglia in fimbria hippocampi, while pyknotic lesions at the later stage were identical to those seen in oligodendroglia of corpus callosum and of fornix columns. When comparing all studied indices, corpus callosum oligodendroglia is, in the experimental group, less susceptible to the effect of hypoxia and the observed morphometric alterations disappear faster than in oligodendroglia of fimbria hippocampi or of fornix columns.

The presented evidence indicates sensitivity of oligodendroglia to oxygen deficit and is consistent with the opinion of Ibrahim et al. (1963) even if the conclusions of these authors stem from a different experimental model. The obtained data do not permit to draw direct conclusions as to a disturbed function of oligodendroglia. However, it may be expected that the observed karyometric and, in particular, cytophotometric changes are connected with serious disturbances in the physiological role of the cells, which, among other things, are responsible for an appropriate structural and functional condition of myelin sheaths. The observed cytophotometric alterations of nuclear chromatin play a particular role of the disturbances, and may provoke sequential distur-

bances in protein and enzyme synthesis. Numerous data have been published on protein (Albrecht, Śmiałek 1975; Zalewska 1975) and enzymatic deviations (Yonezawa et al. 1962) in oligodendroglia following hypoxia.

CONCLUSIONS

1. Hypoxic hypoxia induces in the rat brain morphometric, karyometric and cytophotometric changes, dependent upon the degree of hypoxia and the time elapsing after hypoxia.

2. On the first day after acute hypoxia, oligodendroglial cell nuclei exhibit karyometric traits of swelling, together with a decreased compactness and concentration of nuclear chromatin. Between the 14th and 60th day after hypoxia, oligodendroglial cell nuclei decrease in size while compactness and concentration of their nuclear chromatin increases.

3. Karyometric and cytophotometric alterations after moderate hypoxia are less pronounced than those seen in acute hypoxia.

4. Oligodendroglia in individual white matter structures exhibit differences in susceptibility to the injuring effect of hypoxia.

PORÓWNAWCZA ANALIZA OLIGODENDROGLEJU W RÓŻNYCH STRUKTURACH MÓZGU U SZCZURÓW PODDANYCH NIEDOTLENIENIU BADANIA KARIOMETRYCZNE I CYTOFOTOMETRYCZNE

Streszczenie

Przeprowadzono ocenę wpływu niedotlenienia na komórki gleju skąpowypustkowego w różnych strukturach istoty białej mózgu szczura.

Badania przeprowadzono w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego na 63 szczurach, które przetrzymywano przez 30 min w mieszaninie gazowej zawierającej 7% tlenu, bądź też przez 3 min w atmosferze z 2% zawartością tlenu. Zwierzęta poddawano badaniu po upływie 4 i 24 godz. oraz 14 i 60 dni po niedotlenieniu. Ocenę morfologiczną mózgow przeprowadzono przy użyciu mikroskopii świetlnej. Zmiany w obrazie oligodendrocytów oceniono za pomocą technik kario- i cytofotometrycznych, na skrawkach tkankowych przygotowanych według metody Feulgena, z użyciem sprzężonego z komputerem mikroskopowego analizatora obrazów Morphoquant. Rozmiary, kształt i oznaczenie wskaźnika ekstynkcji DNA oceniono na 300 komórkach oligodendroglajowych u każdego doświadczalnego zwierzęcia, porównując je z grupą 300 oligodendrocytów u każdego szczura kontrolnego na poziomie prawdopodobieństwa $p \leq 0.05$.

Przeprowadzone oznaczenia wykazały, iż w następstwie niedotlenienia dochodzi w oligodendrocytach mózgu szczura do zmian w ich charakterystyce karyometrycznej i cytofotometrycznej, zależnych od stopnia niedotlenienia i badanej struktury ośrodkowego układu nerwowego. Uzyskane wyniki potwierdzają wrażliwość oligodendrocytów na uszkadzające działanie niedotlenienia.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОЛИГОДЕНДОГЛИИ В РАЗЛИЧНЫХ
СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ГИПОКСИИ.
КАРИОМЕТРИЧЕСКИЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

Исследовались результаты гипоксии на олигодендроглию в различных (*corpus callosum*, *fimbria hippocampi*, *columnae fornicis*) структурах мозга крыс.

Исследования были проведены, используя модель гипоксической гипоксии, у 63 крыс подвергнутых 30-минутному действию смеси газов, содержащей 7% кислорода или же 3-минутному действию смеси заключающей 2% кислорода. Животные умерщвляемые 4 и 24 часа, 14 и 60 дней после гипоксии. Изменения в мозгах крыс были расцениваны в световой микроскопии. Изменения олигодендроглии выше упомянутых структур исследовались кариометрически и цитофотометрически в срезах подвергнутых реакции Feulgena употребляя анализатора микроскопического образа соединенного с компьютером Morphoquant. Компьютеризировались размеры величия, формы и показателя экстинкции ДНА трехсот клеток олигодендроглии каждого экспериментального животного а результаты сравнивались с группой трехсот клеток каждой контрольной крысы на знаменательном уровне $p < 0,05$.

Проведенные измерения обнаружили в мозгах гипоксических крыс некоторое количество кариометрических и цитофотометрических изменений, зависящих от степени гипоксии и исследованных структур белого вещества. Исследования подтвердили чувствительность олигодендроглии к повреждающему действию гипоксии.

REFERENCES

1. Albrecht J., Śmiałek M.: Neuronal and glial protein synthesis in rat brain in various models of experimental hypoxia. In: Proceeding of VIIth International Congress of Neuropathology, Budapest, Hungary 1—7 September 1974. Akademiai Kiado, Budapest 1975, 589—596.
2. Brierley J. B.: Cerebral hypoxia. In: Greenfield's Neuropathology. Eds: W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. E. Arnold, London, 1976, pp. 43—83.
3. Friede R.: The histochemical architecture of the Ammon's horn as related to its selective vulnerability. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1966, 6, 1—13.
4. Gilles F.: Selective symmetrical neuronal necrosis of certain brain stem tegmental nuclei in temporary cardiac standstill. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1963, 22, 319—328.
5. Greń J.: *Statystyka matematyczna. Modele i zadania*, PWN, Warszawa, 1982.
6. Hassler R.: *Zur funktionellen Anatomie des Limbischen Systems*. *Nervenarzt*, 1964, 9, 386—396.
7. Ibrahim M., Philander E., Briscoe B., Bayliss D., Adams C.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy in the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1963, 26, 479—486.
8. Ingvar D., Brun A.: Das komplette apallische Syndrom. *Arch. Psych. Nervenkrank.*, 1972, 215, 219—239.
9. Koenig R., Koenig H.: An experimental study of post mortem alterations in neurons of the central nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1952, 11, 69—78.

10. Kraśnicka Z., Renkawek K., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 507—518.
11. Krygier-Stojałowska A.: Zasady cytofotometrii. In: *Topochemiczne metody badania komórek i tkanek*. PWN, Warszawa, 1962, 114—134.
12. Mossakowski M.: Morfologia i histochemia uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 53—63.
13. Mossakowski M., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 441—449.
14. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa*. PWN, Warszawa, 1966.
15. Voss K., Neumann B., Witsack W.: „Universelle Programmsystem” für den automatischen Mikroskopbildanalysator Morphoquant. *Jenauer Rundsch.*, 1979, 24, 167—169.
16. Wender M., Kozik M.: Enzyme histochemistry of the neuroglia in demyelinating diseases. *Neuropat. Pol.*, 1978, 2, 211—218.
17. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978, 2, 153—172.
18. Yonezawa T., Bernstein M., Peterson E., Murray M.: Histochemical study of oxidative enzymes in myelination cultures of central and peripheral nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1962, 21, 479—487.
19. Zalewska T.: Effect of hypoxia and pentobarbital anesthesia on proteins synthesis in the rat brain. *Proceeding of VIIth International Congress of Neuropathology, Budapest, 1—7 September 1974, Akademiai Kiado, Budapest, 1975, 589—592.*

Authors' address: Department of Neuropathology, School of Medicine, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

JERZY W. ŁAZAREWICZ, KRYSZYNA NOREMBERG

PENTOBARBITAL A HOMEOSTAZA WAPNIA W SYNAPTOSOMACH
MÓZGU SZCZURA: WPŁYW CHRONICZNEGO DAWKOWANIA
I STOSOWANIA *IN VITRO*

Zakład Neurochemii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN
Warszawa

Molekularne mechanizmy anestetycznego działania barbituranów nie są poznane, jednakże obecnie dominuje tendencja do wiązania tego efektu z oddziaływaniem pochodnych kwasu barbiturowego na błony plazmatyczne komórek nerwowych, zmianami transportu jonów i związków niskocząsteczkowych (Chang, Ho 1979; Cutler i wsp. 1974), modyfikacją odpowiedzi receptorowych (Costa, Guidotti 1979), a w konsekwencji zaburzeniem przewodnictwa i transmisji synaptycznej. Jony wapnia odgrywają istotną rolę w regulacji pobudliwości i są niezbędnym czynnikiem w procesie sekrecji neuroprzekaźników w zakończeniach synaptycznych (Erulkar, Fine 1979). Wiadomo, że barbiturany hamują transmisję nerwową w synapsach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (Ho, Harris 1981), a efekt ten może być związany z zaburzeniami homeostazy wapnia.

Wykazano, że barbiturany modyfikują transport i rozmieszczenie Ca^{2+} w różnych strukturach subkomórkowych neuronów (Blaustein, Ector 1975; Friedman i wsp. 1979; Hood, Marris 1979). Zaburzenia transportu wapnia dotyczą przede wszystkim hamowania przez barbiturany zależnych od potencjału kanałów wapniowych (Blaustein, Ector 1975; Łazarewicz i wsp. 1981). Wykazano ponadto pobudzający wpływ barbituranów na aktywność $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPazy w izolowanych błonach synaptoplazmatycznych mózgu (Deliconstantinos 1983; Willow, Johnston 1979), nie zostało jednak wyjaśnione czy zjawisku temu towarzyszy aktywacja pompy wapniowej w zakończeniach synaptycznych.

Istnieją sprzeczności w ocenie wpływu barbituranów na wiązanie wapnia z błonami plazmatycznymi neuronów. Wczesne doniesienia postulujące wzrost wiązania wapnia (Blaustein 1967; Seeman 1972) nie zostały po-

twierdzone (Harris, Fenner 1982). Z drugiej jednak strony, jak wykazaliśmy poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1981), barbiturany podane *in vitro* zwiększają wiązanie wapnia z hydrofobowymi domenami błon synaptoplazmatycznych, co manifestuje się wzrostem fluorescencji kompleksu chlorotetracyklina — wapń. Nasunęło to przypuszczenie, że istnieją związki przyczynowe między zwiększoną zawartością wapnia w hydrofobowych rejonach błon a inhibicją kanałów wapniowych przez barbiturany (Łazarewicz i wsp. 1981). Wykazano, że przewlekłe stosowanie barbituranów *in vivo*, wywołujące tolerancję, obniża wpływ tych związków *in vitro* na nagromadzanie wapnia w synaptosomach mózgu (Leslie i wsp. 1980), nie wiadomo jednak, czy podobny efekt może dotyczyć monitorowanego przez chlorotetracyklinę (CTC) wiązania Ca w domenach o niższej polarności.

Niniejsza praca miała na celu ocenę wpływu pentobarbitalu stosowanego *in vitro* na wypływ wapnia z izolowanych zakończeń synaptycznych mózgu (będący częściowo odbiciem aktywności pompy wapniowej zależnej od ATP w synaptosomach). Badania zmierzały także do wyjaśnienia wpływu przewlekłego dawkowania barbituranu na wiązanie wapnia z lipidową komponentą błon.

MATERIAŁ I METODY

Materiał

Do doświadczeń stosowano szczury rasy Wistar o masie ciała 200—250 g. Jednorazowo podawano pentobarbital sodu w dawce 60 mg/kg masy ciała w iniekcji dootrzewnowej. Po 30 min zwierzęta dekapitowano i pobierano materiał do badań. Kontrolę stanowiły szczury, którym dootrzewnowo podano 0,9% NaCl. W przypadku wielokrotnego podawania pentobarbitalu dawkowanie barbituranu dostosowywano do zmian masy ciała zwierzęcia. W pierwszym dniu zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo pentobarbital sodu w dawce 30 mg/kg masy ciała. W ciągu następnych 21 dni dawkę stopniowo zwiększano kontrolując jednocześnie masę ciała i uwzględniając zmiany szybkości metabolizmu barbituranu w organizmie oraz rozwój tolerancji (Elrod, Leslie 1980). Ostatnia dawka pentobarbitalu wynosiła 50 mg/kg masy ciała (wzrost o 67% w stosunku do dawki wyjściowej), natomiast przyrost masy ciała wyniósł 21% w grupie kontrolnej i 19,4% w grupie doświadczalnej. Kontrolę stanowiły zwierzęta, które otrzymywały dootrzewnowo 0,9% NaCl.

Preparatyka synaptosomów

Synaptosomy z półkul mózgu szczura otrzymywano metodą flotacyjną Bootha i Clarka (1978). Materiał homogenizowano ręcznie w szklanym homogenizatorze Dounce'a w środowisku izolacyjnym zawierającym

0,32 M sacharozę z 1 mM EDTA oraz 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Nieoczyszczoną frakcję mitochondrialną P₂ otrzymaną po kolejnych wirowaniach przez 3 min przy 1300 g oraz 10 min przy 17 000 g rozdzielano na nieciągłym gradiencie stężeń 12% i 7% ficollu w 0,32 M sacharozie, przez 30 min przy 99 000 g, stosując ultrawirówkę MSE Super Speed 65 z wychyleniowym rotorem 3 × 25 ml. Materiał zebrany z warstwy między 12% i 7% ficollem rozcieńczano czterokrotnie płynem izolacyjnym i wirowano przez 10 min przy 17 000 g. Synaptosomy zawieszono w 0,32 M sacharozie używano do dalszych oznaczeń.

Nagromadzenie ⁴⁵Ca

Synaptosomy (1 mg białka/ml) preinkubowano przez 10 min w 30°C w 0,3 ml środowiska jonowego zawierającego 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 1,0 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM glukozę. Nagromadzenie ⁴⁵Ca inicjowano przez dodanie 0,2 ml środowiska inkubacyjnego z ⁴⁵Ca (0,1 μCi/μmol), standardowego lub zmodyfikowanego, wysokopotasowego, w którym NaCl został zastąpiony równoważną ilością KCl. Reakcję kończono przez dodanie 5 ml ochłodzonego środowiska bezwapniowego zawierającego 12 mM EGTA. Każdą próbkę natychmiast filtrowano przez sączki Whatman GF/B, które przemywano dwoma 10 ml porcjami zimnego medium bezwapniowego. Radioaktywność ⁴⁵Ca mierzono w liczniku scyntylicyjnym Beckman LS 9000 stosując płyn scyntylicyjny Braya.

Uwalnianie ⁴⁵Ca

Synaptosomy (1 mg białka/ml) preinkubowano przez 10 min w wysokopotasowym medium jonowym zawierającym 1,2 mM ⁴⁵CaCl₂ (akt. spec. 0,1 μCi/μmol). Następnie, gdy uwalnianie ⁴⁵Ca badano metodą superfuzji, mieszaninę inkubacyjną rozcieńczano dwukrotnie zimnym standardowym roztworem jonowym i wirowano przez 5 min przy 1000 g celem osadzenia synaptosomów na filtrze Whatman GF/B. Filtry umieszczano w komorze superfuzyjnej, opisanej poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1977). Wymuszona przez pompę perystaltyczną szybkość przepływu roztworu jonowego wynosiła 1,2 ml/min. Próbkę tego roztworu zbierano co 1 min i oznaczano w nich radioaktywność ⁴⁵Ca w 10 ml płynu scyntylicyjnego Braya. Gdy uwalnianie ⁴⁵Ca oceniano przez pomiar radioaktywności pozostającej w synaptosomach, izolowane zakończenia synaptyczne wyznaczone ⁴⁵Ca przemywano dwukrotnie ochłodzonym standardowym roztworem jonowym wirując próby przez 5 min przy 1000 g. Synaptosomy ponownie zawieszano w tym środowisku i inkubowano przez 5 min w temperaturze 30°C. Do równoległych prób dodawano 0,3 mM pentobarbital sodu i 1 mM 2,4-dwunitrofenol (DNP) oraz kontynuowano inku-

bację przez następne 15 min. Inkubację przerywano sączeniem synaptosomów przez sączki Whatman GF/B, filtry przemywano 20 ml ochłodzonego standardowego roztworu jonowego pozbawionego wapnia. Radioaktywność oznaczano w 10 ml płynu scyntylicyjnego Braya.

Badanie fluorescencji kompleksu chlorotetracyklina-wapń

Fluorescencję kompleksu CTC-Ca mierzono we frakcji synaptosomów przy wzrastającym stężeniu Ca oraz pentobarbitalu. Wszystkie pomiary przeprowadzano przy świetle wzbudzenia o długości fali 410 nm i szerokości szczeliny 1,0 mm oraz przy długości fali emisji 520 nm i szerokości szczeliny 1,0 mm na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman, jak opisano poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1981). Synaptosomy (0,3 mg białka) zawieszono w środowisku jonowym zawierającym 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM bufor fosforanowy pH 7,4 oraz 10 mM glukozę w końcowej objętości 1 ml. Roztwory CaCl₂ i pentobarbitalu dodawano w objętościach 10–20 μl, a przy obliczeniach zmian fluorescencji uwzględniano efekt rozcieńczenia.

Oznaczanie białka w próbach. Stężenie białka badano metodą Lowry (1951).

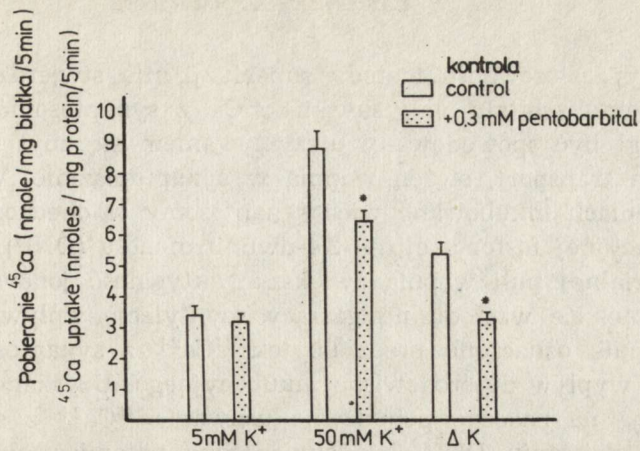
Analiza statystyczna wyników. Wyniki przedstawiono jako średnie ± standardowy błąd średniej z podanej liczby doświadczeń. Ocenę istotności różnic między średnimi dokonywano przy użyciu testu *t* Studenta.

WYNIKI

Wpływ pentobarbitalu *in vitro* na transport ⁴⁵Ca w synaptosomach kontrolnych

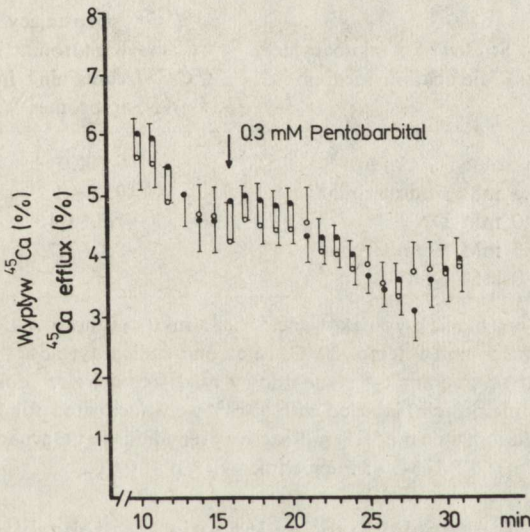
Pobieranie ⁴⁵Ca przez synaptosomy badano w standardowym środowisku zawierającym 5 mM KCl oraz w roztworze zawierającym podwyższone, depolaryzujące stężenie jonów potasu (ryc. 1). Uzyskane wyniki reprezentują odpowiednio: spoczynkową dyfuzję wapnia zgodnie z gradientem elektrochemicznym oraz — przy depolaryzacji — napływ ⁴⁵Ca²⁺ przez zależne od potencjału kanały wapniowe, zachodzący na tle biernej dyfuzji. Dla ujawnienia zależnej od potencjału składowej nagromadzenia wapnia obliczano różnicę między pobieraniem ⁴⁵Ca w środowisku wysoko- i niskopotasowym (ΔK). Jak przedstawiono na rycinie 1, pentobarbital w stężeniu 0,3 mM nie miał wpływu na spoczynkowe pobieranie wapnia, hamował natomiast w 27% nagromadzenie ze środowiska depolaryzującego. Zależna od depolaryzacji składowa nagromadzenia wapnia (ΔK) była hamowana w około 40%.

Wpływ pentobarbitalu na procesy odpowiedzialne za usuwanie jonów wapnia z zakończeń synaptycznych oceniano przez pomiar wypływu ⁴⁵Ca z uprzednio wyznakowanych synaptosomów. Jak przedstawiono na ryci-



Ryc. 1. Wpływ pentobarbitalu *in vitro* na nagromadzenie ⁴⁵Ca w synaptosomach mózgu szczura. Synaptosomy inkubowano 5 min w temp. 30°C w środowisku niskopotasowym (5 mM K⁺) oraz wysokopotasowym (50 mM K⁺) zawierającym 0,3 mM pentobarbital. ΔK stanowi różnicę między nagromadzeniem ⁴⁵Ca w medium niskoi wysokopotasowym. Wyniki są średnimi ± standardowy błąd średniej z 9 doświadczeń. *p < 0,05

Fig. 1. Effect of pentobarbital *in vitro* on ⁴⁵Ca uptake in rat brain synaptosomes. Synaptosomes were incubated for 5 min at 30°C in low-potassium (5 mM K⁺) or high-potassium (50 mM K⁺) media containing 0.3 mM pentobarbital. ΔK is the difference between ⁴⁵Ca uptake in low- and high-potassium media. Means ± S.E.M. of 9 experiments. *p < 0.05



Ryc. 2. Wpływ 0,3 mM pentobarbitalu na wypływ ⁴⁵Ca²⁺ z synaptosomów. Synaptosomy wyznakowano ⁴⁵Ca i badano uwalnianie radioaktywności przez superfuzję standardowym środowiskiem jonowym (○ ○ ○) lub od momentu zaznaczonego strzałką medium zawierającym 0,3 mM pentobarbital (● ● ●). Wyniki — radioaktywność poszczególnych porcji superfuzatu wyrażono w procentach całkowitej radioaktywności pozostającej w próbce. Wyniki są średnimi ± standardowy błąd średniej z 4 doświadczeń

Fig. 2. Effect of 0.3 mM pentobarbital on ⁴⁵Ca²⁺ efflux from synaptosomes. Synaptosomes were labelled with ⁴⁵Ca, then the efflux of radioactivity was followed by superfusion with standard ionic medium (○ ○ ○) or, from the time point marked by arrow, with medium containing 0.3 mM pentobarbital (● ● ●). Results — the radioactivity in superfusate is expressed in per cent of total radioactivity remaining in the sample. Means ± S.E.M. of 4 experiments

nie 2, przy zastosowaniu metody superfuzji, nie stwierdzono istotnego wpływu pentobarbitalu na usuwanie ^{45}Ca z synaptosomów. Ten brak efektu mógł być spowodowany utrzymywaniem się zbyt niskich, ograniczających transport, stężeń wapnia w synaptoplazmie. W następnych doświadczeniach inkubowano więc synaptosomy w obecności rozpręgaacza oksydacyjnej fosforylacji — 2,4-dwunitrofenolu (DNP), aby kosztem mitochondrialnej puli wapnia zwiększyć aktywność jonów Ca^{2+} w synaptoplazmie. Ze względu na gaszący scyntylicację wpływ DNP, uwalnianie wapnia oznaczano przez ubytek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z synaptosomów, a nie przez jego wypływ do środowiska inkubacyjnego. Uzyskane wyniki (tab. 1) wskazują na znaczne pobudzenie usuwania $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z synaptosomów poddanych działaniu DNP. Nie stwierdzono natomiast wpływu pentobarbitalu na ten efekt.

Tabela 1. Wpływ 0,3 mM pentobarbitalu oraz 1 mM 2,4-dwunitrofenolu (DNP) na wypływ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z synaptosomów mózgu szczura

Table 1. Effect of 0.3 mM pentobarbital and 1 mM 2.4-dinitrophenol (DNP) on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux from rat brain synaptosomes

Środowisko inkubacyjne Incubation medium	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ pozostający w synaptosomach $^{45}\text{Ca}^{2+}$ reamaining in synaptosomes %
Kontrolne — Control	100,0
+0.3 mM pentobarbital	101,5±1,9
+1.0 mM DNP	47,2±1,4*
+0.3 mM pentobarbital 1.0 mM DNP	48,1±1,7*

Synaptosomy (1 mg białka) wyznakowane $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inkubowano w standardowym środowisku Krebsa-Ringera przez 15 min w temp. 30°C. Mierzono radioaktywność ^{45}Ca pozostającą w synaptosomach. Wyniki są średnimi ± standardowy błąd średniej z 5 doświadczeń. * $p < 0.01$

Synaptosomes (1 mg protein) labelled with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ were incubated for 15 min at 30°C in standard Krebs-Ringer solution, then the ^{45}Ca radioactivity remaining in the synaptosomes was measured. Results represent means ± S.E.M. of 5 experiments. * $p < 0.01$

Wpływ ostrego i przewlekłego podawania pentobarbitalu na transport $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w synaptosomach.

Podawanie pentobarbitalu *in vivo* w pojedynczej dawce wywołującej narkozę lub przez okres 21 dni, co wywołuje tolerancję, miało niewielki, nieznamienisty statystycznie wpływ na pobieranie wapnia przez synaptosomy inkubowane w środowisku nisko- i wysokopotasowym, a także na zależną od depolaryzacji składową nagromadzenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (ΔK) (tab. 2). Natomiast ujawnienie efektu działania pentobarbitalu *in vivo* jest możliwe po jego podaniu *in vitro*, w stężeniu 0,3 mM. Stwierdzono

Tabela 2. Wpływ ostrego i przewlekłego dawkowania pentobarbitalu *in vivo* oraz podawania *in vitro* na nagromadzenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w synaptosomach mózgu szczura

Table 2. Effect of pentobarbital in acute and chronic *in vivo* treatment and *in vitro* administration on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by rat brain synaptosomes

Środowisko inkubacyjne Incubation medium	Nagromadzenie ^{45}Ca (nmole/mg białka/5 min) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake (nmoles/mg protein /5min)					
	Podawanie pentobarbitalu <i>in vivo</i> <i>in vivo</i> pentobarbital administration					
	Kontrola Control	% hamowania Inhibition (%)	Przewlekłe Chronic	% hamowania Inhibition (%)	Ostre Acute	% hamowania Inhibition (%)
Wysokopotasowe High potassium	8,78±0,56		9,29±0,60		10,11±0,53	
Wysokopotasowe + 0,3 mM pentobarbital	6,47±0,32	26,3	8,16±0,40	12,2	7,98±0,40	21,1
Niskopotasowe Low potassium	3,38±0,28		4,63±0,39		4,36±0,30	
Niskopotasowe + 0,3 mM pentobarbital	3,20±0,25	5,4	4,52±0,46	2,4	3,97±0,33	9,0
ΔK	5,40±0,34		4,66±0,45		5,75±0,46	
$\Delta\text{K} + 0.3 \text{ mM}$ pentobarbital	3,27±0,23	40,2±5,4	3,64±0,12	21,8±4,4*	4,01±0,42	30,7±5,0

Dawkowanie pentobarbitalu *in vivo* opisano w Metodach. Synaptosomy inkubowano w wysokopotasowym (50 mM KCl) oraz niskopotasowym (5 mM KCl) środowisku inkubacyjnym przez 5 min w temp. 30°C. ΔK stanowi różnicę między nagromadzeniem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w środowisku zawierającym 50 mM K^+ i 5 mM K^+ . Średnie \pm standardowy błąd średniej z 6–11 doświadczeń.

* $p < 0.05$

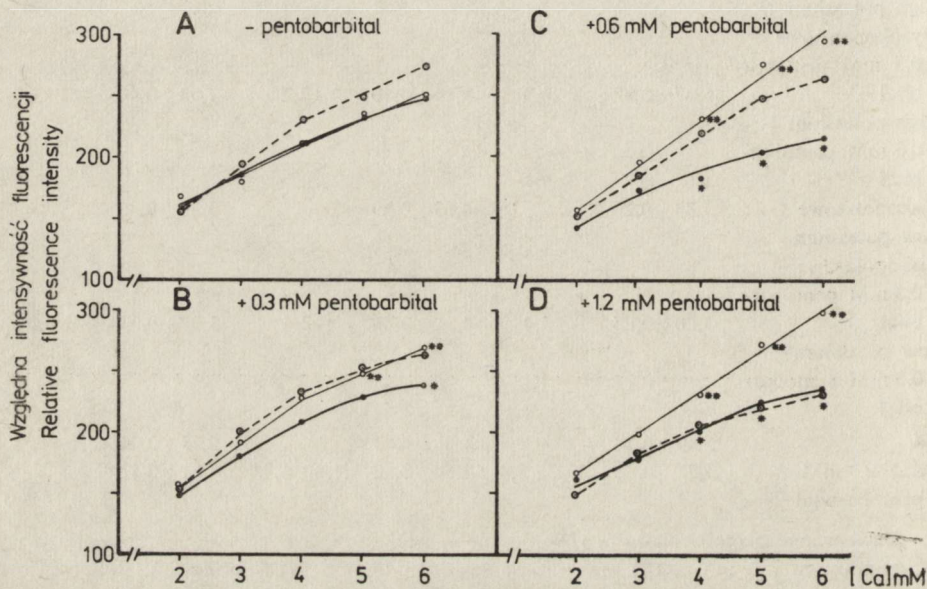
In vivo pentobarbital administration as described in Methods. Synaptosomes were incubated for 5 min at 30°C in high-potassium (50 mM KCl) or low potassium (5 mM KCl) incubation medium. ΔK is a difference between $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in the high- and low potassium media. Means \pm S.E.M. of 6–11 experiments. * $p < 0.05$

(tab. 2), że netto napływ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do synaptosomów kontrolnych jest hamowany w 40% w obecności pentobarbitalu (por. także ryc. 1), natomiast efekt działania barbituranu w synaptosomach izolowanych ze zwierząt uprzednio otrzymujących pentobarbital jest osłabiony. Przy przewlekłym podawaniu barbituranu hamujące działanie pentobarbitalu *in vitro* na zależne od depolaryzacji pobieranie wapnia jest obniżone o 50% w porównaniu z kontrolą. Efektu tego nie stwierdzono po jednorazowym podaniu barbituranu.

Wpływ pentobarbitolu na fluorescencję kompleksu CTC-Ca w synaptosomach

Wiązanie wapnia w hydrofobowych domenach błon synaptosomalnych było w tej pracy monitorowane przez pomiar fluorescencji chlorotetracykliny (CTC). Jak wykazano w doświadczeniach kontrolnych, dynamika wzrostu intensywności fluorescencji CTC w wyniku dodania wapnia do zawiesiny synaptosomów i wiązania się go z błonami jest bardzo szybka. Fluorescencja osiąga maksimum po 30 s, wszystkie pomiary wykonywano więc w czasie nie przekraczającym 1 min.

Dane na rycinie 3 A obrazują wpływ wzrastających stężeń jonów wapnia na fluorescencję kompleksu CTC-Ca w synaptosomach kon-



Ryc. 3. Wpływ pentobarbitolu *in vivo* i *in vitro* na intensywność fluorescencji CTC-Ca w synaptosomach. Do środowiska inkubacyjnego zawierającego synaptosomy (0,5 mg/ml) dodawano pentobarbital i CaCl_2 w różnych stężeniach. Krzywe przedstawiają fluorescencję CTC-Ca w synaptosomach kontrolnych (\circ — \circ) lub izolowanych po jednorazowym (\bullet — \bullet) i wielokrotnym (\bullet — \bullet) podawaniu pentobarbitolu *in vivo*. Średnie z 3—6 doświadczeń. Wartość standardowego błędu średniej nie przekracza 10% wartości średniej. Intensywność fluorescencji podano w jednostkach umownych. * Różnice znamienne statystycznie w porównaniu z odpowiednimi synaptosomami kontrolnymi ($p < 0.05$), ** Różnica znamienne statystyczna w porównaniu z synaptosomami kontrolnymi inkubowanymi bez pentobarbitalu ($p < 0,05$)

Fig. 3. Effect of pentobarbital administered *in vivo* and *in vitro* on CTC-Ca fluorescence intensity in synaptosomes. Pentobarbital and CaCl_2 in different concentrations were added to incubation media containing synaptosomes (0.5 mg/ml). Courves represent CTC-Ca fluorescence in control synaptosomes (\circ — \circ) or in synaptosomes isolated after single (\bullet — \bullet) or multiple (\bullet — \bullet) pentobarbital injections *in vivo*. Results represent means of 3—6 experiments. S.E.M. do not exceed 10% of the mean value. Fluorescence intensity is expressed in arbitrary units. * Difference significant in respect to corresponding control synaptosomes ($p < 0.05$). ** Difference significant in respect to control synaptosomes incubated without pentobarbital ($p < 0.05$)

trolnych oraz izolowanych ze zwierząt otrzymujących pentobarbital *in vivo*, jednorazowo lub w dawkach przewlekłych. Pobudzający wpływ pentobarbitalu obecnego *in vitro* w stężeniach 0,3, 0,6, i 1,2 mM na fluorescencję CTC-Ca przedstawiono na rycinach 3 B, C, D. Ten efekt wzmocnienia fluorescencji CTC-Ca, obserwowany w synaptosomach grupy kontrolnej w obecności 0,3 mM pentobarbitalu, był całkowicie zniesiony w synaptosomach zwierząt poddanych przewlekłemu dawkowaniu barbituranu (ryc. 3 B). W obecności 1,2 mM pentobarbitalu zarówno w synaptosomach izolowanych po jednorazowym, jak i po przewlekłym dawkowaniu barbituranu *in vivo* obserwowano obniżenie fluorescencji CTC-Ca ryc. 3 D). Przedstawione wyniki wykazały więc, że przewlekłe podawanie pentobarbitalu *in vivo* prowadzi zarówno do obniżenia hamującego wpływu tego barbituranu *in vitro* na zależne od potencjału pobieranie Ca, jak i do zmniejszenia stymulowanego przez pentobarbital *in vitro* wiązania wapnia do elementów hydrofobowych błon.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań nad wpływem pentobarbitalu podanego *in vivo* na nagromadzenie wapnia w izolowanych zakończeniach nerwowych nie wskazują na istnienie znacznych zaburzeń, mimo głębokiego uspiewania zwierząt. Efekt ten można tłumaczyć częściowym odplukaniem barbituranu z zakończeń nerwowych w czasie procedury izolacji. Natomiast zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami (Blaustein, Ector 1975; Elrod, Leslie 1980; Łazarewicz i wsp. 1981), stwierdzono hamowanie przez pentobarbital podawany *in vitro* zależnego od depolaryzacji nagromadzenia wapnia. Wydaje się, że efekt ten nie jest spowodowany obniżeniem wewnątrzsynaptosomalnego wiązania tego kationu. Przemawia za tym brak wpływu pentobarbitalu na dynamikę uwalniania ^{45}Ca z synaptosomów. Wbrew poprzednim doniesieniom, wskazującym na hamujące działanie barbituranów na nagromadzenie Ca przez izolowane mitochondria mózgu (Pincus, Hsiao 1981), wykazano jednak aktywację tego procesu przez pentobarbital (Willow, Bygrave 1982). Retencję ^{45}Ca w synaptosomach mogłoby obniżyć pobudzenie aktywnego usuwania Ca^{2+} z synaptoplazmy z udziałem $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPazy}$ zlokalizowanej w błonie plazmatycznej. Sugerowano, że układ enzymatyczny pompy wapniowej we frakcji błon synaptoplazmatycznych może być modulowany przez pentobarbital (Willow, Johnston 1979; Deliconstantins 1983). Przedstawione w tej pracy wyniki dotyczące wpływu pentobarbitalu na usuwanie Ca^{2+} z synaptosomów, uzyskane dwoma metodami wykazały jednak brak tego efektu. Trudno jednoznacznie stwierdzić, czy wynik ten oznacza rzeczywiście brak następstw czynnościowych modyfikacji zależnej od wapnia ATPazy, czy też wykazanie zmian aktywności pompy wapniowej wymaga specjalnych warunków doświadczalnych.

Przedstawione dane sugerują, że najbardziej prawdopodobnym miejscem działania barbituranów na homeostazę Ca^{2+} jest błona synaptoplazmatyczna i zlokalizowane w niej kanały wapniowe. Interakcja barbituranów z lipidową komponentą błony w otoczeniu kanału wapniowego wydaje się prowadzić do obserwowanego hamowania zależnego od depolaryzacji nagromadzania wapnia. Dostępne dane z piśmiennictwa dotyczące oddziaływania barbituranów na błony nie są jednoznaczne, co można wiązać z szeroką gamą stosowanych metod badawczych i różnymi dawkami użytych barbituranów. Sugerowano wprawdzie (Harris, Bruno 1985), że wpływ barbituranów na zależne od potencjału kanały wapniowe nie pozostaje w prostej zależności od ich zdolności do dezorganizacji fazy lipidowej błon synaptoplazmatycznych, jednakże za zaburzeniem przez pentobarbital właściwości obszarów hydrofobowych błon zdecydowanie przemawia wykazany w tej pracy wzrost fluorescencji kompleksu CTC-Ca w błonach synaptosomów, co odpowiada wzrostowi wiązania wapnia w domenach o niższej polarności. Podłożem molekularnym tych efektów są prawdopodobnie zmiany konformacyjne szkieletu fosfolipidowego błon z tendencją do ekspozycji grup lub obszarów wykazujących powinowactwo do wapnia (Seeman 1972). W błonach synaptoplazmatycznych barbiturany wywierają jednak kompleksowy i różnorodny wpływ na wiązanie i zawartość wapnia. Co prawda wzrasta monitorowane fluorescencją CTC wiązanie Ca^{2+} w domenach hydrofobowych, ale maleje całkowita zawartość tego kationu w błonach (Hood, Harris 1979; Łazarewicz i wsp. 1981) i jego wiązanie z ich zewnętrzną powierzchnią (Harris, Fenner 1982). W tej sytuacji uzasadnione wydaje się przypuszczenie, że mechanizm działania barbituranów może być związany z przemieszczeniem wapnia z hydrofilnych obszarów błony do jej domen hydrofobowych, co z kolei powodowałoby zmiany w oddziaływaniach między cząsteczkami wewnątrz błony i wtórnie zaburzało aktywność kanałów jonowych, zwłaszcza zależnych od potencjału kanałów wapniowych. Nie wyklucza to jednak możliwości oddziaływania barbituranów na białka, a zwłaszcza na receptory błonowe (Costa, Guidotti 1979).

Model tolerancji na pentobarbital okazał się przydatny do określenia powiązań między wywołanymi przez barbiturany zmianami struktury lipidowej błon, zwłaszcza w ich obszarach hydrofobowych, a aktywnością kanałów wapniowych. Wiadomo, że przewlekłe podawanie szeregu związków, w tym również pentobarbitalu, modyfikuje skład lipidowy błon synaptosomalnych (Ingram i wsp. 1978). Z drugiej strony stwierdzono, obserwowane także w naszych badaniach, osłabienie hamującego działania pentobarbitalu *in vitro* na zależny od depolaryzacji napływ wapnia do zakończeń nerwowych izolowanych ze zwierząt, którym chronicznie podawano ten związek (Ondrusek i wsp. 1979; Leslie i wsp. 1980). Wykazane przez nas osłabienie stymulującego działania pentobarbitalu na monitorowane fluorescencją CTC wiązanie wapnia w hydrofobowych

obszarach błon synaptosomów ze zwierząt chronicznie otrzymujących ten barbituran jest, o ile wiemy, pierwszą obserwacją tego typu. Efekt ten znajduje najprawdopodobniejsze wytłumaczenie w zmianach składu fosfolipidowego błon synaptoplazmatycznych, a zwłaszcza modyfikacji ich profilu acylowego (Ingram i wsp. 1978). Fakt, że tolerancja na barbiturany dotyczy w równym stopniu aktywności kanałów wapniowych, jak i wiązania wapnia w hydrofobowych domenach błon synaptosomalnych mogą świadczyć o powiązaniach przyczynowych między obu tymi procesami. Czynnikiem wiążącym oba zjawiska zachodzące w tolerancji barbituranowej są zmiany właściwości fizykochemicznych środowiska lipidowego błon. Wyniki te podkreślają istotną i złożoną rolę lipidowej struktury błony w utrzymywaniu homeostazy wapnia w neuronach.

WNIOSKI

1. Badania potwierdziły hamujący wpływ pentobarbitalu *in vitro* na aktywowane przez potas pobieranie wapnia przez synaptosomy mózgu szczura oraz wzrost mierzonego fluorescencją chlorotetracykliny wiązania wapnia w hydrofobowych domenach błon synaptosomalnych. Nie wykazano natomiast aktywacji przez pentobarbital uwalniania Ca^{2+} z synaptosomów.

2. Stwierdzono, że tolerancja na pentobarbital, która rozwija się w wyniku przewlekłego dawkowania tego barbituranu wyraża się, obok obniżenia wrażliwości zależnych od potencjału kanałów wapniowych, także zmniejszonym wpływem pentobarbitalu na wiązanie wapnia w hydrofobowych domenach błon.

3. Uzyskane wyniki wskazują na modyfikację lipidowych elementów struktury błon synaptoplazmatycznych, jako na istotny element mechanizmu tolerancji na barbiturany w ośrodkowym układzie nerwowym.

PENTOBARBITAL AND CALCIUM HOMEOSTASIS IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES: EFFECT OF CHRONIC TREATMENT AND *IN VITRO* ADMINISTRATION

Summary

In vitro studies concerned the effect of pentobarbital on ^{45}Ca uptake and efflux from control rat brain synaptosomes and on the accumulation and binding of calcium by synaptosomes isolated from animals submitted to single or chronic (for 21 days) pentobarbital treatment *in vivo*. Pentobarbital, when applied in the concentration inhibiting the potassium depolarization-dependent portion of ^{45}Ca uptake and increasing Ca^{2+} binding with synaptosomal membranes remained without effect on calcium efflux from synaptosomes. It was found that chronic administration of the barbiturate not only diminished the sensitivity of depolarization-dependent ^{45}Ca uptake on the inhibiting effect of pentobarbital *in vitro*, but also decreased

the pentobarbital-evoked elevation of Ca^{2+} binding to synaptosomes, as measured with CTC-Ca fluorescence. These results demonstrated that the tolerance to barbiturates may be manifested by the modification of calcium channels activity and changes in Ca^{2+} binding ability of hydrophobic domains in synaptoplasmatic membranes. Moreover the results point to the crucial role of membrane lipids in neuronal calcium homeostasis.

ПЕНТОБАРБИТАЛ И ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ В СИНАПТОЗОМАХ
МОЗГА КРЫСЫ. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ДОЗИРОВАНИЯ
И УПОТРЕБЛЕНИЯ *IN VITRO*

Резюме

Исследовалось влияние пентобарбитала *in vitro* на взятие и освобождение ^{45}Ca из синаптомов мозга контрольных крыс, а также на аккумуляцию и измеренное флюорисценцией хлоротетрациклины (СТС) связывание Ca синаптозомами животных, получающих пентобарбитал *in vivo*, в одной дозе или хронически в течение 21 дня. Обнаружено, что пентобарбитал в концентрации, которая тормозит зависимость от деполяризации ионами калия составную взятия ^{45}Ca и увеличивает связывание Ca^{2+} синаптомальными мембранами, не влиял на освобождение калия из синаптомов. Показано, что хроническое подавание барбитурана не только уменьшает восприимчивость зависимого от деполяризации взятия ^{45}Ca к тормозящему действию пентобарбитала *in vitro*, но также понижает вызванное пентобарбиталом увеличенное вязание Ca^{2+} , проявляющееся увеличением флюоресценции СТС- Ca в синаптозомах. Полученные результаты показывают, что выносивость к барбитуранам выявляется, кроме модификации активности кальциевых каналов, также изменениями вязания кальция гидрофобными областями синаптоплазматических мембран. Результаты свидетельствуют о значительной роли липидной составной части в гомеостазе кальция в нейронах.

PIŚMIENNIC TWO

1. Blaustein M. P.: Phospholipids as ion exchangers: implication for a possible role in biological membrane excitability and anesthesia. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 135, 653—662.
2. Blaustein M. P., Ector C. A.: Barbiturate inhibition of calcium uptake by depolarized nerve terminals *in vitro*. *Mol. Pharmacol.*, 1975, 11, 369—378.
3. Booth R. F., Clark J. B.: A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.*, 1978, 176, 365—370.
4. Chang Y. Y. H., Ho I. K.: Effect of acute and chronic administration of pentobarbital on catecholamine uptake in mouse brain synaptosomes. *Res. Comm. Chem. Pathol.*, 1979, 23, 465—474.
5. Costa E., Guidotti A.: Molecular mechanism in the receptor action of benzodiazepines. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1979, 19, 531—545.
6. Cutler R. W. P., Markowitz D., Dudziński D. S.: The effect of barbiturates on ^3H — GABA transport in rat cerebral cortex slices. *Brain Res.*, 1974, 81, 189—197.
7. Deliconstantinos G.: Pentobarbital modulates the (Na^+ , K^+) stimulated ATPase and Ca^{2+} stimulated ATPase activities by increasing the bilayer fluidity of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Neurochem. Res.*, 1983, 8, 1143—1152.

8. Elrod S. V., Leslie S. W.: Acute and chronic effects of barbiturates on depolarization induced calcium influx into synaptosomes from rat brain regions. *J. Pharmac. Exp. Therap.*, 1980, 212, 131—136.
9. Erulkar S. D., Fine A.: Calcium in the nervous system. *Rev. Neuroscience*, 1979, 4, 179—232.
10. Friedman M. B., Coleman R., Leslie S. W.: Barbiturate depression of calcium mediated stimulus secretion coupling in synaptosomes. A species and strain comparison. *Life Sci.*, 1979, 25, 735—738.
11. Harris R. A., Bruno P.: Membrane disordering by anesthetic drugs: relationships to synaptosomal sodium and calcium fluxes. *J. Neurochem.*, 1985, 44, 1274—1281.
12. Harris R. A., Fenner D.: Ethanol and synaptosomal calcium binding. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 1790—1792.
13. Ho K., Harris R. A.: Mechanism of action of barbiturates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21, 83—111.
14. Hood W. F., Harris R. A.: Effects of pentobarbital, ethanol and morphine on subcellular localisation of calcium and magnesium in brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1979, 28, 3075—3080.
15. Ingram L. O., Ley K. D., Hoffman E. M.: Drug-induced changes in lipid composition of *E. coli* and mammalian cells in culture: ethanol, pentobarbital and chlorpromazine. *Life Sci.*, 1978, 22, 489—494.
16. Leslie S. W., Friedman M. B., Wilcox R. E., Elrod S. V.: Acute and chronic effect of barbiturates on depolarization-induced calcium influx into rat synaptosomes. *Brain Res.*, 1980, 185, 409—417.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 263—275.
18. Łazarewicz J. W., Kanje M., Sellstrom A., Hamberger A.: Calcium fluxes in cultured and bulk isolated neuronal and glial cells. *J. Neurochem.*, 1977, 29, 495—502.
19. Łazarewicz J. W., Pastuszko A., Noremborg K., Bertoli E., Lewandowski W.: Effect of barbiturates on calcium metabolism in rat brain synaptosomes visualized by chlorotetracycline as a fluorescent chelate probe. *Cell. Molec. Biol.*, 1981, 27, 325—332.
20. Ondrusek M. G., Belknap I. K., Leslie S. W.: Effect of acute and chronic barbiturate administration on synaptosomal calcium accumulation. *Mol. Pharmacol.*, 1979, 15, 386—395.
21. Pincus J. H., Hsiao K.: Calcium uptake mechanisms affected by some convulsant and anticonvulsant drugs. *Brain Res.*, 1981, 217, 119—121.
22. Seeman P.: The membrane action of anesthetics and tranquilizers. *Pharmac. Rev.*, 1972, 24, 583—655.
23. Willow M., Bygrave L. F.: Effects of pentobarbitone on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ transport by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.*, 1982, 39, 557—562.
24. Willow M., Johnston G. A. R.: Barbiturates and calcium-activated adenosine triphosphatase. *Neurosci. Lett.*, 1979, 14, 361—364.

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

HANNA DRAC, JANINA RAFAŁOWSKA

BRODAWCZAK ZŁOŚLIWY SPLOTU NACZYNIÓWKOWEGO IMITUJĄCY ZESPÓŁ GUILLAIN—BARRÉ *

Klinika Neurologiczna, Akademia Medyczna, Warszawa

Jedną z najczęściej rozpoznawanych chorób nerwów obwodowych jest *polyradiculoganglioneuropathia*, znana pod nazwą zespołu Guillain—Barré (zespół G—B). Zespół G—B cechuje się wiotkim niedowładem kończyn z zajęciem mięśni dosiebnych lub dosiebnych i odsiebnych. Niedowłady mogą obejmować również mięśnie unerwione przez nerwy czaszkowe (zwłaszcza przez n. VII i nerwy opuszkowe) oraz przeponę i mięśnie międzyżebrowe. Zaburzenia ruchowe przeważają nad czuciowymi. W płynie mózgowo—rdzeniowym (p. m—r.) stwierdza się rozszczepienie białkowo—komórkowe. Szybkość przewodzenia w nerwach jest znacznie zwolniona. Biopsja nerwu obwodowego wykazuje przede wszystkim rozległą demielinizację włókien, czasami różnego stopnia ubytek włókien mielinowych, którego nasilenie zależy może od czasu trwania procesu chorobowego.

Zespół G—B uważany jest za wieloprzyczynową chorobę autoimmunologiczną, nie określono jednak dotąd dokładnie antygenów osłonki mielinowej, przeciwko którym skierowana jest reakcja immunologiczna przede wszystkim typu komórkowego.

Symptomatologia kliniczna obserwowanego przez nas przypadku odpowiadała, w zasadzie, kryteriom diagnostycznym zespołu G—B, mimo pewnych drobnych nietypowości.

OPIS PRZYPADKU

Dane kliniczne

T.B., mężczyzna, lat 62, na początku marca 1984 r. zaczął odczuwać drętwienie i mrowienie lewej połowy twarzy oraz lewej kończyny dolnej. Po 2 tygodniach przyjęty został do rejonowego oddziału neurolo-

* Praca wykonana w ramach planu węzłowego 10.4.05.4.1.

gicznego, gdzie stwierdzono niedowład obwodowy n. VII lewego, niedowład kończyn lewych z obniżonym napięciem i osłabionymi odruchami. Płyn mózgowo-rdzeniowy wykazywał wówczas cytozę 23, białko 149 mg⁰%, odczyny globulinowe ++. Na początku kwietnia wystąpił niedowład obwodowy prawego n. VII, niedosłuch obustronny oraz niedowład wiotki prawej kończyny dolnej. Po 6 tygodniach trwania choroby dołączyły się zaburzenia połykania, niedowład n. XII oraz krótkotrwała niewydolność mięśni oddechowych. Z powodu tych objawów przyjęty został do Kliniki Neurologicznej AM w Warszawie.

Badaniem przedmiotowym stwierdzono: RR 110/80, tętno — 100—130/min, zaostrenie szmeru pęcherzykowego w płucach, powiększenie wątroby.

Badanie neurologiczne (lekarz prowadzący: dr A. Friedman) wykazało niedoczulicę lewej połowy twarzy, obustronne porażenie n. VII, obustronną głuchotę, niedowład odsiebny kończyn górnych z obniżonym napięciem i brakiem odruchów okostnowych, porażenie kończyn dolnych z wiotkim napięciem i brakiem odruchów kolanowych oraz skokowych. Czucie bólu i dotyku typu „rękawiczek” i „skarpetek” było upośledzone na obu dłoniach oraz obustronnie poniżej stawu kolanowego. W płynie mózgowo-rdzeniowym (16 IV 1984 r.) stwierdzono cytozę 32 i białko 212 mg⁰%. W osadzie p. m-r. 80% stanowiły limfocyty, 17% — komórki monocytoidalne, 3% — granulocyty obojętnochłonne i komórki siateczki. Rutynowe badania laboratoryjne nie wykazywały odchyień. W badaniach elektrofizjologicznych stwierdzono brak odpowiedzi na drażnienie nn. VII, pachowego, strzałkowego i piszczelowego, zwolnienie szybkości przewodzenia ruchowego w ksobnym odcinku n. łokciowego (36,1 m/s) i pośrodkowego (31,9 m/s). Szybkość przewodzenia w odcinkach odsiebnych tych nerwów była prawidłowa. Szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych n. pośrodkowego była prawidłowa, a n. łydkowego — zwolniona (38,0 m/s). Zapis z mięśnia piszczelowego i prostownika krótkiego palców wskazywał na uszkodzenie typu neurogennego.

Biopsja nerwu łydkowego w barwieniu hematoksyliną-eozyną oraz według metody van Gieson nie wykazała odchyień od normy. W półcienkich skrawkach eponowych stwierdzono średniego stopnia ubytek włókien mielinowych różnej średnicy. W preparatach czesanych (100 włókien) odcinkową demielinizację lub remielinizację obserwowano w 19% włókien, zwyrodnienie aksonalne w 7% włókien. Badanie mikroskopowo-elektronowe potwierdziło obecność powyższych zmian.

Na podstawie zespołu klinicznego, odpowiadającego polineuropatii, podwyższenia poziomu białka w płynie mózgowo-rdzeniowym, zwolnienia szybkości przewodzenia w korzeniach i ksobnych częściach nerwów obwodowych oraz odcinkowej demielinizacji w nerwie łydkowym, rozpoznano, mimo pewnych nietypowości, zespół G—B. Za niezbyt typowe objawy uznano głuchotę, brak zwolnienia szybkości przewodzenia ru-

chowego w częściach odsiebnych niektórych nerwów obwodowych oraz średniego stopnia ubytek włókien mielinowych w biopsji n. łydkowego. Kontynuowano leczenie wysokimi dawkami Encortonu (80 mg/dz.), rozpoczęte w rejonowym oddziale neurologicznym. Po 7 tygodniach trwania choroby pacjent zmarł wśród objawów niewydolności krążenia.

Badanie anatomopatologiczne

Badanie sekcyjne, wykonane 5 godz. po zgonie wykazało śluzowe zapalenie oskrzeli, rozstrzenia oskrzeli, gruźlicę włóknistą obu płuc oraz bardzo nasiloną miażdżycę uogólnioną.

Badanie neuropatologiczne

Obraz makroskopowy. W sekcji makroskopowej mózgu stwierdzono dość liczne, ostro odgraniczone od otoczenia, białawo-żółtawe, dość sponiste ogniska ziarnistej tkanki. Były one zlokalizowane w środkowej części spoidła wielkiego, w prawym rogu Amona, ciałku czworaczym górnym prawym, w nakrywce mostu i konarze górnym mózdzku po stronie lewej oraz w robaku i grudce prawej mózdzku. Sekcja utrwalonego rdzenia wykazała w większości korzeni rdzeniowych ogona końskiego liczne, różnej wielkości okrągławe żółtawe guzki, dość twarde, nie dające się oddzielić od korzeni (ryc. 1). Podobne guzki widoczne były przyrdzeniowo, w korzeniach brzusznych i grzbietowych. Rozpoznanie makroskopowe:

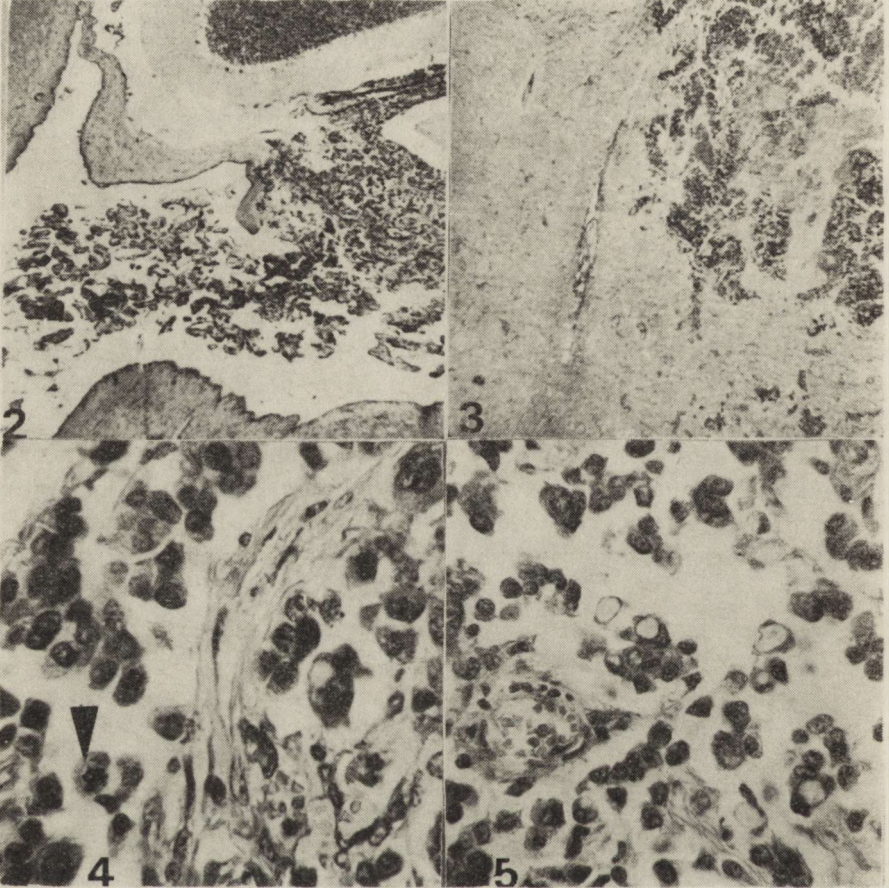


Ryc. 1. Korzenie ogona końskiego usiane licznymi, różnej wielkości guzkami. Pow. 5 X

Fig. 1. Cauda equina roots covered with multiple nodules of different size. X 5

Foci neoplasticatici multiplices (Ca? Sa in decursu morbi Recklinghauseni?) hemisphaerii cerebri utriusque, trunci cerebri, cerebelli et radicuum medullae spinalis.

Wycinki tkankowe (półkule mózgowie, pień mózgu, rdzeń kręgowy, korzenie rdzeniowe) pobrane z utrwalonego w 10% zubożonej formalinie mózgowia i rdzenia kręgowego, przeprowadzono w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną-eoźną,



Ryc. 2. Zachyłek komory IV, miejsce pierwotnego wzrostu nowotworu. H—E. Pow. 12 ×

Fig. 2. Primary site of neoplastic growth in IVth ventricle recess. H—E. × 12

Ryc. 3. Ostro ograniczone od otoczenia ognisko przerzutowe w spoidle wielkim. Widoczne pola martwicy oraz okołożylny naciek limfocytarny. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 3. Metastatic focus in corpus callosum sharply delineated from neighbouring tissue. Necrotic area and lymphocytic infiltration. H—E. × 100

Ryc. 4. Komórki nowotworowe różnej wielkości i kształtu, z pęcherzykowatym jasnym jądrem, oraz jąderkiem. Mitozy (strzałka). H—E. Pow. 200 ×

Fig. 4. Different shape and size of tumor cells with vesicular pale nucleus and nucleolus. Mitoses (arrow). H—E. × 200

Ryc. 5. Wodniczki w licznych komórkach nowotworowych. H—E. Pow. 200 ×

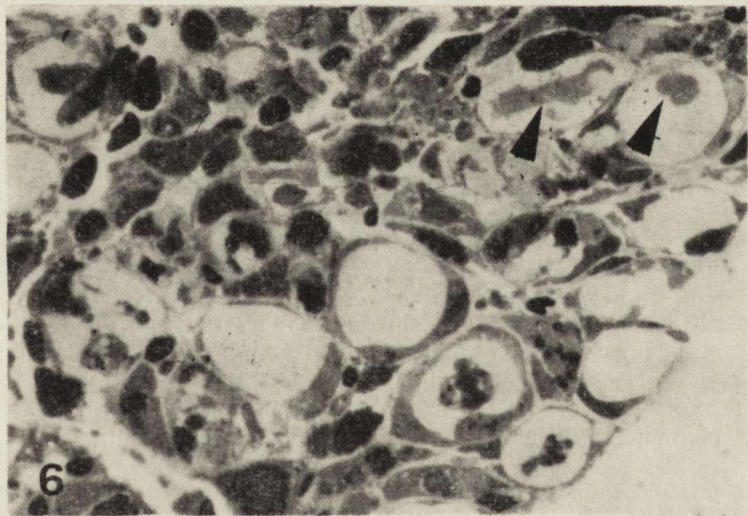
Fig. 5. Vacuoles in numerous neoplastic cells. H—E. × 200

mucikarminem i błękitem alcjanu, a także według metod van Gieson, Klüvera—Barrery, PTAH-Malloryego oraz impregnowano według metody Bielschowskyego.

Do badania mikroskopowo-elektronowego pobrano w biopsji nerw łydkowy, a z materiału autopsyjnego nerw łokciowy oraz utrwalone w formalinie korzenie brzuszny i grzbietowy na poziomie S₃.

Korzenie rdzeniowe po wypłukaniu w wodzie bieżącej (3 godz.) i przeprowadzeniu przez bufor sacharozowy (24 godz. w temp. 4°C) przygotowano do badania mikroskopowo-elektronowego w sposób rutynowy. Wycinek n. łydkowego oceniono w histologicznych barwieniach rutynowych, na półcienkich skrawkach eponowych, w preparatach czesanych oraz w mikroskopie elektronowym. Włókna izolowane uzyskiwano metodą Lubińskiej (1960), a półcienkie skrawki eponowe barwiono błękitem toluidyny i oranżem akrydyny. Materiał oceniono w mikroskopie NF Zeiss oraz w mikroskopie elektronowym JEM 100 B.

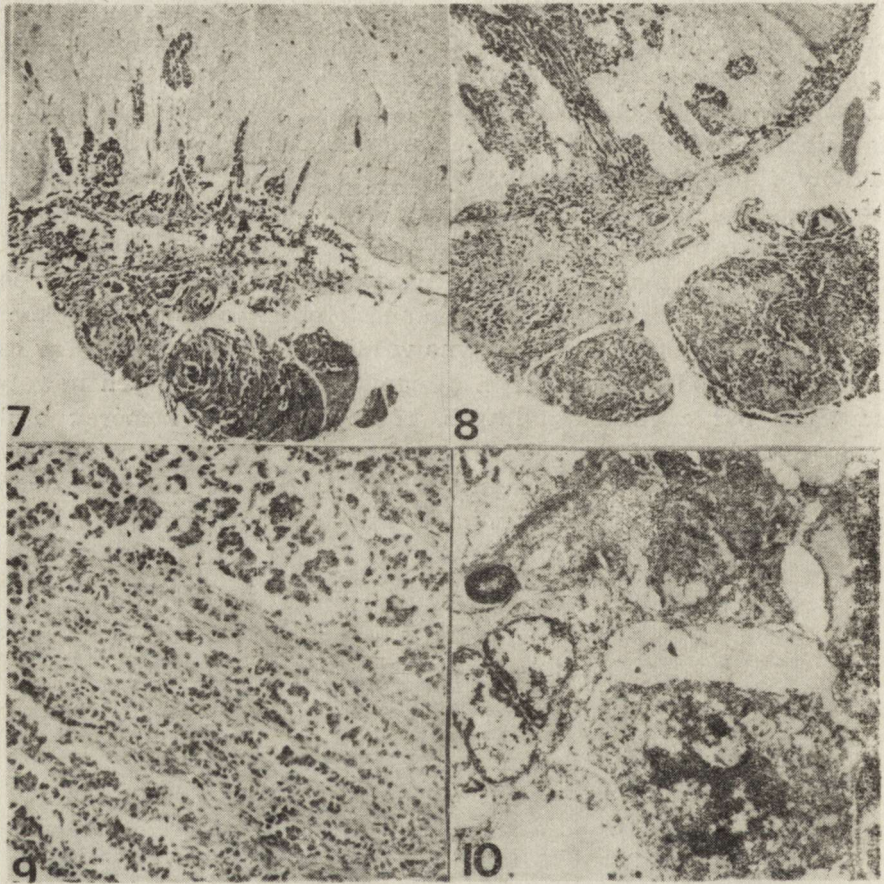
Obraz mikroskopowy. W zachyłku komory IV po stronie lewej stwierdzono znaczny obrzęk części splotu naczyniówkowego (ryc. 2). W pozostałej części splotu i przyległych tkankach obserwowano bogatokomórkowe utkanie nowotworowe. Zarówno w miejscu powstania, jak i w ostro odgraniczonych od otoczenia (ryc. 3) ogniskach przerzutowych nowotwór zbudowany był z różnokształtnych, różnej wielkości komórek o dość ubogiej cytoplazmie i dużym pęcherzykowatym jądrze z różną zawartością chromatyny oraz wyraźnym jąderkiem (ryc. 4). Niekiedy komórki miały kształt walcowaty i przesunięte ku obwodowi jądro, a ich układ



Ryc. 6. Komórki z wodniczkami, przypominające komórki sygnetowate. W niektórych widoczny jest śluz (strzałki). Mucikarmin. Pow. 400 ×

Fig. 6. Vacuolated cells resembling signet ring cells. Some cells filled with mucus (arrows). Mucicarmin. × 400

przypominał czasami splot naczyńiówkowy. Miejscami widoczne były komórki z obkurczonymi, nadmiernie barwliwymi jądrami, komórki wielojądrzaste oraz komórki olbrzymie. Bardzo liczne były patologiczne mitozy (ryc. 4). Wiele komórek wykazywało pojedyncze lub mnogie małe wodniczki (ryc. 5). Czasem pojedyncze wodniczki rozpychały ciało komórki przesuując na obwód spłaszczone jądro. Taki obraz przypominał komórki „sygnetowate” (ryc. 6). Zawartość wodniczek wybarwiała się niekiedy mucikarminem (ryc. 6) i błękitem alcjanu. Guz zawierał

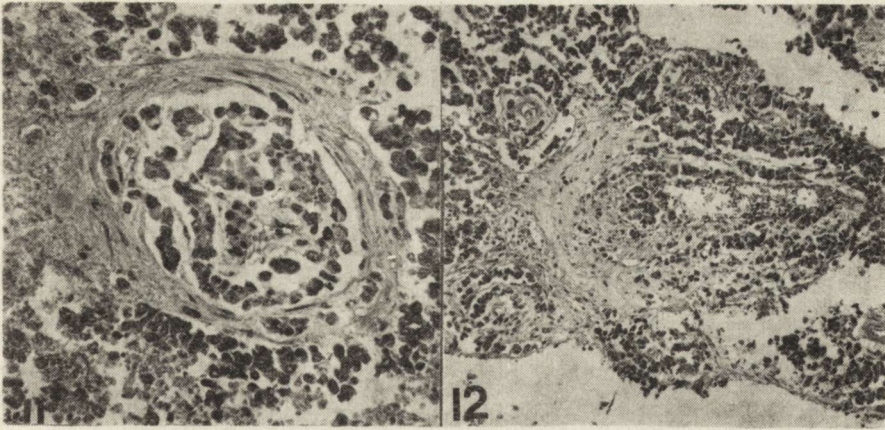


Ryc. 7. Naciek nowotworowy w powrózku i korzeniu przednim C₈. H—E. Pow. 100 ×
 Fig. 7. Neoplastic infiltration in anterior funiculus and ventral root C₈. H—E. × 100

Ryc. 8. Naciek nowotworowy w powrózku i korzeniu przednim L₅. H—E. Pow. 100 ×
 Fig. 8. Neoplastic infiltration in anterior funiculus and ventral root L₅. H—E. × 100

Ryc. 9. Naciek nowotworowy w korzeniu tylnym L₅. H—E. Pow. 200 ×
 Fig. 9. Neoplastic infiltration in dorsal root L₅. H—E. × 200

Ryc. 10. Mitoza w komórce nowotworowej w korzeniu tylnym S₃. (strzałka). Elektronogram. × 1800
 Fig. 10. Mitotic figure (arrow) in tumor cell in dorsal root S₃. Electron micrograph. × 1800

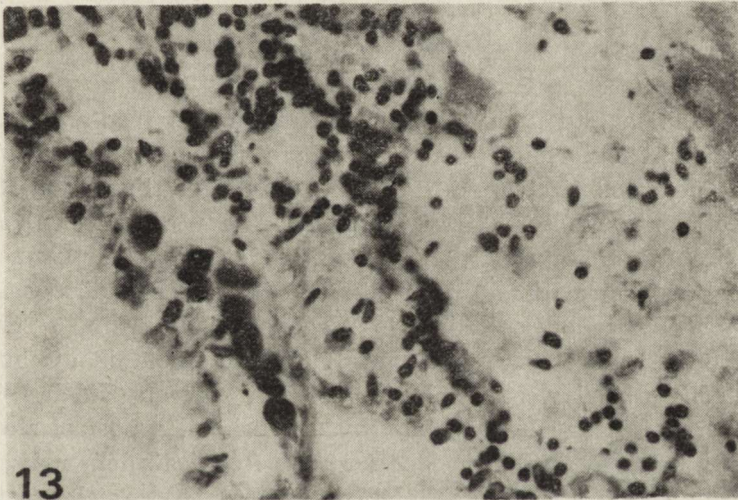


Ryc. 11. Liczne komórki nowotworowe w świetle tętnicy w ognisku przerzutowym.
H—E. Pow. 200 ×

Fig. 11. Numerous tumor cells in arterial lumen in metastatic focus. H—E. × 200

Ryc. 12. Liczne komórki nowotworowe w świetle żyły w ognisku przerzutowym.
H—E. Pow. 200 ×

Fig. 12. Numerous tumor cells in venous lumen in metastatic focus. H—E. × 200



Ryc. 13. Naciek limfocytarny oraz nieliczne komórki nowotworowe w oponie okolicy
L₅. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 13. Lymphocytic infiltration and few tumor cells in subarachnoid space in
region L₅. H—E. × 400

liczne naczynia o zgrubiałych, homogennych ścianach oraz bogatą sieć naczyń bardzo małego kalibru.

W ogniskach przerzutowych widoczne były obszary martwicy (ryc. 3). Wokół mniejszych z nich, a także w otoczeniu części naczyń obserwowano rozetowate układy komórek nowotworowych. Naciek nowotworowy obecny był miejscami pod pajęczynówką półkul mózgowych, pnia mózgu i rdzenia kręgowego, w korzeniach przednich (ryc. 7, 8) i tylnych (ryc. 9, 10). Światło niektórych naczyń tętnicznych (ryc. 11) i żylnych

(ryc. 12) wypełnione było komórkami nowotworowymi. Niekiedy widoczne były okołonaczyniowe w utkaniu guza (ryc. 3) i rozproszone w przestrzeni podpajęczynówkowej nacieki limfocytarne (ryc. 13). Barwienie metodą van Gieson wykazało delikatne łącznotkankowe włókna w podścielisku nowotworu. Włókien glejowych oraz śluzu w podścielisku nie stwierdzono. W impregnacji srebrzej nie uwidoczniiono rzęsek i ciał podstawnych.

Ocena guzków pobranych z korzenia przedniego L₅ oraz tylnego S₃ wykazała nacieki nowotworowy o cechach opisanych powyżej, jedynie w guzku z korzenia przedniego L₅ obficie występowały włókna tkanki łącznej, komórek nowotworowych było dość mało, a włókien nerwowych nie stwierdzono. Na podstawie obrazu mikroskopowego rozpoznano *Papilloma malignum plexus chorioidei*.

W badaniu mikroskopowo-elektronowym nerw łokciowy nie wykazał zmian. W korzeniach rdzeniowych obecne były jedynie nieliczne włókna mielinowe. W wielu komórkach nowotworowych widoczne były wodniczki i mitozy (ryc. 10). Rzęsek oraz ciał podstawnych nie stwierdzono.

OMÓWIENIE

Brodawczaki spłotu naczyniówkowego są guzami rzadkimi. Kernohan (1971) w dużym materiale nie stwierdził ani jednego przypadku. W komorze bocznej zlokalizowane są głównie u dzieci (Friedman, Soloman 1936), natomiast w komorze III i IV przeważają u dorosłych (Kahn, Luros 1952; Bohme, Strang 1961). Złośliwe brodawczaki spłotu naczyniówkowego są jeszcze radsze, w materiale niektórych autorów stanowią około 1/9 brodawczaków spłotu (Van Wagenen 1930). Mimo że Światowa Organizacja Zdrowia wyodrębniła w 1976 r. w klasyfikacji guzów łagodne i złośliwe brodawczaki spłotu naczyniówkowego (Zülch 1976), niektórzy autorzy zaliczają te guzy do wyściółczaków, a postaci złośliwe — do wyściółczaków IV^o (Slooff, Slooff 1975). Różnica zdań związana jest ze stwierdzeniem w mikroskopie elektronowym rzęsek, ciał podstawnych i kosmków zarówno w komórkach spłotu naczyniówkowego, jak i komórkach wyściółki (Peters i wsp. 1976).

Cechami charakterystycznymi odróżniającymi brodawczaki spłotu naczyniówkowego od wyściółczaków brodawkowatych jest obecność w komórkach brodawczaka wodniczek, zawierających często śluz, barwiący się mucikarminem i błękitem alcjanowym.

Podścielisko brodawczaków utworzone jest podobnie jak w naszym przypadku z delikatnych włókien łącznotkankowych i naczyń, nie zawiera natomiast śluzu i włókien glejowych (Turner, Simon 1937, Kernohan 1971). Cechy nowotworu w naszym przypadku odpowiadają więc kryteriom rozpoznawczym brodawczaka złośliwego. Większe trudności

nasuwa różnicowanie z gruczolakorakiem, którego obraz histologiczny może być bardzo podobny. Nie stwierdzono jednak nowotworu w narządach wewnętrznych, a ząchylek komory IV wydawał się miejscem pierwotnego ogniska nowotworowego złośliwego brodawczaka splotu naczyniówkowego.

W opisanym przypadku nie znaleziono rzęsek i ciał podstawnych. Wynika to, prawdopodobnie, z niedojrzałości komórek nowotworu wykazującego liczne cechy anaplazji. Rzęski i ciała podstawne stanowią, wydaje się, organelle całkowicie zróżnicowanej i dojrzałej komórki. Mniej istotną przyczyną braku tych organeli może być ocena mikroskopowo-elektronowa materiału utrwalonego w formalinie.

Stwierdzone przez nas liczne przerzuty nowotworu ilustrują możliwość rozsiewu brodawczaków, zwłaszcza złośliwych, drogą płynu mózgowo-rdzeniowego do opon miękkich i przestrzeni podpajęczynówkowej (Russel, Rubinstein 1963) oraz do każdej części osi mózgowo-rdzeniowej (Turner, Simon 1937). Możliwość przerzutów poza układ nerwowy (Russel, Rubinstein 1963) potwierdza w naszym przypadku obecność licznych komórek nowotworowych w świetle naczyń tętnicznych i żylnych. Lokalizacja nacieków nowotworowych w korzeniach rdzenia kręgowego i w ogonie końskim, imitująca chorobę Recklinghausena, spowodowała wystąpienie bezbólowego zespołu klinicznego, traktowanego przez klinycystów jako polineuropatia G—B. Przedstawiony przypadek nie jest pod tym względem odosobniony. Nerwiak okolicy ogona końskiego może imitować strzałkowy zanik mięśni (Stroińska i wsp. 1981; Roohi i wsp. 1982). Zna-ne są też przypadki bezbólowego przebiegu nerwiaków, nerwiakowłókniaków (Roohi i wsp. 1982) i chłoniaków (Karp i wsp. 1984) ogona końskiego. Nie potrafimy wytłumaczyć tego zjawiska, zwłaszcza w świetle mas-ywnych nacieków nowotworowych w licznych korzeniach tylnych rdzenia kręgowego i ogona końskiego.

Powstaje pytanie, czy wnikliwa analiza kliniczna pewnych drobnych, nietypowych dla zespołu G—B, objawów mogła zapobiec pomyłce diagnostycznej? W omówieniu tego zagadnienia uwzględnić należy następujące elementy:

1. W zespole G—B bardzo rzadko stwierdzana jest głuchota. Opisany jest jednakże przypadek z zajęciem n. VIII (Wiederholt i wsp. 1964).
2. Dyskusyjne jest zagadnienie narastania zawartości komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obecność limfocytów w osadzie mieści się jednak w zespole G—B (Guillain—Barré Syndrome Study Group, 1985). W opisanym przypadku okołozylne nacieki limfocytarne widoczne były w okolicy tkanki nowotworowej różnie zlokalizowanych przerzutów.
3. Niecharakterystyczne dla zespołu G—B było również niewielkie zwolnienie przewodzenia w badanych korzeniach rdzeniowych oraz brak zwolnienia w odcinkach odsiebnych niektórych nerwów obwodowych. Różnice szybkości przewodzenia w odcinkach odsiebnych i ksobnych nerwu

spotyka się jedynie w początkowym okresie choroby, z tym że zwolnienie przewodzenia w odcinkach kšobnych jest znacznie większe.

4. Niezbyt charakterystyczne są te zmiany aksonalne w nerwie łyd-kowym: ubytek włókien i odsetek włókien ze zwyrodnieniem aksonalnym. Zmiany takie obserwowane są jednak niekiedy w biopsjach nerwu w zespole G—B i w pracach doświadczalnych (Madrid, Wiśniewski 1977).

5. Przebieg zespołu G—B może być bardzo różny. Jednakże niektórzy autorzy (Barron 1985) uważają, że nagłe pogorszenie stanu klinicznego po wielu tygodniach choroby nie jest charakterystyczne dla tego zespołu.

Powyższy przypadek nakazuje ostrożność w rozpoznawaniu zespołu G—B, nawet przy zbliżonym do typowego obrazie klinicznym choroby. Wszelkie, nawet drobne wątpliwości wymagają wyłączenia choroby nowotworowej i rozsiewu nowotworu do opon miękkich oraz przestrzeni podpajęczynówkowej kanału kręgowego. Badanie płynu m-r. wykazuje niekiedy obecność komórek nowotworowych. Wyłączyć też należy układowy proces zapalny naczyń, w przebiegu którego patomechanizm objawów polineuropatycznych może być bardzo różny. Najistotniejszym kryterium diagnostycznym w zespole G—B jest, jak się wydaje, wynik badania elektrofizjologicznego oraz przebieg kliniczny choroby.

GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME PRODUCED BY MALIGNANT PLEXUS PAPILLOMA

Summary

The authors describe a case of a 62-year-old man with clinical features of flaccid paraplegia of legs, bulbar nerve palsy and hypoacusis. There was sensory disturbance in the "gloves" and "stockings" distribution. CSF protein level was elevated: 212 mg⁰%, number of cell count: 32. Electrophysiological examination revealed denervation of muscles and moderate slowing of motor and sensory conduction velocity in upper and lower limbs. G—B—S syndrome was diagnosed. The clinical condition worsened progressively: the patient died ten weeks from the onset of the disease. At autopsy in the brain clearly delineated foci resembling metastases were visible. At the cauda equina numerous nodules imitating Recklinghausen's disease were observed. Malignant plexus papilloma was demonstrated in the microscopic examination.

PAPILLOMA MALIGNUM PLEXUS CHORIOIDEI ИМИТИРУЮЩИЙ СИНДРОМ GUILLAIN-BARRÉ-STROHL'A (G-B-S)

Резюме

Описан случай 62-летнего больного с клиническими симптомами вялого паралича нижних конечностей, периферическим парезом VII нерва, парезом бульбарных нервов и понижением слуха. В дистальных частях верхних и нижних конечностей были обнаружены чувствительные расстройства. В спинно-мозговой жидкости количество белка было повышено до 212 мг/%, а количество лимфоцитов — до 32.

Электрофизиологическое исследование выявило денервацию мышц и умеренное замедление скорости проведения в двигательных и чувствительных нервах верхних и нижних конечностей. Поставлено диагноз синдрома G—B—S. Клиническое состояние больного постепенно ухудшалось, больной умер 10 недель от начала болезни.

Секционное исследование мозга обнаружило отчетливо отграниченные от окружающих тканей очаги напоминающие метастазы. В cauda equina были найдены многочисленные узелки имитирующие болезнь Recklinghausen'a. Гистопатологическое исследование выявило Papilloma malignum plexus chorioidei.

PIŚMIENNICTWO

1. Barron K. D.: — doniesienie osobiste, 1985.
2. Bohm E., Strang R.: Choroid plexus papillomas. *J. Neurosurg.*, 1961, 18, 493—500.
3. Friedman J. J., Soloman C. J.: Tumors of the choroid plexus in childhood. *Am. J. Dis. Child.*, 1936, 52, 115—127.
4. Kahn E. A., Luros J. T.: Hydrocephalus from overproduction of cerebrospinal fluid (and experiences with other papillomas of the choroid plexus). *J. Neurosurg.*, 1952, 9, 59—67.
5. Karp S. J., Souhami R. L., Hoffbrand B. J.: Cauda equina compression — an uncommon presentation of diffuse lymphocytic lymphoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1984, 47, 653.
6. Kernohan J. W.: Ependymomas. W: *Pathology of the nervous system*. Red.: J. Minckler. Mc Graw-Hill Comp. New York, 1971, 2, 1976—1993.
7. Lubińska L.: Method of isolation of peripheral nerve fibres for quantitative morphological purposes. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1960, 8, 117—120.
8. Madrid R. E., Wiśniewski H. M.: Axonal degeneration in demyelinating disorders. *J. Neurocytol.*, 1977, 6, 103—117.
9. Peters A., Palay S., Webster H. de F.: *The fine structure of the nervous system*. W. B. Sanders. Philadelphia, 1976, pp. 264—294.
10. The Guillain-Barré Syndrome Study Group: Plasmapheresis and acute G—B syndrome. *Neurology*, 1985, 35, 8, 1096—1104.
11. Roohi F., Cook A. W., Clarke H., Torne R., Zandich M.: Painless cauda equina Schwannoma simulating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1982, 45, 938.
12. Russel D. S., Rubinstein L. J.: *Pathology of tumors of the nervous system*. E. Arnold. London, 1963, pp. 14—26.
13. Slooff A. C. J., Slooff J. L.: Supratentorial tumors in children. W: *Handbook of Clinical Neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Elsevier. Amsterdam, 1975, 18, pp. 305—386.
14. Stroińska B., Strugalska H., Emeryk B.: Guz rdzenia naśladowujący chorobę Charcot-Marie-Tooth. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1981, 15, 185—189.
15. Turner C. A., Simon M. A.: Malignant papillomas of the choroid plexus. Report of two cases with review of the literature. *Amer. J. Cancer*, 1937, 30, 289—297.
16. Wegenen Van 1930, cyt. wg Turnera C. A. i Simona M. A. (poz. 15).
17. Wiederholt W. C., Mulder D. W., Lampert E. H.: The Landry-Guillain-Barré-Strohl syndrome or polyradiculoneuropathy: historical review, report on 97 patients, and present concepts. *Mayo Clin. Proc.*, 1964, 29, 427—438.
18. Zülch K. J.: *Histological typing of tumours of the Central Nervous System*. World Health Organization, Geneva, 1979.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1A.

HALINA KROH

MENINGIOMA WITH PSEUDOPAPILLARY PATTERN.
CASE REPORT

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

Since the first description by Cushing and Eisenhardt (1938) of cerebral meningioma which after many recurrences displayed ante finem fields of unusual papillary pattern, the number of such tumors is slowly growing. After the last review of Pasquier et al. (1986) the group consists presently of 46 cases but with the omitted case of Ramsey et al. (1980), five case of Røyttä et al. (1982), one of Kochanek et al. (1986) and one of Piatt et al. (1986) — a total of 54 cases. This group of tumors is believed to differ from other meningiomas, besides their unusual pattern, also by their clinical course and postoperative aggression.

Report of the present 55th case is intended not only to depict a still uncommon histological variant, but to stress its lenient clinical course.

CASE REPORT

Clinical history

A 44-year-old female I.K. reported to the Neurosurgery Department (No. 27/84) of our Institute, with headaches of 10 years duration, slight balance disturbance, dizziness, and after two short incidents of loss of consciousness two weeks prior to admission. There were no neurological signs but mild, bilateral papilledema and focal, fronto-temporal EEG changes on the left. CT and carotid angiography showed a large, left-sided frontal tumor supplied by a. carotis externa. The tumor involved also a sclerotized inner table of the frontal bone. At craniotomy an encapsulated, firm, smooth-surface extracerebral tumor was removed totally in one lump. The attachment of the tumor to the dura mater was excised and its adhesion to the falx was coagulated. The postoperative course was uneventful. Presently, 3.5 years after extirpation of tumor the patient is well, under the care of the outpatient clinic.

Gross pathological findings

The surgical specimen was whitish, firm, elastic, fibrous, of $4.0 \times 4.0 \times 5.0$ cm dimensions (Fig. 1). Its weight was 35 g (both data after formalin fixation).



Fig. 1. Tumor with attached dura mater. Natural size
Ryc. 1. Guz z przylegającą oponą twardą. Wielkość naturalna

Microscopic examination

The specimen was fixed in formalin, embedded in paraffin, sections stained with hematoxylin-eosin, with mucicarmin, van Gieson, Gridley for reticulin, with PTAH and Masson's trichrome, and Oil Red.

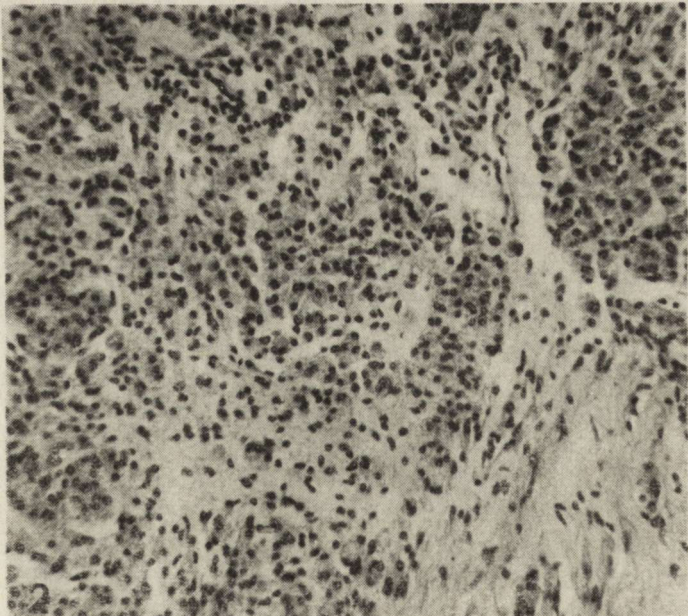


Fig. 2. Meningeothelial part of the meningioma. H—E. $\times 200$
Ryc. 2. Meningotelialna część oponiaka. H—E. Pow. $200 \times$

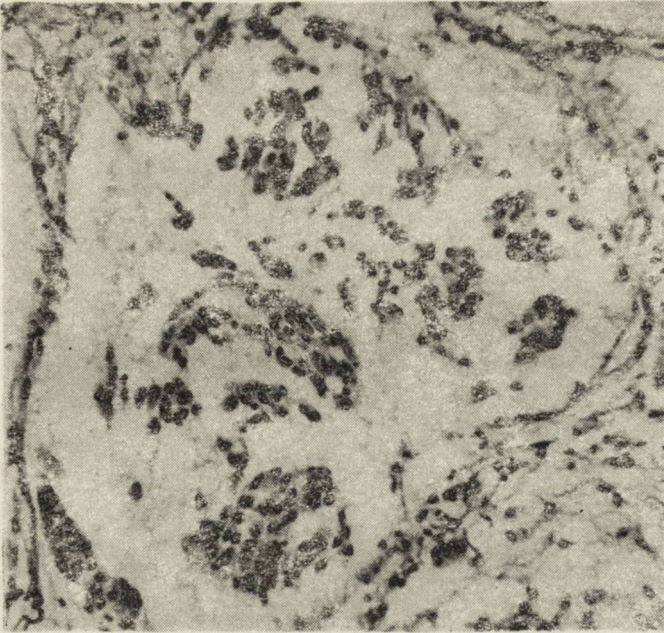


Fig. 3. Alveolar field. Pseudopapillary groups of cells among degenerated neoplastic tissue. H—E. $\times 200$

Ryc. 3. Pseudobrodawkowe grupy komórek wśród zwyrodniałej tkanki guza. H—E. Pow. $200 \times$

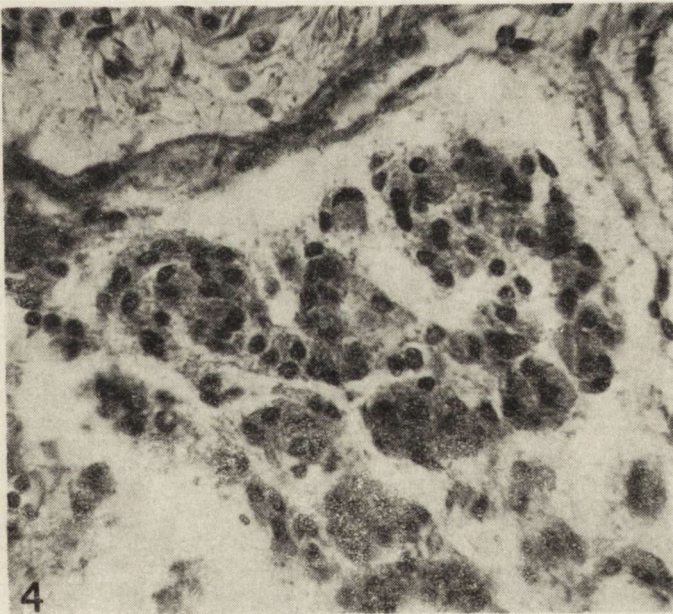


Fig. 4. Pseudopapillary structure in rarefied degenerated tissue. Trichrome. $\times 400$

Ryc. 4. Struktury pseudobrodawkowe w luźnej, zwyrodniałej tkance guza. Met. trójbarwna Massona. Pow. $400 \times$

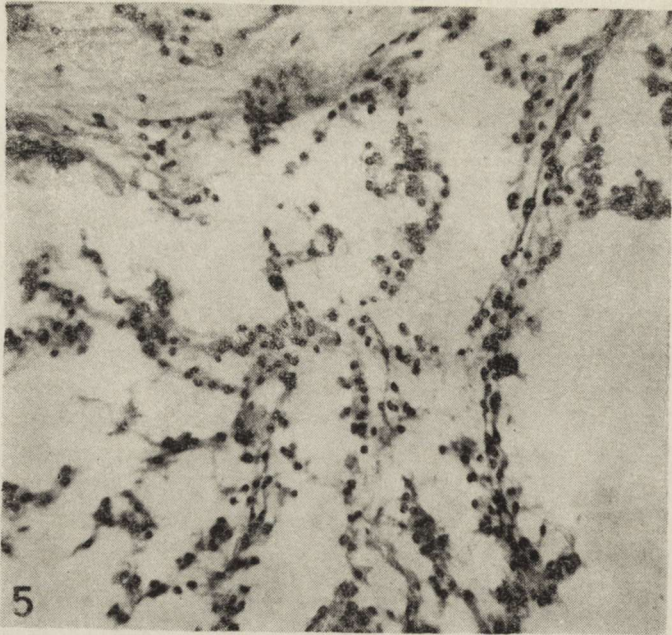


Fig. 5. Pseudopapillary bands of neoplastic cells adhering to thin fibrovascular cords of tissue. H—E. $\times 200$

Ryc. 5. Pseudobrodawkowe pasma komórek nowotworowych przylegających do cienkich sznurów naczyniowo-łącznotkankowych. H—E. Pow. $200 \times$

The central area of the tumor was composed of irregular, large sheets of syncytial cells divided by septa of connective tissue, very rich in collagen and reticulin fibres (Fig. 2). There was no tendency to whorl formation. The nuclei were of medium size, round or oval, some contained eosinophilic inclusions. Mitotic divisions were not observed. Towards the periphery the tumor's structure became looser and alveolar (Fig. 3). Within the alveolar fields upon the empty background with rests of eosinophilic amorphous substance there were thin reticulin fibres with adhering in grape-like manner (Fig. 4), meningothelial cells. The vascular component was limited to thin-walled sinusoidal vessels. In the septa of connective tissue and in the tumor capsule they were of large diameter, whereas among the syncytial fields and within the alveolar structures their number was scarce (Fig. 5). Psammoma bodies, necrotic and hemorrhagic foci were not observed.

DISCUSSION

The presented case confirms Kepes' (1982) opinion that "variations of histological patterns in meningiomas are almost endless", and to a lesser degree demonstrates variations in the clinical course displayed by papillary meningiomas. The histological difference from the majority of published cases is the lack of anaplastic features predominant in pri-

mary tumors of larger series (Ludwin et al. 1975; Røyttä et al. 1982; Brignolio, Favero 1984; Pasquier et al. 1986), so one can doubt whether the growth presenting only a tendency to a papillary pattern without other signs of anaplasia can be classified to papillary type. Besides, the tumor represents the second, rare subtype of papillary variety, characterized by cores of fibro-vascular stroma covered with rows of cells, the variant associated rather with epitheloid meningioma as postulated by Stefanko and Mackay (1981) than with the more common perithelial form in which perivascular, radial cellular arrangement is displayed in otherwise typical syncytial tissue. The relationship of two subtypes as two stages in formation of the papillary pattern is not clear. The scarcity of vessels, as observed in the present case may contribute to pseudopapillary formations in large alveolar degenerative structures around fibro-vascular cores, a phenomenon due possibly to dissolution of peripheral cells. In general, the papillary pattern is only rarely predominant in the reviewed cases (Pasquier et al. 1986), but then the pattern is associated with typical meningioma structures. Association of such pattern with an unusual variant of meningioma is exceptional (Kepes et al. 1983). Sometimes, without unfolding in primary tumors, the papillary pattern develops only in recurrent or metastatic foci (Cushing, Eisenhardt 1938; Kepes et al. 1971; Miller, Ramsden 1972; Ludwin, Corley 1975).

The clinical course also differs from the events reported by other authors. Ten-year-long development of neurological impairment is comparable only to the six-year-long preoperative history reported by Cushing and Eisenhardt (1938), contrary to the usual rapid development of neurological symptoms within one year (Brignolio, Favero 1984). As to the postoperative course, up till now, three years after extirpation of the tumor, there is no sign of local recurrences which are most common in the published cases, some of them being reoperated even 16 years after removal of the primary lesion (Ludwin et al. 1975). There are verified 16 cases with known postoperative history which have exhibited neither local recurrence nor distant metastases (5 cases of Stefanko, Mackay 1981; 5 of Ludwin et al. 1975; 2 of Brignolio, Favero 1984; 2 of Inoue et al. 1984; 2 of Pasquier et al. 1986). Postoperative follow up of these patients ranges from 2 months to 22 years, but only 11 patients are observed, as our patient, over 3 years, a long period for patients presenting tumors known for their histological anaplasia and clinical malignancy. In spite of statements favoring a bad outcome for patients with papillary meningioma (Ludwin et al. 1975; Røyttä et al. 1982; Brignolio, Favero 1984), some authors do not consider the papillary pattern itself as an expression of anaplasia, without other signs of histological malignancy (Stefanko, Mackay 1981; Inoue et al. 1984). It seems that the present case confirms such an opinion, both histologically and clinically.

OPONIAK PSEUDOBRODAWKOWY. OPIS PRZYPADKU

Streszczenie

Opis dotyczy 44-letniej kobiety o 10-letnim przebiegu objawów przedoperacyjnych, która powróciła do zdrowia po 3,5 latach po doszczętnym usunięciu przyszczałkowego oponiaka czołowego. Oponiak ten, o przeważającej budowie typu zespólnowego, odznaczał się dużymi polami zwyrodniałej tkanki, w której wśród resztek amorficznego materiału występowały wąskie pasma tkanki włóknistej z nielicznymi cienkościennymi naczyniami. Do pasm tych przylegały komórki tworząc obraz małych brodawek. Nie obserwowano oznak anaplazji poza umiarkowanym polimorfizmem.

Obserwowane struktury pseudobrodawkowe reprezentują drugi wariant tego typu budowy, który może powstać na skutek wazotropizmu komórkowego i zwyrodnienia komórek leżących obwodowo w stosunku do naczyń (Stefanko, Mackay 1981). W przeciwieństwie do panującej opinii o oponiakach brodawkowych, przypadek nie świadczy ani o złośliwości klinicznej, ani histologicznej tego typu nowotworu i należy do nielicznych (12), w których obserwowano przeżycie ponad 3 lata spośród 55 opublikowanych przypadków.

СЛУЧАЙ ПСЕВДОПАПИЛЛЯРНОЙ МЕНИНГИОМЫ

Резюме

Описана 44-летняя женщина с 10-летним периодом передоперационных симптомов которая стала здорова 3,5 года после радикального удаления парасчитальной фронтальной менингиомы. Менингиома, с преобладающей синцитиальной структурой, отличалась большими очагами дегенерированной ткани. В этой ткани, среди остатков аморфического материала появлялись узкие полосы фиброзной ткани с немногочисленными тонкостенными сосудами. К полосам прилегали клетки и создавали картину маленьких сосков. Кроме умеренного полиморфизма анаплазия не наблюдалась.

Наблюдаемые псевдопапиллярные структуры представляющие второй вариант этого типа строения, могут возникать вследствие клеточного вазотропизма или дегенерации клеток расположенных периферически по отношению к сосудам (Stefanko, Mackay 1981). Противоположно существующему мнению насчет папиллярных менингиом, описанный случай не свидетельствует ни о клинической ни о гистологической злокачественности этого типа опухоли. Принадлежит он к немногочисленным (12) среди 55 опубликованных случаев в котором наблюдалось переживание свыше 3-х лет.

REFERENCES

1. Brignolio F., Favero M.: Considerations on the malignancy of papillary meningioma. *Zbl. Neurochir.*, 1984, 45, 79—84.
2. Cushing H., Eisenhardt L.: Meningiomas. Their classification, regional behaviour, life history, and surgical end results. Chapter XXXI. The case of Dorothy May Russel. Ch. Thomas, Springfield, Illinois, 1938, 692—719.
3. Inoue H., Tamura M., Koizumi H., Nakamura M., Naganuma H., Ohye Ch.: Clinical pathology of malignant meningiomas. *Acta Neurochir.*, 1984, 73, 179—191.
4. Kepes J.: Meningiomas. Biology, pathology and differential diagnosis. Masson Publ. 1982, 64—149.

5. Kepes J., Goldware S., Leoni R.: Meningioma with pseudogranular pattern. A case report. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1983, 42, 61—68.
6. Kepes J., MacGee E., Vergara G., Sil R.: Malignant meningioma with extensive pulmonary metastases. *J. Kansas Medical Soc.*, 1971, 72, 312—316.
7. Kochanek S., Schroder R., Firsching R.: Hemangiopericytoma of meninges. *Zbl. Neurochir.*, 1986, 47, 183—190.
8. Ludwin S., Conley F.: Malignant meningioma metastazing through the cerebrospinal pathways. *J. Neurol. Neurosurg., Psych.* 1975, 38, 136—142.
9. Ludwin S., Rubinstein L., Russel D.: Papillary meningioma: a malignant variant of meningioma. *Cancer*, 1975, 36, 1363—1373.
10. Miller A., Ramsden F.: Malignant meningioma with extracranial metastases and seeding of the subarachnoid space and the ventricles. *Path. Europ.*, 1972, 7, 167—175.
11. Pasquier B., Gasnier F., Pasquier D., Keddari E., Morens A., Condrec P.: Papillary meningioma. Clinicopathological study of seven cases and review of the literature. *Cancer*, 1986, 58, 299—305.
12. Piatt J., Campbell G., Oakes W.: Papillary meningioma involving the oculomotor nerve in an infant. Case report. *J. Neurosurg.*, 1986, 64, 808—812.
13. Ramsay R., Fredericks M., Crafts D., Smith K., Chung H.: Hydrolytic enzymes in meningiomal subtypes. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1980, 49, 63—65.
14. Røyttä M., Vällfors B., Svendsen P., Sourander P.: Recurrent meningiomas. A combined clinical, neuroradiological and neuropathological study. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* 90. 1982, 105—106.
15. Stefanko S., Mackay W.: Papillary meningioma. *Acta Neuropath. (Berl.)*, Suppl. VII. 1981, 126—128.

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

BARBARA GAJKOWSKA, BARBARA KOSICKA, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

ZMIANY STRUKTURALNE W OŚRODKOWYM UKŁADZIE
NERWOWYM U SZCZURA W WYNIKU ZATRUCIA
CHLORKIEM MANGANAWYM ($MnCl_2$)

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

Z patologii ludzkiej wiadomo, że zatrucie manganem prowadzi do wystąpienia objawów neurologicznych, przede wszystkim w postaci zespołu pozapiramidowego. W patologii doświadczalnej objawy neurologiczne po zatruciu manganem obserwowano jedynie sporadycznie. Do wyjątków pod tym względem należy doniesienie van Bogaerta i Dallemagne'a (1953) o zespole pozapiramidowym u małą poddawanych inhalacjom tlenkiem manganawym. W serii naszych doświadczeń z chlorkiem manganawym zespół pozapiramidowy uzyskano tylko u szczurów po podaniu $MnCl_2$ do tętnicy szyjnej wspólnej po uprzednim obustronnym podwiązaniu tych tętnic (Kosicka i wsp. 1985). W bezobjawowym modelu zatrucia manganem, podawanym dożylnie w 7 dawkach przez okres 28 dni, zmiany stwierdzone u zwierząt z 4-tygodniowym przeżyciem po zakończeniu zatrucia dotyczyły przede wszystkim istoty białej i miały charakter jej uogólnionego zgąbczenia (Śmiałek, Mossakowski 1981). Towarzyszyło im wybiórcze uszkodzenie neuronów istoty czarnej oraz niewielkie zmiany komórkowe rozsiane w korze mózgu, w zakręcie hipokampa, wzgórzu i innych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (oun). Przeprowadzone w tym samym modelu badania ultrastrukturalne, bezpośrednio po zakończeniu zatrucia i u szczurów z tygodniowym okresem przeżycia, nie potwierdziły wybiórczości uszkodzeń, wykazały tylko nieznaczne zmiany w strukturach szarych, narastające nieprawidłowości w istocie białej oraz ich dwufazowy charakter (Mossakowski i wsp. 1983; Dydyk, Mossakowski 1984). Skłoniło to nas do zastosowania innego modelu doświadczalnego, w którym szczury otrzymywały $MnCl_2$ w wodzie do picia. Bezpośrednim celem pracy było określenie charakteru uszkodzeń strukturalnych po zatruciu manganem z uwzględnieniem ich topograficznego zróżnicowania.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 20 szczurach rasy Wistar, samcach 6-tygodniowych w momencie zaczynania doświadczenia, o masie ciała około 160 g. Zwierzęta przez 8 tygodni zamiast wody otrzymywały do picia 0,8% wodny roztwór chlorku manganawego ($MnCl_2$). Grupę kontrolną stanowiły szczury w tym samym wieku pojone wodą, przetrzymywane przez okres doświadczenia w tych samych warunkach hodowlanych. Obie grupy zwierząt uśmiercano w następnym dniu po zakończeniu pojenia $MnCl_2$.

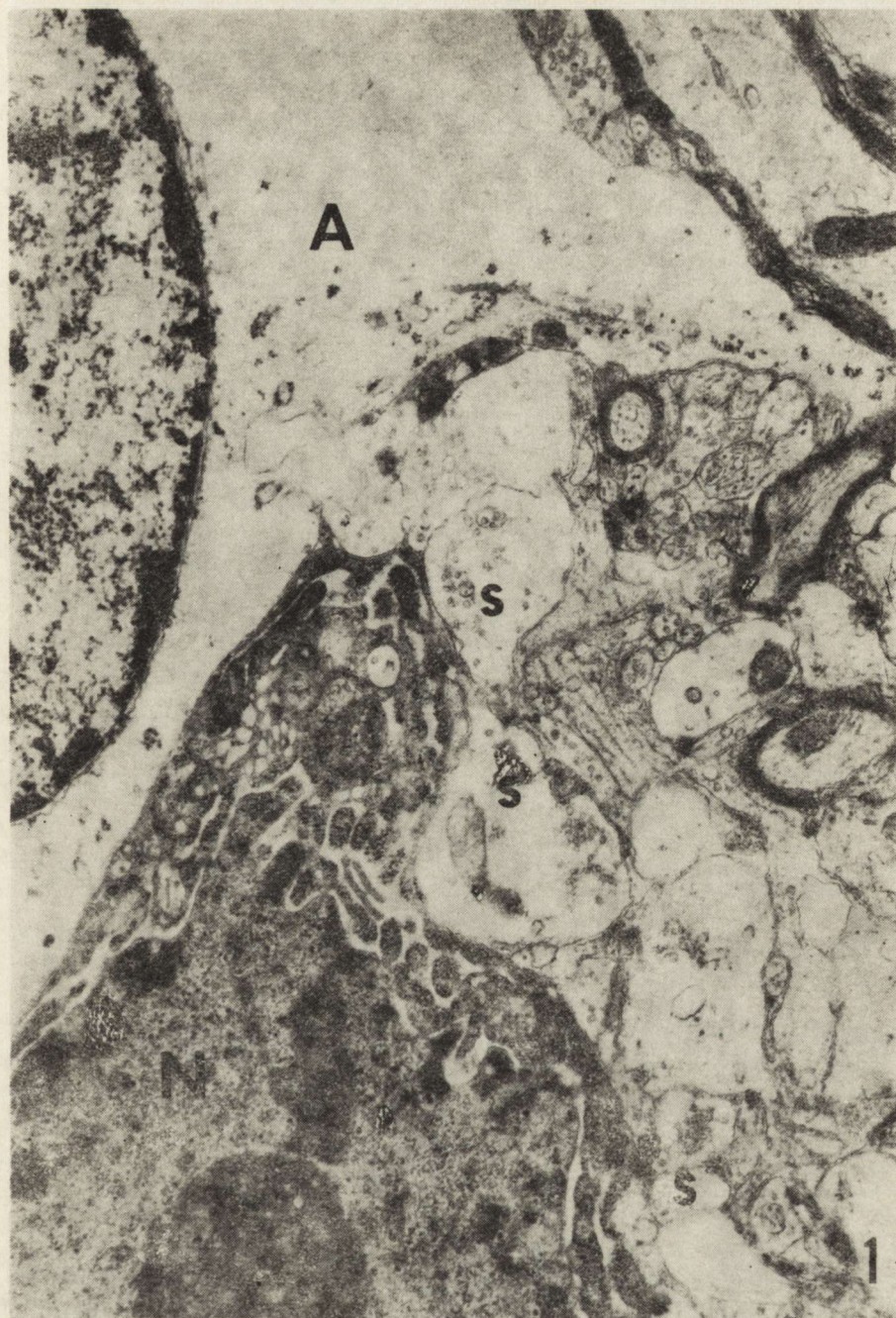
Zwierzęta przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym uśmiercano wykonując przezsercową perfuzję 10% zubożonym roztworem formaliny. Mózgowie po wyjęciu dotrwalano w płynie perfuzyjnym przez 48 godzin, a następnie krojono na bloki w płaszczyźnie czołowej i pobierano do badania skrawki na poziomie dobrze rozwiniętych zwojów podstawy oraz śródmózgowie. Bloki tkankowe przeprowadzano w sposób rutynowy do parafiny. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody Klüvera—Barrery.

Zwierzęta przeznaczone do badań mikroskopowo-elektronowych perfundowano 2,5% aldehydem glutarowym w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4. Po wyjęciu mózgowia pobierano wycinki z kory mózgu, zakrętu hipokampa, istoty czarnej i prądkowia. Bloki tkankowe dotrwalano przez 1 godz. w 2,5% aldehydzie glutarowym, następnie płukano w 0,1 M buforze kakodylanowym i utrwalano dodatkowo przez 1 godz. w 2% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym, odwadniano w sposób rutynowy i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki kontrastowano w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu. Posiłowano się mikroskopem elektronowym JEM 7A.

WYNIKI

Szczury pojone $MnCl_2$ nie wykazały objawów neurologicznych. Zaobserwowano jedynie zmatowienie sierści oraz obniżenie masy ciała o 8% w porównaniu ze szczurami grupy kontrolnej.

W mikroskopie świetlnym obserwowano niewielkie rozrzedzenie utkania w warstwie brzeżnej kory, natomiast w jej głębszych warstwach rozsiane nadbarwliwe neurony (neurony ciemne). Neurony prądkowia nie wykazywały wyraźnych cech uszkodzenia. W pęczkach włókien striopallidarnych widoczne były pojedyncze jamki. Wokół niektórych komórek glejowych i drobnych naczyń spostrzegano nieznacznie poszerzone przestrzenie. W rogu Amona obserwowano jedynie pojedyncze nadbarwliwe i obkurczone neurony. Nieliczne tego typu komórki znajdowano również w istocie czarnej, natomiast w układach przylegających do niej włókien widoczne było niewielkie rozrzedzenie struktury oraz pojedyncze jamki o nieregularnym kształcie.



Ryc. 1. Kora mózgu. Fragment astrocytu (A) o obrzmiałej cytoplazmie pozbawionej organelli oraz fragment „ciemnego” neuronu (N). Widoczne również synapsy (S) obrzmiałe ze skupieniem pęcherzyków synaptycznych. Pow. 12 750 ×

Fig. 1. Cerebral cortex. Fragment of astrocyte (A) with swollen cytoplasm devoid of cellular organelles and fragment of a dark neuron (N). Synapses (S) swollen with aggregates of synaptic vesicles are also seen. × 12 750



Ryc. 2. Kora mózgu. Fragment naczynia przedwłosowego o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. W komórkach śródbłónka zwiększona liczba pęcherzyków pinocytarnych. Przynaczyniowe wypustki astrogliu o obrzmiałej cytoplazmie ze znikomą ilością organelli. Pow. 12 450 ×

Fig. 2. Cerebral cortex. Fragment of precapillary blood vessel with normal ultrastructural features. Increased number of pinocytotic vesicles in endothelial cells. Perivascular astrocytic processes with remarkable cytoplasmic swelling and residual cellular organelles. × 12 450

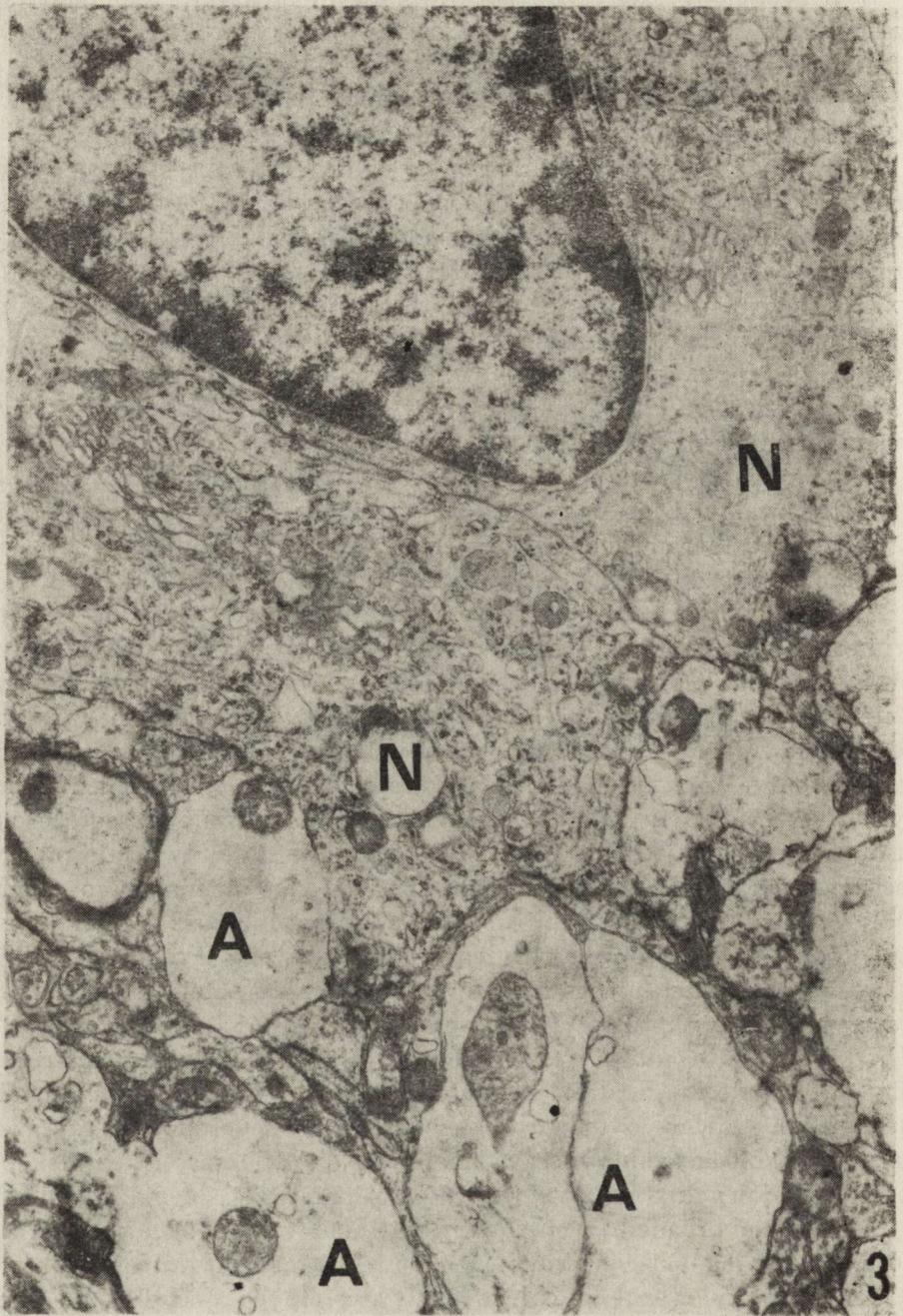
W badanych w mikroskopie elektronowym strukturach układu nerwowego zwierząt pojonnych $MnCl_2$ zaobserwowano szereg nieprawidłowości ultrastrukturalnych. W korze mózgu obserwowane sporadycznie zmiany dotyczyły komórek nerwowych i astrocytów. Obraz mikroskopowo-elektronowy oligodendrocytów nie odbiegał od stanu prawidłowego.

Większość obserwowanych neuronów wykazywała niezmienną ultrastrukturę. Spotykano jednakże tzw. neurony ciemne. Położone w ich sąsiedztwie zakończenia synaptyczne charakteryzowały się z reguły obrzmieniem aksoplazmy oraz obecnością niewielkiej ilości pęcherzyków synaptycznych, przeważnie bezładnie rozproszonych. W większości astrocytów obserwowano przejaśnienia cytoplazmy perikarionalnej i wypustkowej o zróżnicowanym nasileniu oraz zmniejszenie ilości struktur subkomórkowych (ryc. 1). Okołonaczyniowe wypustki astrocytarne były często obrzmiałe i całkowicie pozbawione organelli (ryc. 2).

W zakręcie hipokampa neurony nie wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalnych, jedynie niektóre astrocyty i ich wypustki przejawiały cechy umiarkowanego obrzmienia (ryc. 3). Rzadziej spotykano obrzmienie wypustek astrocytarnych wokół naczyń.

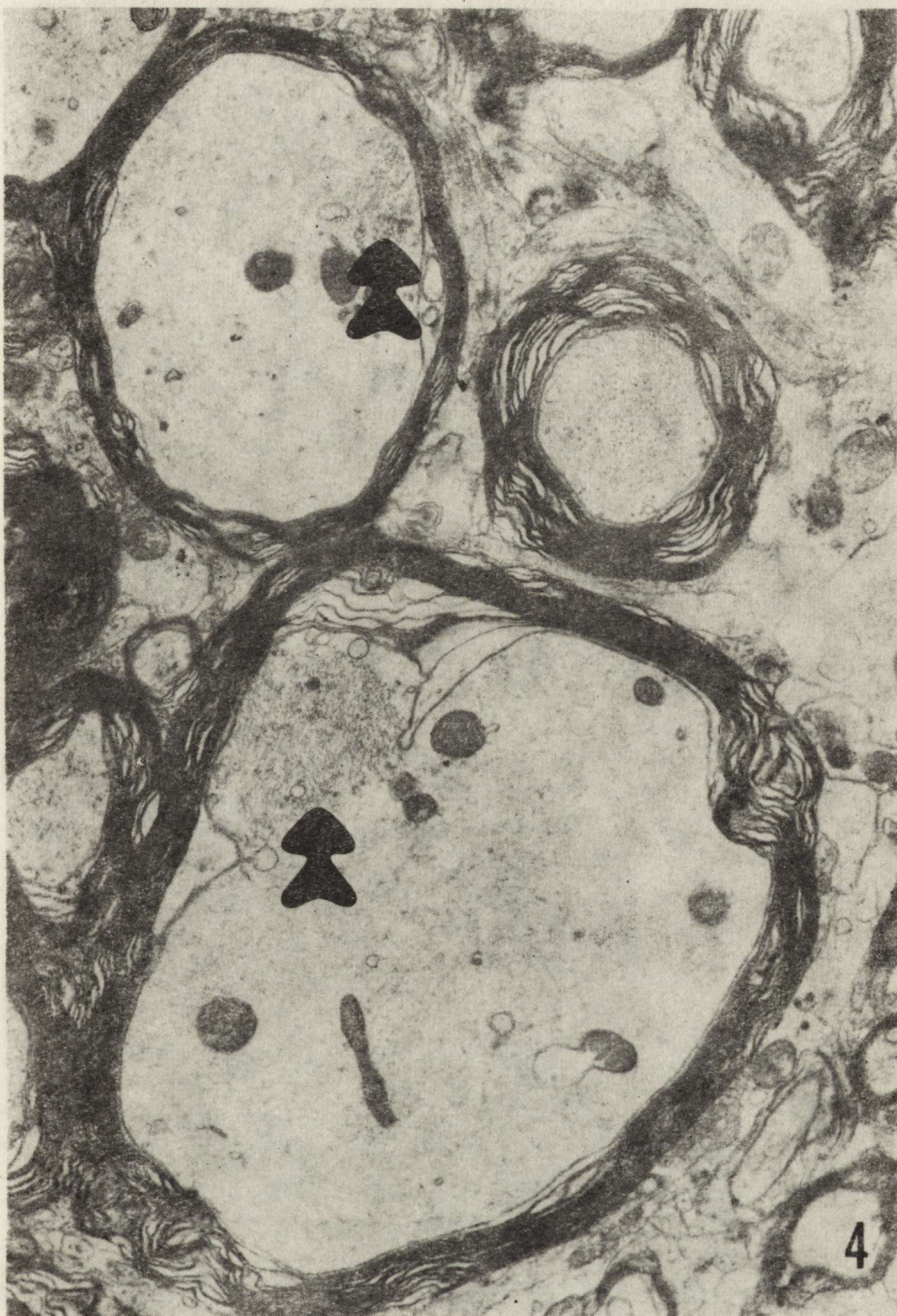
Badanie istoty czarnej ujawniło nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej niektórych zmielinizowanych włókien. Dotyczyły one zarówno samych aksonów, jak i osłonek mielinowych. Wiele aksonów charakteryzowało się obecnością elektronowo przezierną aksoplazmy z pojedynczymi małymi mitochondriami o skondensowanej macierzy oraz ogniskowo znaczną ilością struktur filamentarnych tworzących pęczki (ryc. 4). Obecne były też aksony o znacznie obkurczonej i zagęszczonej aksoplazmie, obfitujące w struktury filamentarne dość równomiernie rozmieszczone (ryc. 5). Wiele włókien miało osłonkę mielinową o nieprawidłowej budowie, z odcinkowo rozwarstwionymi lub posklejanymi blaszkami (ryc. 6). Obserwowano również włókna nerwowe z osłonkami o nieprawidłowym układzie blaszek tworzących owalne struktury o koncentrycznym układzie, pozostające przeważnie w łączności z osłonką (ryc. 7). Wśród zmielinizowanych włókien o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej większość wykazywała dość wyraźne poszerzenia przestrzeni okołoaksonalnych, zawartych między aksonem o jasnej lub ciemnej aksoplazmie i okołoaksonalną blaszką mielinową. W większości komórek oligodendroglejowych stwierdzano różnie nasilone przejaśnienia cytoplazmy z małą ilością organelli i obecnością wielkich wakuoli. Jądra tych komórek miały jednakże prawidłową budowę ultrastrukturalną. Większość neuronów istoty czarnej nie wykazywała istotnych odchyśleń od stanu prawidłowego, spotykano jednakże również neurony obkurczone „ciemne”, w pobliżu których obecne były komórki mikrogleju. Astrocyty z cechami obrzmienia cytoplazmy spotykano sporadycznie w neuropilu i wokół naczyń.

Obraz mikroskopowo-elektronowy prądkowia nie różnił się zasadni-



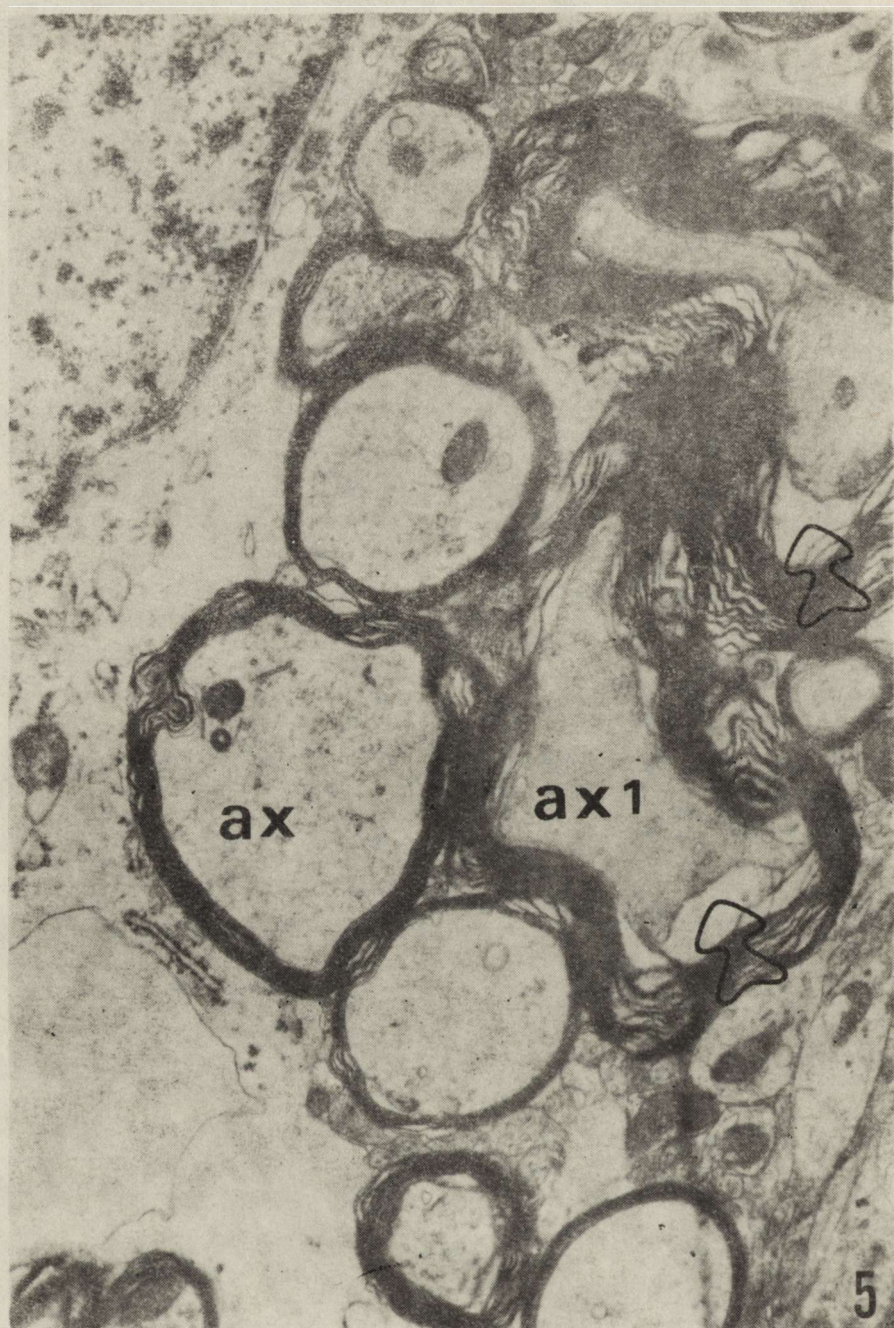
Ryc. 3. Zakręt hipokampa. Fragmenty neuronów (N) o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Wypustki astrocytów (A) o obrzmiałej cytoplazmie, prawie pozbawionej organelli. Pow. 12 450 ×

Fig. 3. Ammon's horn cortex. Fragments of neurons with entirely normal ultrastructural picture. Astrocytic processes (A) reveal cytoplasmic swelling and almost total lack of cellular organelles. × 12 450



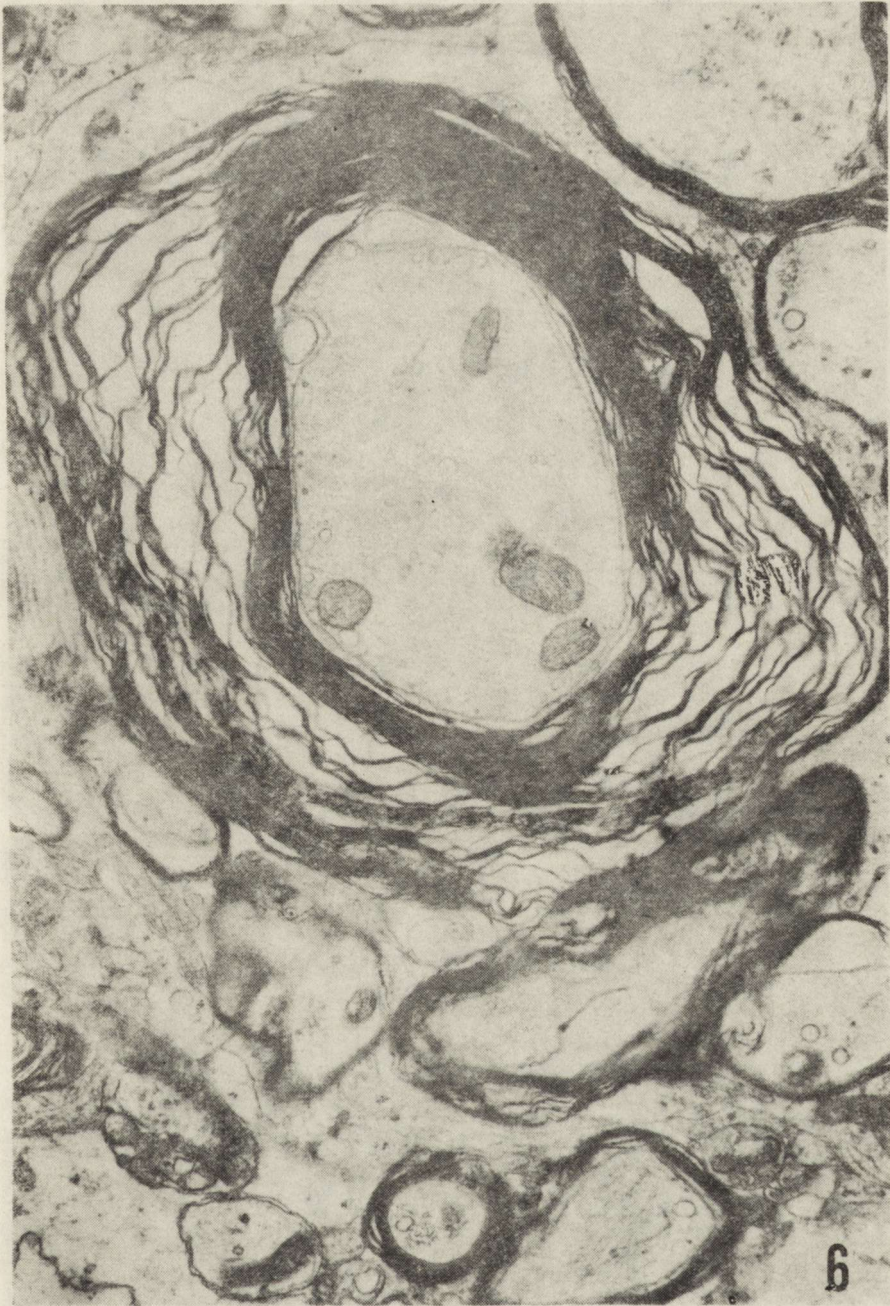
Ryc. 4. Istota czarna. Widoczne aksony z jasną aksoplazmą zawierającą znaczną ilość struktur filamentarnych (strzałki) i mitochondria o zagęszczonej macierzy lub częściowo obrzmiałe. Pow. 12 450 ×

Fig. 4. Substantia nigra. Axons with light cytoplasm containing increased amount of filamentous structures (arrows) and abnormal mitochondria with condensed matrix, some of them showing features of swelling. × 12 450



Ryc. 5. Istota czarna. Włókna nerwowe z aksonami o jasnej (ax) i ciemnej (ax₁) aksoplazmie. Poszerzone są również przestrzenie okołaksonalne (strzałki). Fragment oligodendrocytu z obrzmiłą cytoplazmą. Pow. 12 450 ×

Fig. 5. Substantia nigra. Axons with variable axoplasmic appearance: some of them with light (ax), other with condensed (ax₁) axoplasm. Periaxonal spaces dilated (arrows). Visible fragment of oligodendrocyte shows swollen cytoplasm. × 12 450

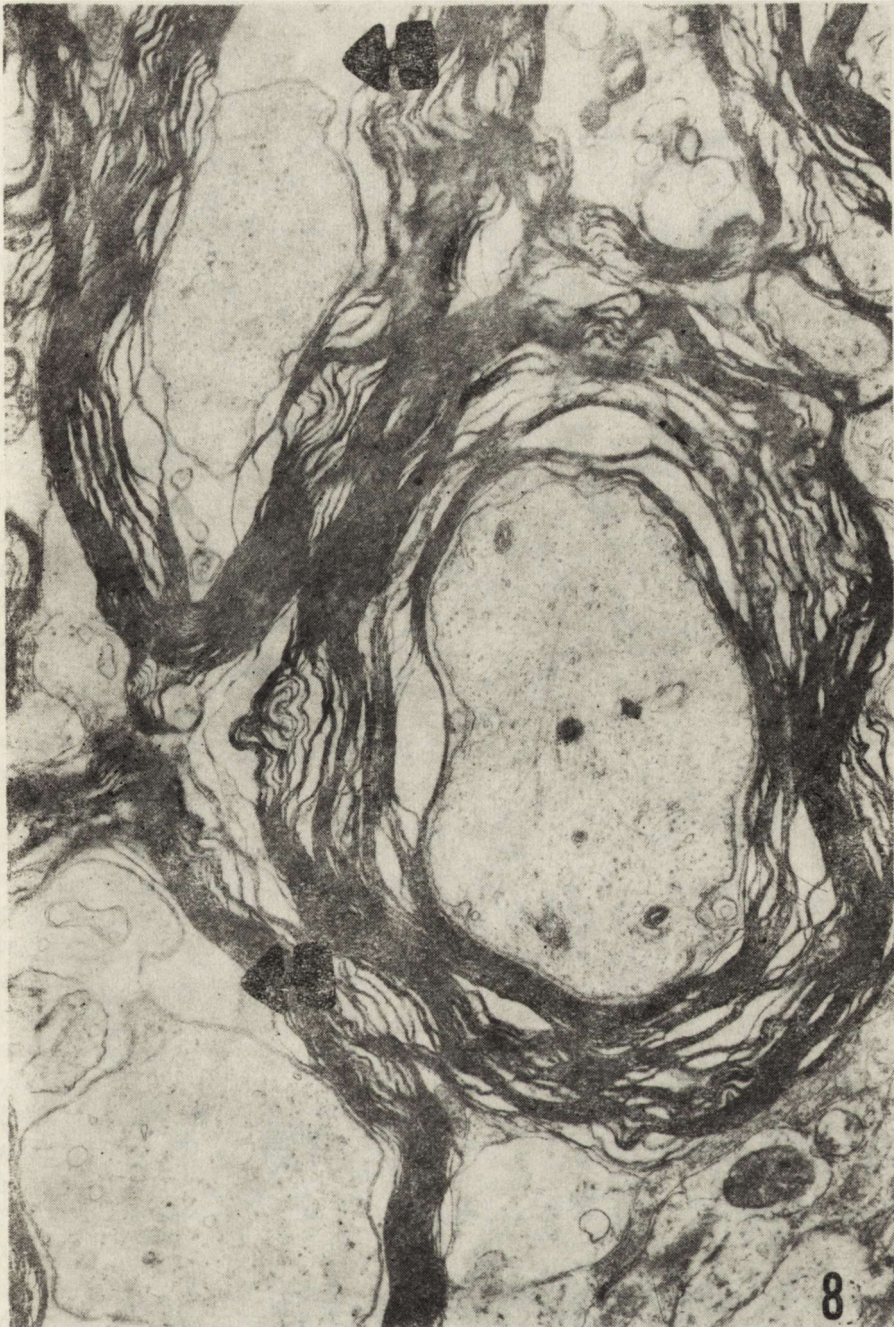


Ryc. 6. Istota czarna. Włókno nerwowe z aksonem o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej z odcinkowym rozwarstwieniem osłonki mielinowej. Pow. 12 450 ×
Fig. 6. Substantia nigra. Nerve fibre with normally appearing axon shows partial splitting of myelin sheath. × 12 450



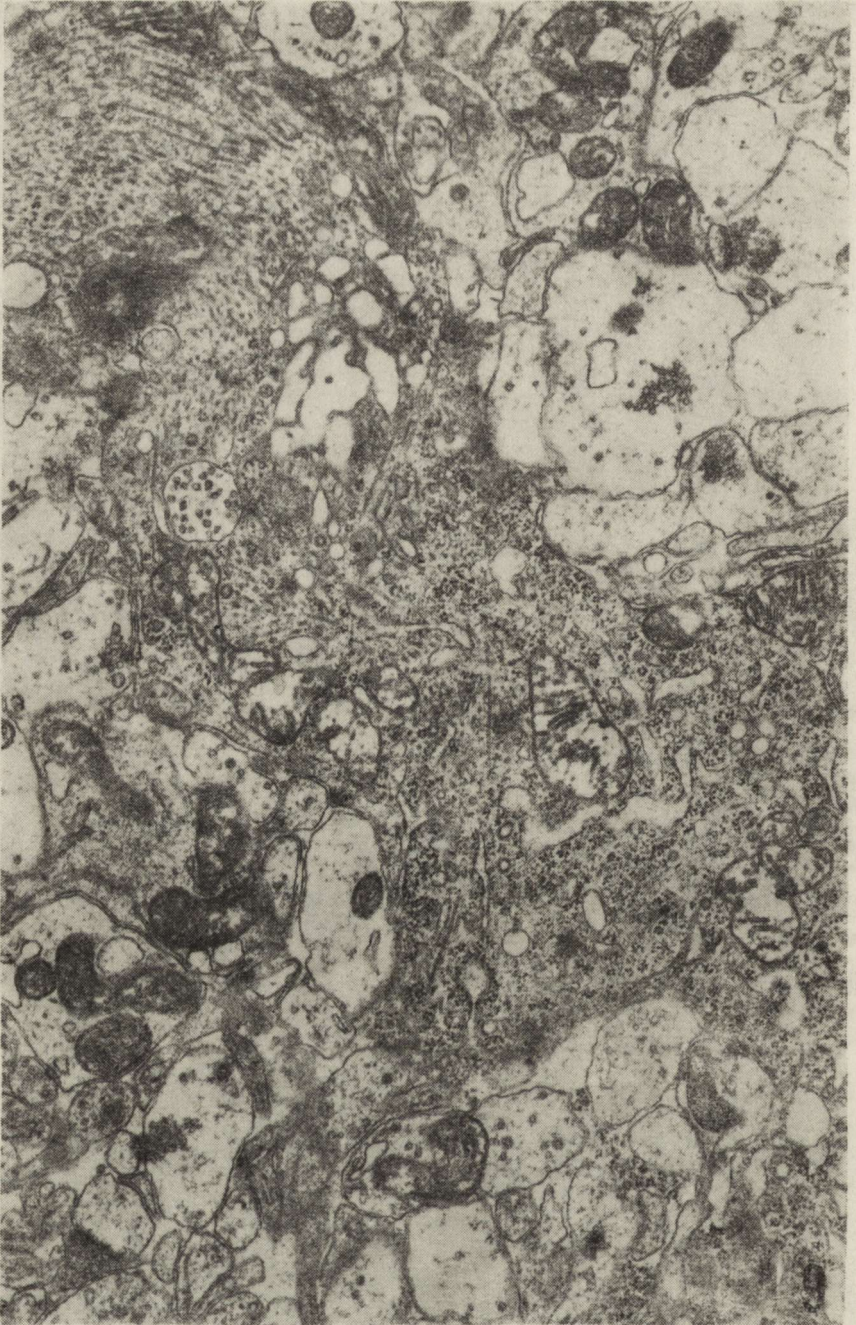
Ryc. 7. Istota czarna. Nieprawidłowy układ blaszek osłonki mielinowej. Owalne mielinowe struktury śródaksonalne o koncentrycznym układzie blaszek, pozostające w łączności z osłonką. Pow. 12 450 ×

Fig. 7. Substantia nigra. Abnormal structure of myelin lamellae. Oval myelin structures with concentric lamellar arrangement are located intraaxoplasmically, preserving contact with myelin sheath. × 12 450



Ryc. 8. Prążkowie. We fragmentach włókien nerwowych aksony z jasną aksoplazmą, zawierającą dużą ilość struktur neurofilamentarnych oraz stosunkowo nieliczne mikrotubule. Widoczne poszerzenia przestrzeni okołoaksonalnej (strzałka) i rozwarstwienia osłonki mielinowej. Pow. 12 450 ×

Fig. 8. Striatum. Fragments of nerve fibres with axons containing abundant neurofilamentous structures and relatively scarce microtubules. Dilatation of periaxonal space (arrow) and splitting of myelin lamellae are also seen. × 12 450



Ryc. 9. Prążkowie. Fragment neuronu bogatego w organelle. Zwraca uwagę bardzo duża ilość elementów cytoskeletonu i obrzmiałe mitochondria. Większość synaps o obrzmiałej aksoplazmie i skupiających się pęcherzykach synaptycznych. Pow. 12 450 \times

Fig. 9. Striatum. Fragment of neuron rich in organelles. Note rich cytoskeleton elements and swollen mitochondria. Most of the synapses with swollen cytoplasm and aggregation of synaptic vesicles. $\times 12\ 450$

czo od opisanego w istocie czarnej. Odnosiło się to w szczególności do nieprawidłowości w ukształtowaniu aksonów i osłonek mielinowych (ryc. 8). W komórkach nerwowych obserwowano podobne zmiany jak w neuronach istoty czarnej. Wiele neuronów o cechach hiperaktywności znamionowało się zwiększoną liczebnością organelli oraz elementów cytoskeletonu. Mitochondria były jednak przeważnie obrzmiałe. Znajdujące się w neuropilu zakończenia synaptyczne miały przeważnie rozrzedzoną aksooplazmę i nieliczne, często skupione pęcherzyki synaptyczne (ryc. 9).

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań mikroskopowo-elektronowych wskazują na reakcję niektórych elementów komórkowych w wybranych strukturach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym. W badanych przez nas wycinkach z kory centralnej, zakrętu hipokampa, istoty czarnej oraz prążkowiec występowały zmiany mogące świadczyć o zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych regionów mózgowia na działanie manganu. Cechą wspólną dla wszystkich badanych obszarów było obrzmienie astrocytów dotyczące zarówno ich perykarionów, jak i wypustek. Natomiast charakterystyczną zmianą w istocie czarnej i prążkowiec były nieprawidłowości w budowie aksonów i osłonek mielinowych oraz satelitarnych oligodendrocytów. Można sądzić, że u podłoża obserwowanych uszkodzeń aksonalnych leżą pierwotne zmiany w komórkach nerwowych, wyrażające się występowaniem tzw. ciemnych neuronów. Nie można jednak wyłączyć bezpośredniego wpływu manganu na rozwój zmian we włóknach nerwowych. Badania przeprowadzone na hodowli prążkowiec poddanej *in vitro* działaniu $MnCl_2$ wykazały przewagę zmian w wypustkach nerwowych i komórkach glejowych nad uszkodzeniem perykarionów komórek nerwowych (Gajkowska i wsp. 1983). Jednakże w małych neuronach prążkowiec obserwowano w tych warunkach znaczne nieprawidłowości ultrastrukturalne, a także osłabienie aktywności szeregu dehydrogenaz i acetylocholinoesterazy. Zdaniem autorów włókna o zmienionej aksooplazmie mogą stanowić wypustki tych właśnie małych neuronów. Obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych wykazano po zatruciu manganem w licznych badaniach biochemicznych i histochemicznych (Chandra 1972; Hietanen i wsp. 1981). Dydyk i Mossakowski (1984) obserwowali po zatruciu $MnCl_2$ znaczne uszkodzenie ultrastruktury mitochondriów zarówno w neuronach, jak również w komórkach glejowych. Autorzy ci wiązali zmiany w mitochondriach ze znanym powinowactwem manganu do tych organelli, występującym zarówno w warunkach prawidłowych, jak i patologicznych.

Zmiany w osłonkach mielinowych o podobnym charakterze, jak w naszym materiale obserwowano również w hodowli prążkowiec poddanej działaniu $MnCl_2$ (Gajkowska i wsp. 1983), jak i w modelu *in vivo* (Mossakowski i wsp. 1983). Były one również podobne do opisanych u szczurów

po zatruciu kobaltem z równoczesnym niedokrwieniem mózgu (Gajkowska i wsp. 1985). Zbliżony charakter tych nieprawidłowości może wynikać z dużego podobieństwa działania kobaltu i manganu w układach błon komórkowych (Iwasa, Inbushi 1983).

Nieprawidłowości w aksonach i osłonkach mielinowych występowały w naszym materiale w istocie czarnej oraz prążkowi, natomiast nie stwierdzono ich w korze mózgu i w zakręcie hipokampa. Wskazuje to na zróżnicowanie wrażliwości badanych struktur na działanie manganu. Można przypuszczać, że zmiany w osłonkach mielinowych stanowią następstwo zaburzeń metabolizmu oligodendrocytów, których obrzmienie obserwowano również tylko w istocie czarnej i prążkowi. Należy przy tym podkreślić, że w prążkowi hodowanym *in vitro* w obecności manganu oligodendrocyty wykazywały bardzo znaczne nieprawidłowości ultrastrukturalne (Gajkowska i wsp. 1983).

Obrzmienie astrocytów obserwowano w naszym materiale we wszystkich badanych strukturach, podobnie zresztą jak u szczurów po dożylnym podawaniu $MnCl_2$. Nie stwierdzono natomiast w naszym materiale odczynu włóknienkowego astrogleju, traktowanego przez Mossakowskiego i wsp. (1983) jako następstwo naczyniopochodnego obrzęku występującego we wczesnej fazie po zatruciu i wyprzedzającego obrzęk cytotoksyczny. Wykładniki tego ostatniego stwierdzono również w naszym modelu w badaniach mikroskopowo-elektronowych, jakkolwiek były one mniej nasilone i miały mniejszy zasięg niż po dożylnym zatruciu zwierząt.

Nieprawidłowości obserwowane w określonych tylko elementach strukturalnych oun, zwłaszcza wobec braku uogólnienia uszkodzeń, sugerują, że zatrucie manganem prowadzi do rozległych zaburzeń metabolicznych, które znajdują wykładnik morfologiczny tylko w tych obszarach oun, które są najbardziej wrażliwe na jego działanie.

STRUCTURAL CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS AS THE RESULT OF POISONING WITH MANGANOUS CHLORIDE ($MnCl_2$)

Summary

Results of morphological studies in the light and the electron microscope of the cerebral cortex, hippocampal gyrus, substantia nigra and corpus striatum in experimental poisoning of rats with manganous chloride are presented. The animals received instead of drinking water a 0.8 per cent aqueous solution of manganous chloride for eight weeks.

Some rarefaction of the white matter and the presence of "dark neurons" were noted in the examined structures in the light microscope. Electron-microscopy revealed in all the structures under study swelling of perikarya of astrocytes and their processes, especially the perivascular ones. In the striatum and substantia nigra ultrastructural abnormalities were observed, moreover, in numerous neurons, in the myelinated fibers and axonal endings. Swelling of oligodendrocytes was also noted.

СТРУКТУРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ
КРЫСЫ ВСЛЕДСТВИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ХЛОРИСТЫМ МАНГАНЦОМ (MnCl₂)

Резюме

Представлены результаты гистопатологического и электронномикроскопического исследования коры мозга, коньковой извилины, черного вещества и полосатого тела в экспериментальном отравлении хлористым марганцем у крысы. Животные в течение 8 недель получали 0,8% водный раствор хлористого марганца вместо пищевой воды. В исследуемых структурах центральной нервной системы в световой микроскопии обнаружено небольшое разрежение белого вещества и присутствие „тёмных” нейронов.

Электронно-микроскопическое исследование всех исследуемых структур выявило набухание перикарионов астроцитов и их отростков, особенно околососудистых. В полосатом теле и черном веществе наблюдались, кроме того, ультраструктурные изменения в многочисленных нейронах, в миелинизированных нервных волокнах и аксиональных окончаниях. Обнаружено также набухание олигодендроглии.

PIŚMIENNICTWO

1. Bogaert van L., Dallemagne M. J.: Approches expérimentales des troubles nerveux du manganisme. *Msch. Psych. Neurol.*, 1946, 111, 60—73.
2. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
3. 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.
4. Gajkowska B., Bugera T., Śmiałek M.: Ultrastruktura mieliny ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu octanem kobaltawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 545—555.
5. Gajkowska B., Kraśnicka Z., Śmiałek M.: Wpływ jonów manganawych na obraz morfologiczny hodowanej tkanki nerwowej. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 203—230.
6. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzymes responses to manganese exposure in rats. *Acta Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339—345.
7. Iwasa K., Inbushi T.: Co²⁺ and Mn²⁺ uptake by crab nerve fibers in resting state and potassium depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, 16, 560—566.
8. Kosicka B., Bugera T. E., Kittel M., Śmiałek M.: Poziom kwasu gammaaminomasłowego (GABA) oraz aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w mózgu szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 201—209.
9. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 393—410.
10. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego szczurów w zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.

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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, KRZYSZYNA RENKAWEK

AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS WITH GENERALIZED
NEUROAXONAL DEGENERATION AND SELECTIVE INVOLVEMENT
OF THE NIGRO-PALLIDAL SYSTEM

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

Apart from the classic form of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), characterized by clinical symptoms of simultaneous involvement of both upper and lower motor neurons, there exists quite a number of atypical forms of the disease (Hudson 1981). These, occurring both in sporadic and familial variants combine in addition to the leading motor neuron symptomatology, clinical features indicating involvement of other systems of the neuraxis. Among them, combination of amyotrophic lateral sclerosis with dementia and/or extrapyramidal syndrome seems to be the most common (Greenfield, Matthews 1954; Boudouresques et al. 1967; Bonduelle et al. 1968, 1970; Moya et al. 1969; Munset, Bradley 1979; Hudson 1981). The latter cases are clinically similar to those endemically occurring on the Guam island and Kii peninsula in Japan, as combination of ALS with the Parkinsonism-Dementia complex (Kurland, Brody 1975; Shiraki, Yase 1975; Mitsuyama, Takamiya 1979).

The pathomorphology of the disease shows even greater variability. Even in its classic form, in a large proportion of cases, neuropathological abnormalities exceed widely the structures of upper and lower motor neurons (Smith 1960; Brownell et al. 1970). The pathomorphological variability is considerably greater in atypical forms of the disease, in which involvement of other structures of the brain and spinal cord is as common as alterations of both neurons of the motor pathway (Greenfield, Matthews 1954; Boudouresques et al. 1967; Moya et al. 1969; Brownell et al. 1970; Bots, Staal 1973; Finlayson et al. 1973; Kaiya, Mehraein 1974; Kosaka, Mehraein 1978; Hudson 1981).

Our intention is to present a clinical-pathological analysis of a case of amyotrophic lateral sclerosis with atypical clinical picture and course and unusually rich and complex neuropathological findings.

CASE REPORT

Clinical data *

The case concerned a 47-year-old man with negative family history, in whom general asthenia and apathy, mental and psychomotor slowness, difficulty in walking with weakness of lower extremities, slurred speech and writing abnormalities had been progressively developing in the course of the last year prior to hospitalization. Neurological examination, in addition to mild dementia, speech difficulty and writing abnormality revealed increased muscle tone in all extremities, fine tremor in upper limbs, bilateral lack of ankle jerks and Babiński sign on the right side. Due to lowered ceruloplasmine (9.5 mg^{0/0}) and copper levels in the blood serum (30 μg^{0/0}) and presence of a delicate Kayser-Fleischer ring found on ophthalmological examination, Wilson's disease was diagnosed and typical therapy with chelating agents was applied with positive subjective results.

Three years later, on second hospitalization, severe deterioration of the patient's state was found. The demented patient was emaciated, he did not speak spontaneously, neither did he answer questions and follow orders. Swallowing difficulties were noticeable. The face was amimic, palmomental and snout reflexes were present. Muscle wasting involving bilaterally shoulder girdle muscles and those of both hands was striking. Fasciculations in the atrophic muscle groups were present. Coarse tremor was observed in both hands. Muscle strength in both lower extremities was decreased. Increased muscle tone of extrapyramidal type was present in all extremities. Tendon reflexes in lower extremities were absent. Plantar reflexes were bilaterally extensor. Ceruloplasmine level was extremely low (0.55 mg^{0/0}), that of copper, although higher than in previous examination, was lower than normal (70 μg^{0/0}). A discreet Kayser-Fleischer ring was also seen.

During the 4-month hospitalization the patient progressively deteriorated. He died 4 years after the beginning of clinical symptoms.

Pathological findings

General autopsy findings were irrelevant. Moderate atheromatosis of larger arteries and purulent bronchitis and bronchopneumonia were noted. Liver cirrhosis was not a feature. Microscopic examination of liver revealed moderate vacuolization of hepatocyte nuclei.

Neuropathological findings

Gross brain examination revealed moderate frontal cortical atrophy,

* The patient was treated in the Neurological Department, Postgraduate Medical Education Centre, Military Medical Academy, Warsaw. The authors are indept to Prof. Dr. T. Domżał for kind permission to use clinical data.

atrophy and bilateral cavitation of substantia nigra, some atrophy of cervical spinal enlargement and poor outlines of grey spinal structures. In addition an inveterate hemorrhagic focus was found in the temporo-parietal region of the right hemisphere.

Microscopic examination. Microscopic neuropathological examination was carried out on representative sections of the brain, brain stem, cerebellum and spinal cord. Paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin and according to Klüver-Barrera, van Giesen, Griedley, Kanzler-Arendt and PAS methods. Silver-impregnation according to Bielschowsky was performed on frozen sections. Histochemical reaction for iron was run according to Pearle's method.

Microscopic examination revealed severe loss of large motor neurons in the anterior horns of the spinal cord, being the most pronounced in the spinal enlargements, first of all the cervical one. Here, practically the whole population of large motor neurons was absent, with only some small nerve cells preserved (Fig. 1). In other spinal segments neuronal loss concerned mostly antero-medial groups of large motor neurons. The preserved motor nerve cells showed severe degeneration in the form of lipochromatosis, chromatolysis, shrinkage and vacuolar degeneration (Fig. 2a). Some cells showed features of granulovacuolar degeneration (Fig. 2b). Similar abnormalities, but much less pronounced, concerned posterior horn neurons. Neuronal loss and degeneration were accompanied by cellular and fibrous gliosis. Neuronal loss and degeneration involved also motor nuclei of the cranial nerves, mostly those of the hypoglossus and vagus nerves (Fig. 3). Changes in the motor cortex were less advanced, although there was moderate rarefaction of large pyramidal neurons in the fifth cortical layer. There was no noticeable demyelination of the pyramidal tracts on their whole length, except slight pallor of some pyramidal bundles in the pons. However, under higher magnification some rarefaction and spongiosis, with no macrophagic activity, were seen in the lateral cortico-spinal tracts in the cervical and thoracic segments of the spinal cord. Similar abnormalities were present in the dorsal spino-cerebellar tracts and in the central portion of the posterior funiculi.

Substantia nigra in addition to macroscopically seen bilateral cavitation revealed almost complete neuronal loss in both compact and reticular portions. The only melanin-bearing neurons left were those located in the most lateral part of the structure. Coarse and fine melanin granules were lying loosely in the neuropil, often in perivascular aggregations (Fig. 4). This was accompanied by severe cellular and fibrous gliosis. Numerous yellowish-brown, fine granular deposits were spread widely over the structure (Fig. 5). Their accumulation around astrocytic nuclei suggested their intracellular location. Most of them revealed a positive iron reaction (Fig. 6).

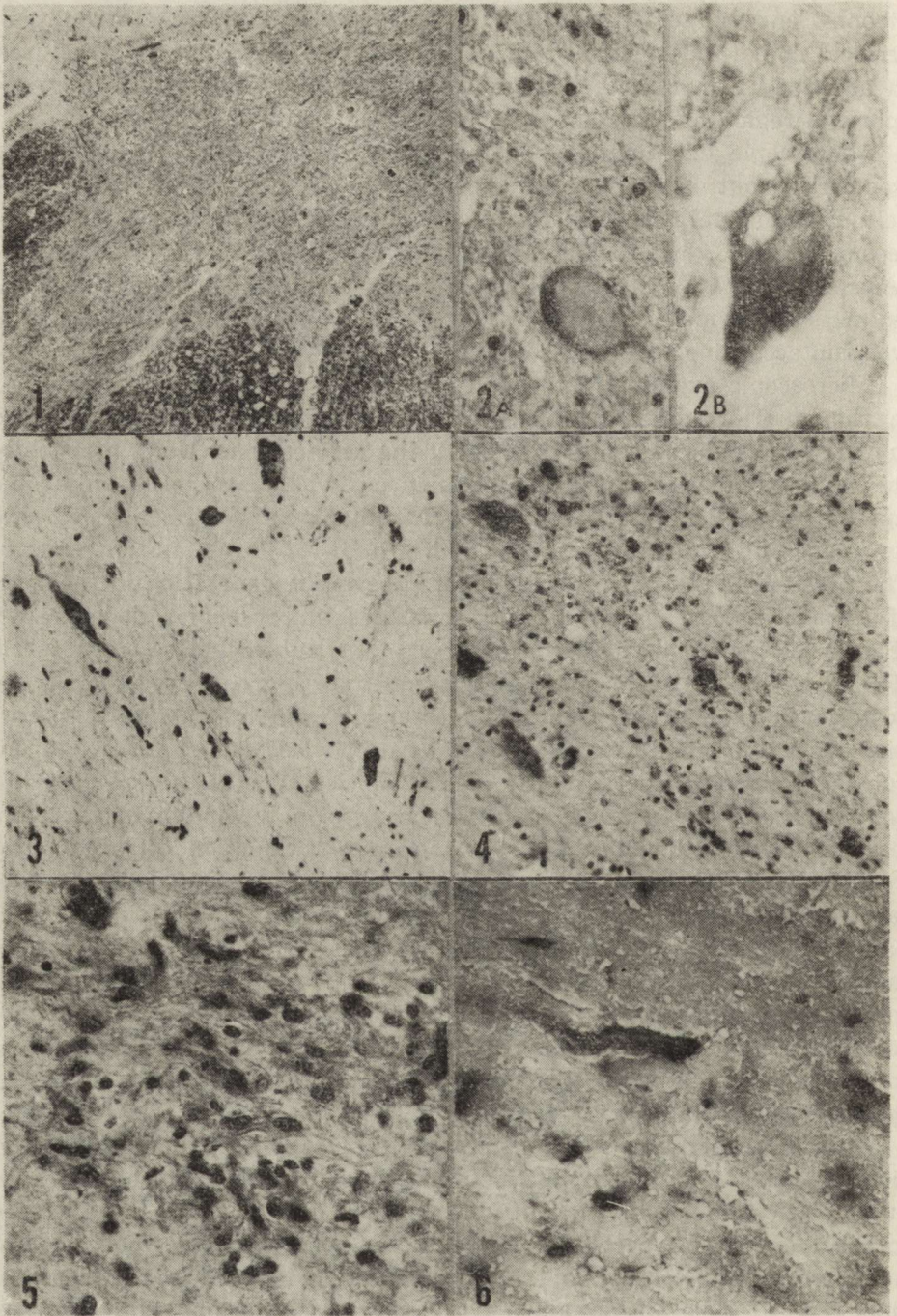


Fig. 1. Spinal cord, cervical segment. Almost total loss of large motor neurons with secondary gliosis. Klüver—Barrera. $\times 60$

Ryc. 1. Rdzeń kręgowy, odcinek szyjny. Prawie całkowity zanik dużych neuronów ruchowych z wtórną fibroglejozą. Klüver—Barrera. Pow. $60 \times$

Globus pallidus was bilaterally shrunken and fibrous (Fig. 7). There was severe neuronal loss and degeneration and glial proliferation and hypertrophy (Fig. 8). Numerous fine and coarse granular deposits, similar to those seen in substantia nigra, were spread widely in the neuropil and aggregated around astrocytic nuclei. Most of them revealed a positive reaction for iron, although some of them were negative (Fig. 9). There was strong adventitial siderosis of medium-size pallidal arteries. Cytology of the putamina, caudate and subthalamic nuclei was apparently normal. Thalami showed moderate neuronal loss and degeneration. In both putamina and thalami some delicate iron-positive deposits were seen. Frontal cortex showed patchy and laminar neuronal loss, confined in most instances to the II and III cortical layers, with no remarkable astrocytic proliferation (Fig. 10). There was some pallor of myelin in the frontal subcortical white matter. Neurofibrillary tangles, Pick's argentophilic degeneration and senile plaques were not a feature. The most striking finding consisted in the presence of numerous neuroaxonal spheroids spread all over the central nervous system. Varying greatly in size and morphology they were most numerous in both grey and white structures of the spinal cord (Fig. 11), substantia nigra (Fig.

Fig. 2. Degeneration of large motor neurons. A) Severe lipochromatosis and shrinkage of large motor neurons in the cervical segment of spinal cord. H—E. $\times 400$. B) Vacuolar and granulovacuolar degeneration of large motor neuron in the lumbar segment of the spinal cord. H—E. $\times 1200$

Ryc. 2. Zwyródnienie dużych neuronów ruchowych. A) Stłuszczenie i obkurczenie zachowanych dużych neuronów ruchowych w szyjnym odcinku rdzenia kręgowego. H—E. Pow. 400 \times . B) Wodniczkowe i ziarnisto-wodniczkowe zwyrodnienie dużego neuronu ruchowego w lędźwiowym odcinku rdzenia kręgowego. H—E. Pow. 1200 \times

Fig. 3. Neuronal loss and degeneration in the nucleus of hypoglossal nerve. Klüver—Barrera. $\times 200$

Ryc. 3. Ubytki komórek nerwowych i zwyrodnienia neuronalne w jądrze nerwu podjęzykowego. Klüver—Barrera. Pow. 200 \times

Fig. 4. Substantia nigra: loss of pigmented cells, cellular gliosis, loose granules of pigment lying free in the neuropil. H—E. $\times 200$

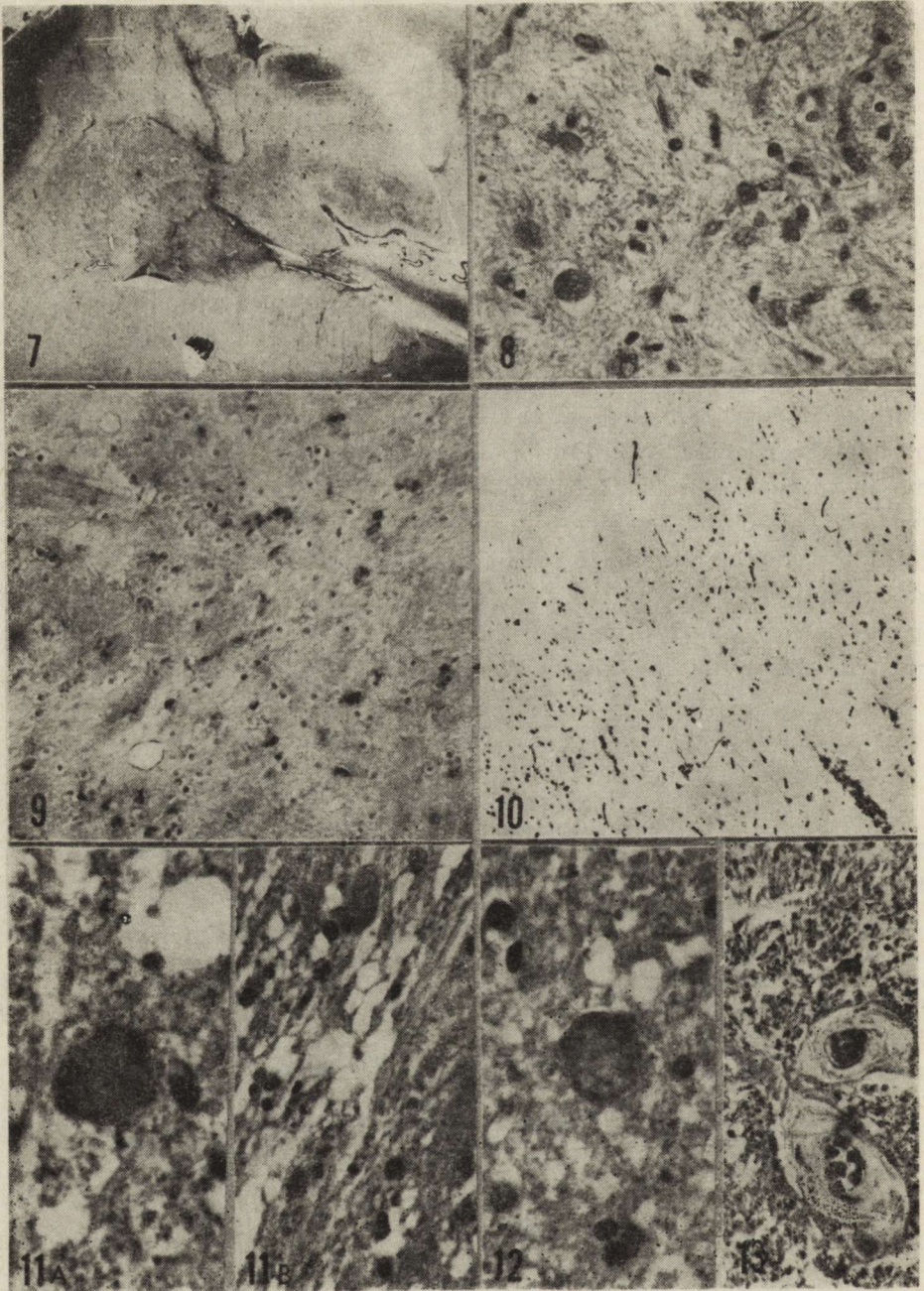
Ryc. 4. Istota czarna: zanik komórek barwnikowych, glejoza komórkowa, ziarna barwnika rozsiane w neuropilu. H—E. Pow. 200 \times

Fig. 5. Substantia nigra: glial proliferation and hypertrophy. Fine granular deposits seen in neuropil. H—E. $\times 400$

Ryc. 5. Istota czarna: proliferacja i przerost gleju. Drobnodziarniste złoży w neuropilu. H—E. Pow. 400 \times

Fig. 6. Substantia nigra: coarse and fine granular iron-positive deposits. Pearle. $\times 400$

Ryc. 6. Istota czarna: grube i delikatne żelazo-dodatnie złoży. Pearle. Pow. 400 \times



12) and pallidum. They were less numerous in the medulla, being not limited to the nuclei of the posterior funiculi, in basal ganglia, thalami, cerebral cortex and the subcortical white matter. The neuropathological picture of the case was completed by severe fibrosis and hyalinization of the small blood vessel walls (Fig. 13); this being most advanced in the white matter of the spinal cord and putamina.

Chemical data

The copper content in basal ganglia, cerebral cortex and subcortical white matter was 24.43, 11.74 and 7.02 mg of copper/g of the dry tissue weight, respectively. Lead content, estimated as that of copper, spectrophotometrically (atomic absorption standard method of Jarrall-Ash) was markedly increased in all examined structures of the central nervous system as compared with that found in identical CNS areas in a non-neurological patient of the same age group as ours. The comparative data are shown in Table 1.

Fig. 7. Globus pallidus: shrinkage and fibrogliosis of medial and lateral segments. Kanzler—Arendt, Magnif. glass.

Ryc. 7. Gałka biała: obkurczenie i glejoza włóknista obu segmentów jądra. Kanzler—Arendt. Pow. lupowe

Fig. 8. Globus pallidus: glial proliferation and hypertrophy, fine granular material spread over neuropil. Axonal spheroid seen in the lower part of the picture. H—E. $\times 400$

Ryc. 8. Gałka biała: proliferacja i przerost gleju, drobnoziarniste złoży rozsiiane w neuropilu. Sferoid aksonalny widoczny w dolnym fragmencie ryciny. H—E. Pow. $400 \times$

Fig. 9. Globus pallidus: granular, iron-positive deposits spread over neuropil. Pearle. $\times 200$

Ryc. 9. Gałka biała: ziarniste, żelazo-dodatnie złoży w neuropilu. Pearle. Pow. $200 \times$

Fig. 10. Frontal cortex: neuronal loss in II and III layers. Klüver—Barrera. $\times 100$

Ryc. 10. Kora czołowa: ubytki neuronalne w II i III warstwie. Klüver—Barrera. Pow. $100 \times$

Fig. 11. Spinal cord: A) axonal spheroid from the lateral funiculus. H—E. $\times 800$. B) axonal spheroids from the posterior spinal root. H—E. $\times 400$

Ryc. 11. Rdzeń kręgowy: A) sferoid aksonalny z bocznych powrózków. H—E. Pow. $800 \times$. B) sferoid aksonalny w śródrzdniovym odcinku korzenia tylnego. H—E. Pow. $400 \times$

Fig. 12. Spheroid in the reticular part of substantia nigra. H—E. $\times 800$

Ryc. 12. Istota czarna: sferoid aksonalny w części siatkowatej H—E. Pow. $800 \times$

Fig. 13. Fibrosis of blood vessel walls in the posterior funiculus of the spinal cord. H—E. $\times 400$

Ryc. 13. Rdzeń kręgowy: zwłóknienie ściany drobnego naczynia tętniczego w powrózku tylnym. H—E. Pow. $400 \times$

Table 1. Lead content in various structures of the central nervous system ($\mu\text{g/g}$ of dry tissue weight)

Tabela 1. Zawartość ołowiu w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego ($\mu\text{g/g}$ suchej masy tkanki)

Structure of the CNS Struktura oun	Patient Pacjent	Reference case Przypadek referencyjny
Cerebral cortex Kora mózgu	7.20	3.15
Subcortical white matter Istota biała podkorowa	5.62	2.11
Basal ganglia Jądra podstawy	8.68	4.10
Spinal cord Rdzeń kręgowy	21.90	7.20

DISCUSSION

In the presented case, the 4-year-long disease process began with progressive psychoorganic changes concomitant with an extrapyramidal syndrome with some features of pyramidal involvement. Muscular atrophy with fasciculations, involving bilaterally upper limbs appeared in the further stage of the disease. The extrapyramidal syndrome with psychoorganic changes, accompanied by both laboratory and clinical exponents of copper metabolism abnormalities inclined the clinician to diagnose hepato-lenticular degeneration. Further development of the disease, especially appearance of the amyotrophic syndrome, shook this diagnosis, which was neither proven at the postmortem examination. This revealed lack of liver pathology and neuropathological exponents of Wilson's disease as well as an apparently normal copper level in the brain tissue. However, the question of copper metabolism disturbances, manifested by reduced blood content of both copper and ceruloplasmin and presence of the Kayser-Fleischer corneal ring remains open. The same concerns the transitory positive clinical response to copper-chelating agents, while House et al. (1978) pointed out negative results of penicillamine treatment in amyotrophic lateral sclerosis.

Light-microscopic examination revealed a variety of neuropathological abnormalities involving practically the whole central nervous system. Neuronal loss and degeneration concerning spinal and bulbar motor neurons are classic neuropathological exponents of amyotrophic lateral sclerosis. Involvement of the upper motor neurons, although present, was mild. This, however, has been observed in quite a number of the most classic cases of ALS. In the series of Brownell et al. (1970) in 20 per cent of classic cases there were no changes in pyramidal tracts and motor cortex. On the other hand slight involvement of the posterior horn neu-

rons and abnormalities in the posterior funiculi and spino-cerebellar tracts are not unusual components of both classic and atypical forms of the disease. So are neuronal loss and degeneration, in globus pallidus and substantia nigra (Malamud et al. 1961; Boudouresques et al. 1967; Moya et al. 1969; Bonduelle et al. 1968; Bots, Staal 1973; Kaiya, Mehraein 1974; Shiraki, Yase 1975; Kosaka, Mehraein 1978; Hudson 1981). Both of these structures, alongside with the cerebral cortex, belong to those most commonly affected in ALS combined with dementia and/or extrapyramidal syndrome. In our case nigral and pallidal lesions were particularly intensive. Damage to substantia nigra resulted in its cavitation. The clinically extrapyramidal syndrome preceded the appearance of amyotrophy. Neuronal loss, secondary gliosis, neuroaxonal dystrophy and accumulation of iron-positive deposits in the substantia nigra and globus pallidus, observed in our case, constitute a typical neuropathological background of the Hallervorden-Spatz disease. Concomitance of morphological abnormalities characteristic of the Hallervorden-Spatz disease, with amyotrophic lateral sclerosis was described by Hirano et al. (1961), Staat and Bots (1969), Bots and Staat (1973) and Kosaka and Mehraein (1978). More striking neuropathological features of Hallervorden-Spatz disease were demonstrated by Shiraki and Yase (1975) in two Japanese cases combining amyotrophic lateral sclerosis and the Parkinsonism-Dementia complex. Contrary to our case, pallidal changes were more advanced than nigral ones. However, in Hallervorden-Spatz disease pigmentary alterations concern selectively the reticular portion of the substantia nigra, while in our case severe tissue disintegration with pigment deposition involved both its reticular and compact parts. Cavitation of substantia nigra, being the most advanced tissue abnormality, was located in its reticular portion. Similarly, neuroaxonal spheroids, although numerous in both substantia nigra and globus pallidus, were spread widely all over the central nervous system. The distribution of neuroaxonal degeneration in our case resembled more that described in cases of neuroaxonal dystrophies than that characteristic of Hallervorden-Spatz disease (Seitelberger 1971). Spheroid localization exceeded also the topistic sides of their accumulation connected with either physiological or pathological brain ageing (Jellinger, Haub 1968; Jellinger, Jirasek 1971; Seitelberger 1971; Fujisawa, Shiraki 1980). Neuroaxonal spheroids were very common in most of the cases described by Shiraki and Yase (1975), including those of both classic type and ALS combined with the Parkinsonism-Dementia complex. However, their distribution, contrary to our case, was limited to the affected areas of the spinal cord and typical topistic sides of their accumulation. It seems that in our case generalized neuroaxonal dystrophy can be considered either as an exponent of a multisystemic dystrophic process (Blakemore, Cavanagh 1969; Koenig 1968; Jellinger, Jirasek 1971; Fujisawa, Shiraki 1980) or

as an indicator of precocious presenile changes (Jellinger, Jirasek 1971). The latter assumption is supported by the appearance of widespread granulovacuolar degeneration of neurons. In general the neuropathological pattern of our case resembles most that of two previously mentioned cases from the series of Shiraki and Yase (1975). However, the most substantial difference between them consists in a lack in our case of intracytoplasmic neurofibrillary tangles, which were the typical finding in the Japanese cases. The second essential difference consists in the presence of vascular abnormalities in the form of fibrosis and hyalinosis of small vessel walls, with consecutive perivascular damage to the brain parenchyma. They occurred in a relatively young man with no arterial hypertension or renal pathology, mild atheromatosis of larger peripheral vessels and complete lack of atheromatosis in larger cerebral arteries. This type of vascular abnormalities, although described in some cases of amyotrophic lateral sclerosis (Rafałowska, Bunina 1969) does not belong to typical elements of the neuropathological picture of the disease.

The question of increased lead content in the tissue of the central nervous system requires a short comment, because of the possibility of professional exposure of our patient to the action of this metal. The problem of the role of lead in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, opened at the beginning of the century with Wilson's paper (1907), has revived in the seventies, despite the changing general concepts concerning the etiopathogenesis of this disease (Campbell et al. 1970; Petkau et al. 1974; Conradi et al. 1976, 1978). The concept of the pathogenetic role of lead is based on observations of ALS cases indicating its increased content in blood serum, cerebro-spinal fluid and in several tissues and organs, first of all in muscles and the peripheral and central nervous systems (Conradi et al. 1976, 1978; Petkau et al. 1974). The observation of Petkau et al. (1974) are of special interest, as they have demonstrated increased lead levels in various parts of the central nervous system, with the striking preponderance of the spinal cord in patients with amyotrophic lateral sclerosis exposed and not exposed to contact with the metal, exceeding that of an average population. According to the hypothesis of Conradi et al. (1976, 1978) lead penetrates to the central nervous system either through damaged blood vessels or via peripheral nerves, transported with a retrograde axonal flow from motor-end-plates to the perikarya of large motor neurons. Involvement of the upper motor neuron, secondary in nature, is supposed to be brought about via transsynaptic metal transport from motor neurons localized either in the spinal cord and/or medulla.

It seems extremely difficult to draw any conclusions in this respect basing on the data concerning the presented case, despite its unusually rich clinical picture and neuropathological abnormalities. However, it

seems worthwhile to point out several questions. A striking increase of lead content was found in all examined structures of the central nervous system, being not limited to the spinal cord. This corresponds well with generalized neuropathological changes, extending beyond both lower and upper motor systems. Goldstein et al. (1974) have shown that chronic lead intoxication produces disturbances in the metabolism of catecholamines. This seems interesting in the light of extrapyramidal symptomatology, dominating alongside with the dementia clinical picture of the disease in its initial stage. Severe neuronal loss within the cerebral cortex, by no means limited to the motor area, which could be considered as structural basis for the psychoorganic syndrome in the relatively young man without morphological features of presenile dementia, was the only neuropathological alteration, common with the described up till now, verified cases of lead encephalopathy (Whitefield et al. 1974; Nyka et al. 1978). It should be added, however, that neuropathology of lead encephalopathy is neither specific nor diagnostic. All the above discussed questions cannot be considered as indicating pathogenic participation of lead in the development of amyotrophic lateral sclerosis, although in the particular case presented it could have played some role in complicating and enriching both the clinical picture of the disease and its pathomorphological exponents.

Summarizing, we would like to consider our case as one more example of the coexistence of motor neuron disease with other systemic degenerative processes of the central nervous system with unusually rich and diversiform neuropathology.

STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNEJ Z UOGÓLNIĄ DYSTROFIĄ
NEUROAKSONALNĄ I WYBIÓRCZYM USZKODZENIEM UKŁADU
NIGRO-PALIDARNEGO

Streszczenie

Przedstawiono przypadek 47-letniego chorego, u którego w okresie czterech lat rozwinął się ciężki, prowadzący do zejścia śmiertelnego, zespół neurologiczny, składający się z otępienia, objawów pozapiramidowych, przypominających w okresie początkowym obraz choroby Wilsona, dyskretnych objawów piramidowych oraz symetrycznych zaników mięśni obręczy barkowej i rąk. Objawy zajęcia obwodowego neuronu ruchowego były zjawiskiem stosunkowo późnym, poprzedzonym zespołem pozapiramidowym i cechami postępującego otępienia.

W obrazie neuropatologicznym stwierdzono zaawansowane objawy uszkodzenia obwodowego neuronu ruchowego na poziomie opuszki i rdzenia kręgowego, przede wszystkim w obrębie zgrubienia szyjnego, bez wyraźnego zajęcia dróg korowodrzeniowych. Dominującym zjawiskiem uzupełniającym było wybiórcze, symetryczne uszkodzenie gałki bladej i istoty czarnej, w jej części zbitej i siatkowatej, wyrażające się zanikiem neuronów, wtórną fibroglejozą oraz nagromadzeniem ziarnistych złogów żelazo-dodatnich. W całym ośrodkowym układzie nerwowym, z wyjątkiem przewagą układu nigropalidarnego, pnia mózgu, a przede wszystkim rdze-

nia kręgowego, występowały liczne, różniące się kształtem i wielkością sferoidy neuroaksonalne. W korze mózgu występowały uogólnione i rozsiane ubytki komórek nerwowych, bez wyraźnej predylekcji topograficznej. Zmian starczych, typu płytek i zwyrodnienia włóknienkowego Alzheimer'a, nie stwierdzono. Obecne były natomiast stosunkowo liczne neurony z cechami zwyrodnienia ziarnisto-wodniczkowego, głównie w formacjach rdzenia kręgowego. Obraz neuropatologiczny uzupełniały zmiany naczyniowe o typie zwłóknienia i zeszkliwienia drobnych naczyń tętnicznych. Badanie chemiczne wykazało bardzo znaczny wzrost zawartości ołowiu w korze mózgu, jądrach podstawy, a przede wszystkim w rdzeniu kręgowym, przekraczającej wielokrotnie odpowiednie wartości kontrolne.

Autorzy uważają przedstawiony przypadek za przykład współistnienia stwardnienia zanikowego bocznego z innymi układowymi procesami zwyrodnieniowymi ośrodkowego układu nerwowego, o niezwykle bogatym i zróżnicowanym obrazie neuropatologicznym. Ze względu na zawodową ekspozycję chorego na działanie ołowiu, specjalną uwagę zwrócono na możliwą rolę patogenetyczną tego metalu w opisanym zespole chorobowym.

БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ С ОБОБЩЕННОЙ НЕВРОАКСОНАЛЬНОЙ ДИСТРОФИЕЙ И СЕЛЕКТИВНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ НИГРО-ПАЛЛИДАРНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Представлен случай 47-летнего больного у которого появился и в течение 4 лет привел к смерти неврологический синдром, состоящий с деменции, экстрапирамидных симптомов (с клинической картиной напоминающей болезнь Вильсона), слабо выраженного пирамидного синдрома и симметричной атрофии мышц плечевого пояса и рук. Симптомы повреждения периферического двигательного нейрона появились относительно поздно, предшествовал экстрапирамидный синдром и прогрессирующая деменция.

Невропатологический образ выявил выдвинутый синдром повреждения периферического двигательного нейрона на уровне продолговатого и спинного мозга, особенно в шейном утолщении, без отчетливого нарушения корково-спинальных пучков. Дополняющим доминирующим явлением было селективное симметричное повреждение бледного шара и черного вещества (как *pars compacta* так *pars reticularis*) проявляющееся полным отсутствием нейронов, пролиферацией волокнистой глии и скоплением зернистых железопозитивных отложений. Во всей центральной нервной системе с отчетливым преобладанием нигро-паллидарной системы, ствола мозга и особенно спинного мозга, были обнаружены многочисленные, разные по форме и величине, невроаксональные сфериды. В коре мозга выступали обобщенные и рассеянные клеточные убытки, без особой локализации. Старческих бляшек и неврофибрилярной клеточной дегенерации Alzheimer'a не найдено. Вместо того были обнаружены многочисленные нейроны с зернисто-вакуолярной дегенерацией, выступающие особенно в структурах спинного мозга. Невропатологическую картину дополняли обобщенные изменения сосудов в виде фиброза и гиалиноза артериол. Химическое исследование обнаружило очень большое количество свинца в мозговой коре, белом веществе, подкорковых ганглиях и, особенно, в спинном мозге. Количество это много раз превышало контрольные данные.

Авторы рассматривают представленный случай как пример сосуществования бокового амиотрофического склероза с другими системными дегенерационными процессами, отличающийся необычным разнообразием невропатологической картины. В связи с профессиональной экспозицией больного на влияние свинца, особое внимание было обращено на возможную патогенетическую роль этого металла в формировании болезненного симптомокомплекса.

REFERENCES

1. Blakemore W. F., Cavanagh J. B.: Neuroaxonal dystrophy occurring in an experimental dying back process in the rat. *Brain*, 1969, 92, 789—804.
2. Bonduelle M., Bouygues P., Escourolle R., Lormeau G.: Evolution simultanée d'une sclérose latéral amyotrophique, d'un syndrome Parkinsonien et d'une démence progressive. À propos de deux observation anatomocliniques saessai d'interprétation. *J. Neurol. Sci.*, 1968, 67, 1630—1633.
3. Bonduelle M., Bouygues P., Lormeau G., Keller J.: Etude clinique et évolutive de cent ving cinq cas de sclérose latéral amyotrophique. Limites nosographiques et associations morbides. *La Presse Medicale*, 1970, 78, 827—832.
4. Bots G. Th. A. M., Staal A.: Amyotrophic lateral sclerosis-dementia complex, neuroaxonal dystrophy and Hallervorden-Spatz disease. *Neurology*, 1973, 23, 35—39.
5. Boudouresques J., Toga M., Roger J., Khalil R., Vigouroux R. A., Pellet W., Hassoun J. J.: Etat dementiel, sclérose latéral amyotrophique, syndrome extrapyramidal. Étude anatomic. Discussion nosologique. *Rev. Neurol.*, 1967, 116, 693—704.
6. Brownell B., Oppenheimer D. R., Hughes J. T.: The central nervous system in motor neuron disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1970, 33, 338—357.
7. Campbell A. M. G., Williams E. R., Barltrop D.: Motor neuron disease and exposure to lead. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1970, 33, 877—885.
8. Conradi S., Ronnevi L.-O., Vesterberg O.: Abnormal tissue distribution of lead in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 1976, 29, 259—265.
9. Conradi S., Ronnevi L.-O., Vesterberg O.: Increased plasma levels of lead in patients with amyotrophic lateral sclerosis compared with control subjects as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1978, 41, 389—393.
10. Finlayson M. H., Guberman A., Martin J. B.: Cerebral lesions in familial amyotrophic lateral sclerosis and dementia. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1973, 26, 237—246.
11. Fujisawa K., Shiraki H.: Study of axonal dystrophy. II. Dystrophy and atrophy of the presynaptic boutons: a dual pathology. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1980, 6, 387—398.
12. Greenfield J. G., Matthews W. B.: Post-encephalitic parkinsonism with amyotrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1954, 17, 50—56.
13. Goldstein W., Asbury A. K., Diamond I.: Pathogenesis of lead encephalopathy. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 382—389.
14. Hirano A., Malamud N., Kurland L. T.: Parkinsonism-dementia-complex. An endemic disease on the island of Guam. II. Pathological feature. *Brain*, 1961, 84, 662—679.
15. House A. O., Abbot R. J., Davidson D. L. W., Ferguson J. T., Lenman J. A. R.: Response to penicillamine of lead concentration in CSF and blood in patients with motor neurone disease. *Brit. Med. J.*, 1978, 2, 1684.
16. Hudson A. J.: Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: A review. *Brain*, 1981, 104, 217—247.
17. Jellinger K., Haub G.: Statistical investigations of the age dependence of neuroaxonal dystrophy. *German Med. Monthly.*, 1968, 13, 341—345.
18. Jellinger K., Jirasek A.: Neuroaxonal dystrophy in man: character and natural history. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1971, Suppl. 5, 3—16.
19. Kaiya H., Mehraein P.: Zur Klinik und pathologische Anatomie des Muskelatro-

- phie-Parkinsonism-Demenz Syndroms. Arch. Psychiat. Nervenkrank., 1974, 219, 13—27.
20. Koenig H.: Experimental production of acute neuroaxonal dystrophy. J. Neuropath. exp. Neurol., 1969, 28, 173—174.
 21. Kosaka K., Mehraein P.: Myatrophische lateralsklerose kombiniert mit Degeneration im Thalamus und der Substantia nigra. Acta Neuropath. (Berl.), 1978, 44, 241—244.
 22. Kurland L. T., Brody J.: Amyotrophic lateral sclerosis Guam type. In: Handbook of Clinical Neurology. Eds: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North Holland, Amsterdam, Oxford, 1975, 22, 339—347.
 23. Malamud N., Hirano A., Kurland L. T.: Pathoanatomic changes in amyotrophic lateral sclerosis on Guam. Special reference to occurrence of neurofibrillary changes. Arch. Neurol., 1961, 5, 401—415.
 24. Mitsuyama Y., Takamiya S.: Presenile dementia with motor neuron disease in Japan. A new entity? Arch. Neurol., 1979, 36, 592—593.
 25. Moya G., Miranda-Nieves G., Perez-Sotelo M.: Un cas familial d'amyotrophie spinale progressive montrant une atteinte histologique, cliniquement muette, du pallidum, du locus niger, du noyau de Luys et du faisceau de Goll. Acta neurol. belg., 1969, 69, 1002—1012.
 26. Munset T. L., Bradley W. G.: Amyotrophic lateral sclerosis. In: Current Neurology. Eds: H. R. Tyler, D. M. Dawson. Houghton Mifflin. Boston, 1979, pp. 79—103.
 27. Nyka W. M., Borowska-Lehman J., Forycki Z.: Tetraethyllead poisoning. In: Brain tumors and chemical injuries to the central nervous system. Ed.: M. J. Mossakowski. Polish Medical Publishers, Warsaw, 1978, pp. 190—195.
 28. Petkau A., Sawatzky A., Hillier C. R., Hoogstraten J.: Lead content of neuromuscular tissue in amyotrophic lateral sclerosis: case report and other consideration. Brit. J. Indust. Med., 1974, 31, 275—287.
 29. Rafałowska J., Bunina T.: Vascular changes in amyotrophic lateral sclerosis (Russian). J. Neuropat. Psychiat., 1969, 69, 11—17.
 30. Seitelberger F.: Neuropathological conditions related to neuroaxonal dystrophy. Acta Neuropath. (Berl.), 1971, Suppl. 5, 17—29.
 31. Shiraki H., Yase Y.: Amyotrophic lateral sclerosis in Japan. In: Handbook of Clinical Neurology. Eds: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North Holland, Amsterdam, Oxford, 1975, 22, 339—347.
 32. Smith M.: Nerve fibre degeneration in the brain in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1960, 23, 269—282.
 33. Staal A., Bots G. Th. A. M.: A case of hereditary juvenile amyotrophic lateral sclerosis complicated with dementia. Psychiatr. Neurol. Neurochir., 1969, 72, 129—134.
 34. Whitefield Ch. L., Ch'ien L., Pfitzer E.: Lead encephalopathy in adults. Amer. J. Med., 1972, 52, 289—298.
 35. Wilson S. A. K.: The amyotrophy of chronic lead poisoning: amyotrophic lateral sclerosis of toxic origin. Rev. Neurol. Psychiat., 1907, 5, 441—455.

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

Ryszard Pluta: Influence of prostacyclin on the cerebral cortex ultrastructure in the rabbit after complete brain ischemia of 20 min duration. II. Astrocytes and blood vessels	425
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Influence of the calcium channel blocker on the ischemic changes in sector CA ₁ pyramidal neurons of Ammon's horn in Mongolian gerbil	439
Maria Barcikowska-Litwin, Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: Lymphocytes within the infarct area in human brain	451
Mieczysław Wender, Antoni Godlewski, Józef Szczech: Oligodendroglia of the ageing human brain. Karyometric and cytophotometric studies	461
Józef Szczech: Comparative appraisal of oligodendroglia in various brain structures in rats exposed to hypoxia. Karyometric and cytophotometric studies	473
Jerzy W. Łazarewicz, Krystyna Noremberg: Pentobarbital and calcium homeostasis in rat brain synaptosomes: effect of chronic treatment and <i>in vitro</i> administration	486
Hanna Drac, Janina Rafałowska: Guillain—Barré syndrome produced by malignant plexus papilloma	505
Halina Kroh: Meningioma with pseudopapillary pattern Case report	515
Barbara Gajkowska, Barbara Kosicka, Mieczysław Smałek: Structural changes in the central nervous system of rats as the result of poisoning with manganous chloride (MnCl ₂)	523
Mirosław J. Mossakowski, Krystyna Renkawek: Amyotrophic lateral sclerosis with generalized neuroaxonal degeneration and selective involvement of the nigro-pallidal system	539

СОДЕРЖАНИЕ

А. Тарашевска, И. Б. Зельман: Электронно-микроскопические исследования глии у кролика <i>pt</i> во время миелинизации	351
А. Гонщежевич: Роль астроглии в болезненных процессах, протекающих с разпадом миелина. I. Морфология астроглии в экспериментальном повреждении белого вещества	369
Э. Тарновска-Дзидушко, Э. Берtrand, Д. Маркевич: Анализ морфологических изменений в варолиевом мосте в хроническом алкоголизме с особым учетом myelinolysis centralis pontis	389
Р. Плюта: Влияние простаглицлины на ультраструктуру коры мозга кролика после полной 20-минутной ишемии мозга. I часть. Нейроны и невропил	407
Р. Плюта: Влияние простаглицлины на ультраструктуру коры мозга кролика после полной 20-минутной ишемии мозга. II часть. Астроциты и кровеносные сосуды	425
М. Я. Моссаковски, Р. Гадамски: Влияние блокирования мембранных кальциевых каналов на ишемические повреждения нейронов сектора CA ₁ аммониева рога монгольского хомяка	439
М. Барциковска-Литвин, С. Краевски, Э. Долинска, Я. Рафаловска: Лимфоциты в очаге мозгового инфаркта у людей	451
М. Вендер, А. Годлевски, Ю. Щех: Олигодендроглия в стареющем мозге человека. Кариометрические и цитофотометрические исследования	461
Ю. Щех: Сравнительная оценка олигодендроглии в различных структурах мозга крыс, подвергнутых гипоксии. Кариометрические и цитофотометрические исследования	473
Е. В. Лазаревич, К. Нoremberg: Пентобарбитал и гомеостаз кальция в синаптозомах мозга крысы. Влияние хронического дозирования и употребления <i>in vitro</i>	489
Х. Драц, Я. Рафаловска: Papilloma malignum plexus choriodei имитирующий синдром Guillain-Barré-Strohl'a (G-B-S)	503
Х. Крох: Случай псевдопапиллярной менингиомы	515
Б. Гайковска, Б. Косицка, М. Смялек: Структуральные изменения в центральной нервной системе крысы вследствие отравления хлористым марганцем (MnCl ₂)	523
М. Я. Моссаковски, К. Ренкавек: Боковой амиотрофический склероз с обобщенной невроаксональной дистрофией и селективным повреждением nigro-паллидарной системы	539

SPIS TREŚCI

20 Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Badania mikroskopowo-elektronowe gleju u królika pt w okresie mielinizacji	351
Andrzej Goncerzewicz: Rola astrogleju w procesach chorobowych przebiegających z rozpadem mieliny. I. Morfologia astrogleju w doświadczalnym uszkodzeniu istoty białej	369
Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Ewa Bertrand, Danuta Markiewicz: Analiza zmian morfologicznych w moście w przebiegu przewlekłego alkoholizmu ze szczególnym uwzględnieniem mielinolizy środkowej mostu	389
Ryszard Pluta: Wpływ prostacykliny na ultrastrukturę kory mózgu królika po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia. I. Neurony i neuropil	407
Ryszard Pluta: Wpływ prostacykliny na ultrastrukturę kory mózgu królika po całkowitym 20-minutowym niedokrwieniu mózgowia. II. Astrocyty i naczynia krwionośne	425
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Wpływ blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia na rozwój niedokrwiennych uszkodzeń neuronów sektora CA ₁ rogu Amona u chomików mongolskich	439
Maria Barcikowska-Litwin, Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: Limfocyty w obszarze zawału mózgu u ludzi	451
Mieczysław Wender, Antoni Godlewski, Józef Szczech: Oligodendroglej w starzejącym się mózgu człowieka. Badania kariometryczne i cytofotometryczne	461
Józef Szczech: Porównawcza analiza oligodendrogleju w różnych strukturach mózgu u szczurów poddanych niedotlenieniu. Badania kariometryczne i cytofotometryczne	473
Jerzy W. Łazarewicz, Krystyna Noremberg: Pentobarbital a homeostaza wapnia w synaptosomach mózgu szczura: wpływ chronicznego dawkowania i stosowania <i>in vitro</i>	489
Hanna Drac, Janina Rafałowska: Brodawczak złośliwy splotu naczyniówkowego imitujący zespół Guillain—Barré	503
Halina Kroh: Oponiak pseudobrodawkowy. Opis przypadku	515
Barbara Gajkowska, Barbara Kosicka, Mieczysław Smiałek: Zmiany strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym u szczura w wyniku zatrucia chlorkiem manganawym (MnCl ₂)	523
Mirosław J. Mossakowski, Krystyna Renkawek: Stwardnienie zanikowe boczne z uogólnioną dystrofią neuroaksonalną i wybiórczym uszkodzeniem układu nigro-pallidarnego	539

CONTENTS

Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Electron microscopic study of glia in pt rabbit during myelination	351
Andrzej Goncerzewicz: The role of astroglia in pathological processes characterized by myelin disintegration. I. Morphology of astroglia in experimental injury of white matter	369
Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Ewa Bertrand, Danuta Markiewicz: Morphological changes in the pons in the course of chronic alcoholism with particular reference to central pontine myelinolysis	389
Ryszard Pluta: Influence of prostacyclin on the cerebral cortex ultrastructure in the rabbit after complete brain ischemia of 20 min duration. I. Neurons and neuropil	407