

P. 195

egz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA
POLSKA

255, DW

TOM 26

1988

ZESZYT 1

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 26

1988

ZESZYT 1

KOMITET REDAKCYJNY

Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Janusz Groniowski, Józef Kałuża, Adam Kunicki, Agnieszka Jędrzejewska, Tadeusz Majdecki, Mirosław J. Mossakowski, Przemysław Nowacki, Wielisław Papierz, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaret (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Kornyei (Pecs), Jochan Quandt (Berenburg-Saale), Franz Seitelberger (Wiedeń), Istvan Tariska (Budapeszt)

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina Zelman
Sekretarz Redakcji: Irena Wilkoszewska

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, ul.* Dworkowa 3,
00-784 Warszawa, tel. 49-54-10, 49-82-79

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk
Maszynopis niniejszego nru przekazano Wydawcy 4 grudnia 1987



MARIA DĄMBSKA

EWOLUCJA POGLĄDÓW NA CHOROBY I PROCESY ZWYRODNIENIOWE UKŁADU NERWOWEGO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
PAN, Warszawa

Choroby, określane tradycyjnie mianem zwyrodnieniowych, zajmują w systematyce schorzeń układu nerwowego pozycję, którą można by nazwać niepewną lub niejasną. Wiele podręczników i monografii ostatnich lat nie zalicza ich już do jednej wspólnej grupy, w której „zwyrodnienie” byłoby czynnikiem wyróżniającym (por. Greenfield's Neuropathology 1984). Odgrywa tu rolę dążenie do rozpatrywania poszczególnych schorzeń przede wszystkim z punktu widzenia etiologii, która w miarę postępu nauk medycznych poznawana jest w coraz większej ich liczbie. Tym niemniej, badania neuropatologiczne stawiają diagnozę nie tylko wobec dawno znanych, ale również nowo opisywanych zespołów występujących w układzie nerwowym, które określane są jako procesy zwyrodnieniowe w węższym lub szerszym znaczeniu tego terminu. Seitelberger (1975) przed kilkunastu laty wyraził pogląd, że w aspekcie badań morfologicznych dalecy wciąż jesteśmy od ich ostatecznej klasyfikacji.

Przypomnienie jak na przestrzeni lat rozwijała się diagnostyka chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego wydaje się zarówno interesujące, jak i niejednokrotnie wysoce przydatne dla kształtowania aktualnych poglądów na to zagadnienie.

Sam termin „zwyrodnienie” – *degeneratio* ze względu na szeroki zakres znaczeniowy jest podstawowym źródłem trudności klasyfikacyjnych. Pochodzi on od łacińskiego słowa *de-generare*, które Olszewski (1968) tłumaczy na język angielski opisowo jako “became different from its own kind and race”. Po polsku najbliższym znaczeniowo wydaje się również podobne omówienie: „zamienić się, tracąc przynależność do własnego rodzaju czy gatunku”.

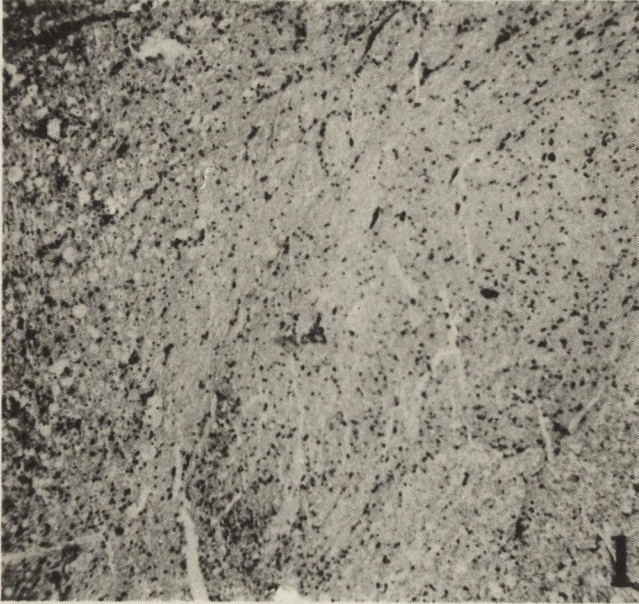
W biologii, w odniesieniu do organizmów żywych, mianem zwyrodnienia określa się postępujący proces patologiczny zachodzący w poszczególnych strukturach i wywołujący morfologicznie uchwytnie uszkodzenia elementów ich utkania. Proces ten może doprowadzić do śmierci poszczególnych elementów, struktur, a nawet całego organizmu. Zmiany, zachodzące nieuchronnie w sta-

rzejącym się ustroju żywym, mają podobne cechy. Stąd obserwowane w medycynie przedwczesne obniżenie sprawności i postępujące uszkodzenie narządów, oceniane jako proces chorobowy, określone zostało w 1852 r. przez Pageta (cyt. wg. Bogaerta 1949) jako przedwczesne zwyrodnienie. Tego typu postępujące procesy chorobowe zaobserwowano również w układzie nerwowym. Matt (cyt. wg. Bogaerta 1949) mówił w odniesieniu do nich o „przedwczesnym schyłku życia”, w grupach neuronów lub całych strukturach odpowiedzialnych za określone funkcje. Została wprowadzona przez Raymonda (1908) koncepcja starzenia się układów anatomicznych. Wyróżnienie tego typu zespołów było zgodne z kierunkami rozwojowymi ówczesnej neurologii, w której klasyfikowano choroby na podstawie ich cech kliniczno-morfologicznych.

Szczegółowe badania i obserwacje neurologiczne, uzupełnione analizami patomorfologicznymi, pozwoliły na opisanie wielu jednostek chorobowych, których etiopatogeneza była w większości nie znana. W następnym etapie rozwojowym neurologii grupa chorób określona mianem zwyrodnień układowych stała się przedmiotem dyskusji, w przebiegu której wyłoniły się dwie zasadnicze koncepcje. Schaffer (1926) uważał, że endogenne, dziedziczne choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego charakteryzują się uszkodzeniem pochodnych jednego listka zarodkowego, zlokalizowane są w jednym lub kilku segmentach jednego lub kilku układów anatomicznych. Dla Spielmeyera (1934) wybiórczość uszkodzeń nie była tak ścisła, choć mówił o predylekcji do zmian w określonych strukturach. Ponadto sądził, że układowymi mogą być nie tylko choroby dziedziczne, ale również wywołane przez czynniki zewnętrzne, pod warunkiem, że uszkodzenia zlokalizowane są w strukturach, które odznaczają się szczególną wrażliwością lub specjalnym powinowactwem do określonego czynnika patogenetycznego. Wyniki badań kliniczno-anatomicznych, wskazujące na postępujące zmiany zanikowe w określonych strukturach układu nerwowego, przesądziły o zawężeniu pojęcia zwyrodnienia do pierwotnego uszkodzenia neuronów.

Pod koniec lat czterdziestych van Bogaert (1949) omawiając zagadnienie układowych chorób zwyrodnieniowych określił je jako grupę obejmującą wiele jednostek chorobowych, charakteryzujących się postępującym przebiegiem, brakiem znajomości czynnika wywoławczego oraz często wykazujących charakter dziedzicznorodzinny. Za zespół wspólnych im cech morfologicznych uznał uszkodzenie neuronów wyrażające się ich obkurczeniem, czasem stłuszczeniem, prowadzące do zaniku oraz stopniowe zwyrodnienie włókien nerwowych z wolno postępującą reparacją glejową. Sądził nawet, że uszkodzenia aksonalne i zwyrodnienia na drodze mechanizmów transsynaptycznych często dominują nad zmianami dotyczącymi komórek zwojowych. Podkreślił przy tym że zmiany występują zwykle symetrycznie, nie ograniczają się do jednego, a często obejmują dwa lub więcej układów anatomiczno-czynnościowych. Opalski (1949) w tym samym czasie wyróżniał również choroby zwyrodnieniowe uszkadzające głównie istotę szarą bądź istotę białą, bądź też wreszcie struktury szare i białe równocześnie. Van Bogaert (1949) zaproponował syntetyczną klasyfikację

układowych chorób zwyrodnieniowych. Objęła ona liczne grupy, począwszy od uszkodzeń obwodowego neuronu ruchowego oraz ruchowego i czuciowego, poprzez neuron korowo-rdzeniowy i obwodowy, układy do- i odmóżdżkowe, oraz związane ze strukturami pniowymi, aż do zwyrodnień w poszczególnych jądrach zwojów podstawy i w korze mózgu. Mieściło się w niej wiele jednostek chorobowych, które w większości do chwili obecnej określane są mianem dziedzicznych zwyrodnień układowych, takie między innymi jak stwardnienie zanikowe boczne (ryc. 1), zwyrodnienie oliwkowo-mostowo-mózdkowe,



Ryc. 1. Stwardnienie zanikowe boczne. Zanik komórek nerwowych w rogu przednim rdzenia kręgowego. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

Fig. 1. Amyotrophic lateral sclerosis. Atrophy of neurons in anterior horn of the spinal cord. Cresyl violet. × 60

w których obraz morfologiczny spełnia ściśle kryteria uznane za charakterystyczne dla tej grupy chorób. Przedstawiając powyższą charakterystykę i klasyfikację autor zwrócił jednak w konkluzji swych rozważań uwagę, że poza tą najbardziej „czystą” grupą chorób układowych istnieją zwyrodnienia cechujące się usystematyzowanymi zmianami, które są związane ze znanym (np. wiał rdzenia) lub nie znanym (np. choroba Wilsona) czynnikiem wywoławczym poza układem nerwowym. Nie wahał się nawet dodać, że pewne cechy zwyrodnienia mają zmiany stwierdzone w układzie nerwowym w takich uogólnionych schorzeniach jak lipidozy i zaliczył je do „pseudozwyrodnień”.

Słomulowania te okazały się trafną zapowiedzią, że problem chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego zawierający liczne niejasności, będzie nasuwał nowe pytania które rozwiązywane będą w miarę postępu nauk biologiczno-medycznych.

Analiza morfologiczna pozwoliła na wykrycie w niektórych zwyrodnieniach szczególnych zmian wykraczających poza klasyczny opis tego zespołu. Wśród nich wspomnieć należy o ciałkach Levy'ego w chorobie Parkinsona czy zwyrodnieniu włókienkowym neuronów w zmianach starczych typu Alzheimera. Stanowiło to zapowiedź rozluźnienia rygorystycznie wąskiego zakresu zmian mieszczących się w pojęciu „zespół zwyrodnieniowy”. Ważnym krokiem w tym kierunku było postawienie pytania, czy pojęcie zwyrodnienia w układzie nerwowym należy ograniczyć do zmian dotyczących pierwotnie wyłącznie neuronów? Wprowadzenie przez Seitelbergera (1970) rozpoznania zespołu gąbczastego zwyrodnienia glejowo-neuronalnego miało tu zasadnicze znaczenie (ryc. 2). Przyjęcie możliwości rozpoznania w układzie nerwowym procesów zwyrodnieniowych, w których neuroglej byłby elementem ulegającym pierwotnemu lub równoległemu z neuronem uszkodzeniu, prowadziło do wyjścia poza zespoły ściśle układowe.

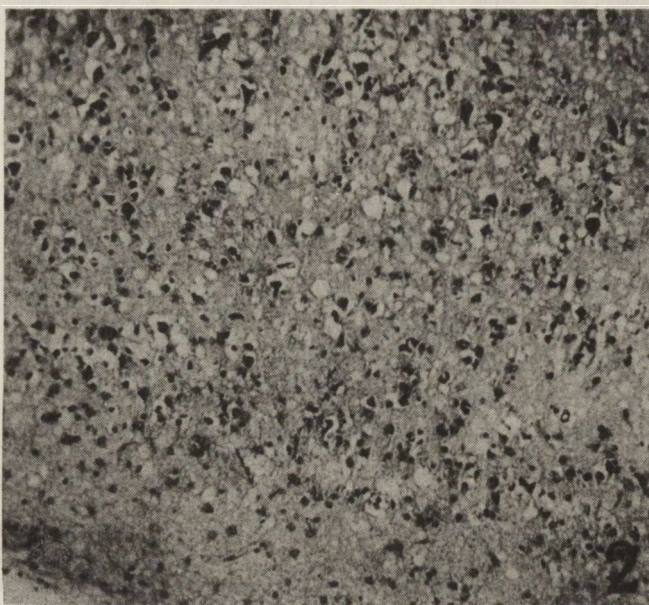


Fig. 2. Choroba Jakoba-Creutzfeldta. Stan gąbczasty w korze mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×
 Fig. 2. Jakob-Creutzfeldt disease. Spongy degeneration in the cerebral cortex. Cresyl violet. × 60

Te ostatnie z kolei, wykazujące rodzinne uwarunkowanie lub swoistą skłonność do określonych topograficznie uszkodzeń, sugerowały poszukiwania zaburzeń metabolicznych jako podłoża zmian tkankowych. Uzyskane w tej dziedzinie wyniki, jak wykrycie zaburzeń przemiany miedzi w zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym, doprowadziły do zaliczania odtąd tego schorzenia do chorób metabolicznych. Ta właśnie grupa chorób rozrastała się szybko w związku z wykrywaniem coraz większej liczby enzymopatii. Zmiany w układzie nerwowym powstające w ich przebiegu można było w wielu przypadkach

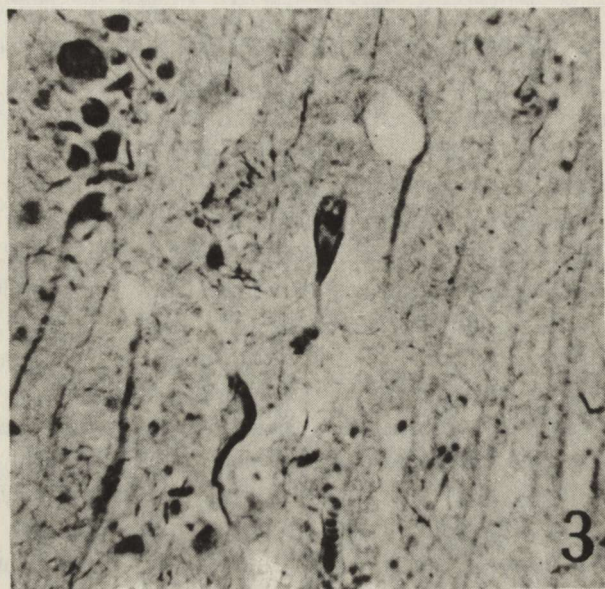
nazwać zwyrodnieniowymi. Przekonywującym przykładem tego może być zwyrodnienie gęłowe ze gębczeniami obserwowane w zaburzeniach metabolizmu aminokwasów.

Powyższe przykłady mogą służyć jako ilustracja narastających problemów diagnostyczno-klasyfikacyjnych. W obliczu coraz liczniejszych, w miarę postępu badań, pytań Seitelberger (1975) zaproponował, aby ostatecznie rozszerzyć pojęcie zwyrodnienia w układzie nerwowym, obejmując nim zmiany dotyczące wszystkich elementów neuroektodermalnych, w których dochodzi do atrofii lub dystrofii. Do tak pojętych procesów zwyrodnieniowych zaliczył on trzy grupy procesów chorobowych: 1) enzymopatie, 2) procesy związane ze zmianami zależnymi od wieku (wśród nich wyróżniał zaniki neurogenne, zwykle układowe, zwyrodnienia srebrofilne, lipopigmentowe oraz zwyrodnienia gęłowe), 3) pseudozwyrodnienia. Podział ten pozwala zaliczyć do ostatniej z grup typowe pod względem morfologicznym zwyrodnienia o znanej etiologii. Przykładem nie zakończonej ostatecznie dyskusji w tej sprawie może być choroba Creutzfeldta-Jakoba, którą uznawano za pseudozwyrodnienie w chwili wykrycia jej przekazywalnego charakteru. Typ jej dziedziczenia, w niektórych przypadkach rodzinnych, zasugerował następnie możliwość wniknięcia wywoławczego czynnika patogennego do genomu (Haltia i wsp. 1979). Doprowadziło to w konsekwencji do przypuszczenia, że należy on do grupy prionów, co spowodowało przynajmniej u niektórych autorów tendencję do włączenia tego schorzenia do grupy wirusowych zapaleń mózgu (Berard-Badier 1987). Powstaje przy tym oczywiste pytanie, czy przyjmując za Seitelbergerem szeroko rozumiane pojęcie zespołu zwyrodnieniowego nie należy utrzymać choroby Creutzfeldta-Jakoba w grupie pseudozwyrodnień, z którą łączy ją charakterystyczna struktura procesu patologicznego? Decyzja taka miałaby charakter precedensowy ze względu na inne pokrewne jednostki chorobowe, takie na przykład, jak rodzinnie występująca podostra encefalopatia gębczasta Gerstmannna-Strausslera-Scheinkeera, w której stwierdzono niepodważalnie przekazywalność procesu (Schumm i wsp. 1981).

Koncepcja szerokiego rozumienia pojęcia choroby lub procesu zwyrodnieniowego znajduje coraz liczniejszych zwolenników. Dyken i Krawiecki (1983) wymieniają ponad 600 jednostek chorobowych z tej grupy u dzieci, a około 100 u dorosłych włączając do nich nawet dyskusyjne jednostki, w których struktura procesu nie jest typowo zwyrodnieniowa. Innym wyrazem poszerzenia grupy zespołów zwyrodnieniowych, także w obrębie zmian układowych, jest zakwalifikowanie przez Wellera i wsp. (1983) do nabytych zwyrodnień układowych nie tylko zgodnie z tradycją wiądu rdzenia, ale również kolejno opisywanych cerebellopatii: nowotworowej, po zatruciu alkoholem czy fenytoiną.

Niezależnie jednak od większego lub mniejszego rozbudowania grupy chorób zwyrodnieniowych jej trzon stanowią nadal procesy związane ze zmianami zależnymi od wieku. Mieszczą się w niej klasyczne zespoły zwyrodnień układowych o nie znanej dotąd etiopatogenezie. Najnowsze badania

rokuja jednak istotny postęp i w tym zakresie. W grupie zwyrodnień przedstarczych szczególną pozycję zajmuje choroba Alzheimera ze względu zarówno na częstość występowania, jak i zespół charakterystycznych dla niej zmian w ośrodkowym układzie nerwowym. Typowym elementem tego zespołu są zmiany srebrochłonne występujące w postaci płytek starczych i włókienkowego zwyrodnienia neuronów (ryc. 3), przedstawiającego w badaniach ultra-



Ryc. 3. Zwyrodnienie włókienkowe neuronów i świeża płytka starcza. Impregnacja metodą Bodiana. Pow. 200 ×

Fig. 3. Fibryllary degeneration of neurons and small senile plaque. Bodian impregnation. × 200

strukturalnych obraz nagromadzenia parzystych neurofilamentów. Podobne zmiany, choć mniej liczne, spotyka się w fizjologicznym starzeniu się mózgu, a także w mongolizmie. W tym ostatnim przypadku traktowane są również jako wyraz przedwczesnego zużycia tkanki. Choroba Alzheimera jest w ostatnich latach przedmiotem szczególnie intensywnych i wielokierunkowych badań. W jej patogenezie rozważano między innymi rolę zmian w syntezie białek układu nerwowego oraz dysfunkcję bariery krew-mózg (Wiśniewski i wsp. 1985). Ostatnie badania tego zespołu wskazują na możliwość wykrycia genetycznie uwarunkowanej skłonności do przedwczesnego powstawania zmian charakteryzujących chorobę Alzheimera (Wiśniewski 1987). Zaistnienie wówczas możliwość uznania tego schorzenia za zwyrodnienie o określonej etiopatogenezie. Nie przesądzając wyników aktualnie prowadzonych badań nad innymi schorzeniami, m.in. stwardnieniem zanikowym bocznym, mamy prawo przewidywać, że stopniowo wykrywane będą przyczyny powstawania coraz większej liczby chorób i procesów zwyrodnieniowych. Należy oczekiwać,

że ich etiologia okaże się zróżnicowana, a wspólną pozostanie podobna struktura procesu chorobowego, stanowiąca wyraz powolnego obumierania tkanki nerwowej pod wpływem działających przewlekłe endo- lub egzogennych czynników szkodliwych. Należy przeto przypuszczać, iż pojęcie zespołu zwyrodnieniowego nie utraci swojej racji bytu w diagnostyce neuropatologicznej.

EVOLUTION OF VIEWS ON THE DEGENERATIVE PROCESSES AND DISEASES OF THE NERVOUS SYSTEM

Summary

The evolution of views on degenerative processes and diseases is briefly presented. The author reminds us that classification based on clinico-morphological symptoms leads to construction of the meaning degeneration to primary neuronal damage. Afterwards she presents a broader meaning of degenerative syndrome and discusses the difficulties of classification connected with the discovery of the pathogenic factor in successive disease units.

ЭВОЛЮЦИЯ ВЗГЛЯДОВ НА ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ БОЛЕЗНИ И ПРОЦЕССЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Целью разработки является краткое представление развития взглядов, касающихся дегенеративных болезни и процессов нервной системы. Автор напоминает, что классификация основанная на клиническо-морфологических признаках привела к ограничению понятия дегенерации в нервной системе до первичного повреждения нейронов. Затем, согласно с прогрессом знания, представляется расширение понятия дегенерационного синдрома и обсуждается классификационные трудности, связанные с обнаружением этиопатогенеза очередных нозологических единиц.

PIŚMIENICTWO

1. Berard-Badier M.: Essai de classification des encéphalites. Thèse de doctorat en biologie humaine. Marsylia, 1987.
2. Dyken P., Krawiecki N.: Neurodegenerative diseases of infancy and childhood. *Ann. Neurol.*, 1983, 13, 351–364.
3. Greenfield's Neuropathology. Fourth Edition. Red. J. H. Adams, J. A. N. Corsellis, L. W. Duchon. Wyd. E. Arnold, London 1984.
4. Haltia M., Kovanen J., van Grevel H., Bots G. Th. A. M., Stefanko S.: Familial Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci.*, 1979, 42, 381–389.
5. Mott F.: 1900 cyt. wg. van Bogaert 1949.
6. Olszewski J.: Introduction to degenerative disease, part XIV, Probable metabolic degenerations W: Pathology of the nervous system. Red. J. Minckler, vol. 1, 1968, Mc Graw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, Dusseldorf, Johannesburg, Kuala Lumpur, London, Mexico, Montreal, New Delhi, Panama, Rio de Janeiro, Singapore, Sydney, Toronto, 1109–1113.
7. Opalski A.: Histopatologia układu nerwowego. Lekarski Instytut Naukowo-Wydawniczy, Warszawa 1949.
8. Paget J.: 1852 cyt. wg. van Bogaert 1949.

9. Raymond F.: Les maladies dites familiales sénescence physiologique, prématurée, localisée a certains systèmes organiques. *Bull. Med.*, 1908, 1, 583–588.
10. Schaffer K.: Über die morphologische Wesen und die Histopathologie der hereditären, systematischen Nervenkrankheiten. Springer, Berlin 1926.
11. Schumm F., Bowllard J. W., Schlote W., Stohr M.: Morbus Gerstmann-Straussler-Scheinker. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1981, 230, 179–196.
12. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia the concept of glial syndromes. W: *Proceedings VIth International Congress of Neuropathology*. Paris 1970, 392–406.
13. Seitelberger F.: General pathology of the degenerative diseases of the Central Nervous System. *Handbook of Clinical Neurology*. Red. Vinken. A. Bruyn. North Holland, Amsterdam 1975, Vol, 21, str. 43–71.
14. Spielmeyer W.: Zum Problem des Systemerkrankungen. *Jahrb. Neurol. Psychiat.*, 1934, 51, 256–266.
15. Van Bogaert L.: Les maladie systematisées. *Traité de Medicine*. Vol. XVI, Masson, Paris 1949, str. 142–218.
16. Weller R. O., Swasch M., Mc Lellan D. L., Schotz C. L.: *Clinical neuropathology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1983.
17. Wiśniewski H. M., Merz G. S.: *Neuropathology of the aging brain and dementia of the Alzheimer type*. W: *Aging 2000: our Health Care Destin*. Red. Gaitz, A. Samorajski, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1985, Vol. I, str. 231–243.
18. Wiśniewski H. M.: *Clinic, morphology and biochemistry of Alzheimer disease*. Konferencja SNP, Gdańsk 1987.

Adres autorki: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

MIECZYŚLAW WENDER, HANNA HEJDUK-HANTKE, **ANDRZEJ GONCERZEWICZ**,
HALINA WYGLĄDALSKA-JERNAS

MORPHOMETRY OF MYELIN IN THE AGING HUMAN BRAIN

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Studies of the cerebral nervous fibers in the aging brain have been mainly concentrated on morphological changes visible in axons and myelin sheaths. In ultrastructural studies Iwanowski and Ostenda (1974), Iwanowski (1984) revealed disintegration of the intraperiod line, formation of loops, vesicles and irregular multivesicular structures. The changes in myelin were often accompanied by axon lesions. Concomitant perivascular gliosis indicated an increased permeability of blood vessel walls due to degenerative changes. England and Brun (1986), in neuropathological studies of the white matter in dementia of Alzheimer type, established changes in 60% of cases, consisting of a reduced number of oligodendrocytes, partial loss of axons and myelin sheaths and mild reactive gliosis. Chemical studies of myelin lipids in aging brain demonstrated an increase in lysophosphatidylcholine, a tendency to increase cholesterol esters and the majority of phospholipid fractions, whereas sulfatides were decreased (Wender et al. 1987).

However, morphological studies, including ultrastructural ones, demonstrated changes only in some nervous fibers, in axons, as well as in myelin sheaths of the aging brain, and to our knowledge the problem whether the others are in fact normal or not is still open. Therefore, we evaluated the nervous fibers morphometrically in corpus callosum of the aging human brain.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on autoptic material of four patients, who died at the age of 70 to 80 years (mean age 74.5 years). The death—autopsy interval varied from 3 to 8 hours. The results were compared with those obtained on autoptic material of three patients at the age of 29 to 49 years (mean age 34.7), who died of diseases not involving the nervous system.

Sections were taken from the central part of corpus callosum and fixed by immersion in a cold mixture of 3.6% paraformaldehyde and 4.6% glutaraldehyde, buffered to pH 7.4 with 0.1 M sodium cacodylate, according to Karnovsky (1965). This was followed by overnight washing in cold cacodylate buffer. Then narrow strips of corpus callosum were cut parallelly to the long axis of the majority of nervous fibers. This was followed by 1 hour postfixation in 1% osmium tetroxide and routine dehydration. Subsequently, these strips of tissue were placed in special rubber molds to secure their position. After routine embedding in Epon, sections perpendicular to the long axis of myelinated fibers could be obtained. After this adjustment, ultrathin sections were cut on Reichert's Ultratome, collected on coated grids, stained with uranium and lead salts and photographed in an Opton electron microscope.

The fields sampled for photography were randomly selected across the whole area of the sample. However, the marginal parts were excluded from the study.

Usually, twelve adjacent non-overlapping micrographs with strict reference to the grid bar were taken from each area at a primary magnification $\times 10\,000$. Eight to ten of those areas sufficed to obtain the appropriate number of axons for counting.

The final measurements were performed on prints magnified photographically to $\times 35\,000$ with Reichert's Multioperational Planimeter. Only the axons, the entire and transversally cut (forms from 0.8 to 1.0) profiles fully accommodated within the area of the micrograph were counted. Thus, such values as axonal diameter, area, circumference and extent of obliquity as well as the thickness of the axon myelin sheath were estimated and computed automatically in working units, and presented after recalculation based on the generally accepted value for the myelin unit — 12 nm (Kirschner et al. 1984). Moreover, the number of myelin lamellae for every measured axon was counted manually.

Moreover, in searching for possible relationships between the above mentioned values, the following ratios were estimated for each axon:

1. The ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae ("compaction index"),
2. The ratio of axon surface area to the number of myelin lamellae.

RESULTS

The axon diameter, circumference and surface area, thickness of myelin, number of myelin lamellae, ratio of axon area to the number of myelin lamellae and ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae were significantly higher in the corpus callosum of aged persons than the respective values found in the control material. It should be stressed that in all cases of aged brain the obtained values were higher than those established in cases of young adult persons (Tables 1 to 3).

Table 1. Nervous fibers of human aging brain (corpus callosum). Axon diameter, circumference and surface area in working units

Tabela 1. Włókna nerwowe starzejącego się mózgu człowieka (spoidło wielkie). Przekrój aksonu, obwód i pole w jednostkach roboczych

Studied group Grupa badana	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value wartość „t”
Axon diameter Przekrój aksonu						
Aging brain Mózg starczy	290	1.02	0.23	2.97	0.41	
Control brain Mózg kontrolny	527	0.77	0.25	3.54	0.42	8.17**
Axon circumference Obwód aksonu						
Aging brain Mózg starczy	290	3.09	0.58	9.05	1.29	
Control brain Mózg kontrolny	527	2.32	0.41	9.21	1.14	8.79**
Axon area Pole aksonu						
Aging brain Mózg starczy	290	18.66	0.55	141.92	17.01	
Control brain Mózg kontrolny	527	11.20	0.70	130.38	12.47	7.42**

$$t_{0.01} = 2.58$$

** statistically highly significant
wysoce istotne statystycznie

The ratio of the number of myelin lamellae to the axon diameter expressed as the regression equation, showed also differences between aging and control brains. In the first group a significant regression of second grade (parabolic) was established, whereas in the second one a linear regression of first grade was significant. The results are presented in Table 4.

The thickness of myelin, number of myelin lamellae, the ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae and the ratio of the axon area to the number of myelin lamellae were related to the axon diameter, in three classes comprising 25% (smallest), 50% (medium) and 25% (largest) of all axons in aged and control brains. The differences were most pronounced in the medium class of axon diameter (see Table 5). The positive correlation between the number of myelin lamellae and axon diameter was highly significant both in aged and control brains (Table 6).

Table 2. Nerve fibers of aging human brain (corpus callosum). Thickness of myelin in working units and number of myelin lamellae

Tabela 2. Włókna nerwowe starzejącego się mózgu człowieka (spoidło wielkie). Grubość mieliny w jednostkach roboczych i liczba blaszek mieliny

Studied group Grupa badana	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value wartość „t”
Thickness of myelin Grubość mieliny						
Aging brain Mózg starczy	290	0.28	0.05	0.58	0.11	
Control brain Mózg kontrolny	527	0.17	0.04	0.53	0.07	17.2**
Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny						
Aging brain Mózg starczy	290	17.3	2.0	38.0	7.7	
Control brain Mózg kontrolny	527	12.7	2.0	35.0	5.2	10.2**

$$t_{0.01} = 2.58$$

** statistically highly significant
wysocze istotne statystycznie

Table 3. Nerve fibers of aging human brain (corpus callosum). Ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae and ratio of axon surface area to the number of myelin lamellae

Tabela 3. Włókna nerwowe starzejącego się mózgu człowieka (spoidło wielkie). Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek i stosunek pola aksonu do liczby blaszek mieliny

Studied group Grupa badana	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t,, value wartość „t”
Ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny				
Aging brain Mózg starczy	290	0.016	0.003	
Control brain Mózg kontrolny	527	0.013	0.002	3.72**
Ratio of axon area to the number of myelin lamellae Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny				
Aging brain Mózg starczy	290	1.08	0.31	
Control brain Mózg kontrolny	527	0.88	0.24	4.87**

$$t_{0.01} = 2.58$$

** statistically highly significant
statystycznie wysocze istotne

Table 4. Nervous fibers of human aging brain (corpus callosum). Regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter (in working units)

Tabela 4. Włókna nerwowe starzejącego się mózgu człowieka (spoidło wielkie). Równanie regresji liczby blaszek mieliny do przekroju aksonu (w jednostkach roboczych)

Aging brain Mózg starczy			Control brain Mózg kontrolny		
Number of myelin lamellae Liczba blaszek	Number of axons in the class Liczba aksonów	Axon diameter (mean) Przekrój (średnia)	Number of myelin lamellae Liczba blaszek	Number of axons in the class Liczba aksonów	Axon diameter (mean) Przekrój (średnia)
2	1	0.38	2	2	0.67
3	3	0.75	3	7	0.76
4	6	0.71	4	7	0.47
5	6	0.76	5	11	0.54
6	10	0.92	6	18	0.63
7	5	0.82	7	24	0.53
8	10	0.83	8	40	0.56
9	13	0.94	9	42	0.70
10	17	0.95	10	56	0.65
11	10	0.97	11	37	0.74
12	14	0.94	12	52	0.79
13	10	1.11	13	37	0.73
14	9	0.99	14	31	0.74
15	11	1.03	15	32	0.84
16	14	1.18	16	21	0.74
17	3	0.90	17	17	0.80
18	15	1.25	18	16	1.14
19	13	1.28	19	19	0.89
20	9	0.94	20	19	0.98
21	13	1.02	21	7	1.22
22	13	0.93	22	6	1.56
23	12	0.98	23	9	1.41
24	15	1.10	24	4	1.17
25	13	1.04	25	2	1.46
26	8	1.13	26	5	0.99
27	11	0.99	27	1	1.46
28	6	1.44	29	1	0.60
29	6	1.00	30	2	0.76
30	5	1.39	33	1	1.53
31	2	0.61	35	1	1.45
32	4	1.22			
33	2	0.83			

Significant regression of II grade
(Parabolic)
Istotna regresja stopnia II
(paraboliczna)

Significant regression of I grade
(linear)
Istotna regresja stopnia I
(liniowa)

Table 5. Axon-myelin interrelationship in the aging brain (corpus callosum). Division into classes according to Dx (diameter of axon)

Tabela 5. Stosunek akson-mielina w starzejącym się mózgu (spoidło wielkie). Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu)

	Thickness of myelin Grubość mieliny		Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny		Ratio of thickness of myelin to the number of myelin lamellae Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny		Ratio of axon area to the number of myelin lamellae Stosunek pola aksonu do liczby blaszek mieliny	
	Aging brain Mózg starczy	Control brain Mózg kontrolny	Aging brain Mózg starczy	Control brain Mózg kontrolny	Aging brain Mózg starczy	Control brain Mózg kontrolny	Aging brain Mózg starczy	Control brain Mózg kontrolny
Class I								
Klasa I	0.18±0.07	0.14±0.03**	10.2±5.2	10.6±4.0	0.017±0.004	0.013±0.001**	0.52±0.14	0.50±0.12
Class II								
Klasa II	0.27±0.11	0.19±0.04**	17.8±7.8	13.0±5.0**	0.016±0.003	0.014±0.001**	1.12±0.27	1.06±0.24
Class III								
Klasa III	0.32±0.14	0.31±0.13**	18.7±6.9	16.5±6.0*	0.017±0.003	0.013±0.001**	2.36±0.36	2.38±0.27

* difference statistically significant
różnica istotna statystycznie
p < 0.05

** difference highly statistically significant
różnica wysoce istotna statystycznie
p < 0.01

Mean Dx

Średnia Dx = 0.86±0.44

Class I

Klasa I = Dx ≤ 0.56 (25%)

Class II

Klasa II = 0.56 < Dx ≤ 1.16 (50%)

Class III

Klasa III = > 1.16 (25%)

Table 6. Axon-myelin interrelationship in the aging brain (corpus callosum). Correlation between the number of myelin lamellae and axon diameter

Tabela 6. Stosunek akson-mielina w starzejącym się mózgu (spoidło wielkie). Korelacja pomiędzy liczbą blaszek mieliny a przekrojem aksonu

	Aging brain Mean \pm S.D. Starczy mózg Średnia \pm S.D.	Control brain Mean \pm S.D. Mózg kontrolny Średnia \pm S.D.
Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny	17.3 \pm 7.7	12.7 \pm 5.2
Axon diameter Przekrój aksonu	1.02 \pm 0.41	0.77 \pm 0.42
Correlation coefficient Współczynnik korelacji	0.45**	0.53**

** highly statistically significant
statystycznie wysoce istotny

DISCUSSION

In the first part of our research program concerning the alterations of the human cerebral white matter in the course of the aging process we performed karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia. We found that the oligodendroglial nuclei are enlarged, have a tendency to spheric transformation, show an increase in the sum of extinction and some loosening of chromatin structure in cytophotometric estimations of relative DNA content in the aging brain (Wender et al. 1988). Heretofore presented morphometric studies of the apparently normal nervous fibers in the corpus callosum have demonstrated, that the axon diameter, circumference and area, thickness of myelin and number of myelin lamellae are greater in the aging brain as compared with those established for the young adult age. These findings are rather unexpected and their explanation may be only hypothetical. We think that, most probably during the aging process some kind of selective necrosis of nervous fibers takes place. First the thinner fibers are degraded and disappear and in this way the surviving ones with the above presented morphometrical diameter become bigger. The difference in the regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter between the aged and control brains seems also to represent the result of degenerative alterations of the axon-myelin interrelationship in aged individuals.

A little puzzling is the next observation, that the ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae was higher in the aging brains than in adult age. Both values are higher in the first group in comparison with the second one, therefore, the increase of the ratio must have been induced by the relatively greater rise in the value of myelin thickness than that in the number of myelin lamellae.

A general opinion exists, that in the adult brain, myelin sheaths and their axons exist in structural harmony. When sufficient myelin has been deposited, a plateau is reached, at which time active synthesis of myelin ceases (Raine 1984). The nature of the factor that determines its cessation when the period of myelin maturity is reached is unknown.

The results of investigations concerning myelin formation and the peak of myelinogenesis in the rat brain (Norton, Poduslo 1973; Adamczewska 1978) and in the optic nerve in rabbit (Adamczewska-Goncerzewicz 1982) indicate that accumulation of myelin does not end at the moment when the animal reaches sexual maturity, but continues further. The studies of Pankrac (1982) have also indicated that, in developing rat brain, myelin is accumulated up to the eleventh month of life, but in the subsequent month the rate of its deposition decreases and it ceases completely at the mentioned above critical age.

The exact time at which the deposition of myelin ceases in human is unknown. However, the assumption that the difference in myelin thickness between the young adult and aged brain is the result of myelin deposition during the time between these two periods of examination seems improbable. Therefore, the only explanation would involve lower compactness of the aged myelin, caused by the increase in intramembrane distances. When the distances are extremely large, they may even be visible in the ultrastructural picture, although they are not easy to distinguish from artifacts, owing to the inevitable delay of proper fixation of the autoptic material (Goncerzewicz, Wender 1987).

CONCLUSIONS

1. Axon diameter and area, thickness of myelin and number of myelin lamellae are greater in the apparently normal nervous fibers of the corpus callosum in the aged brain than in the young adult one.
2. In the course of the aging process selective necrosis of thinner nervous fibers takes place.
3. The age-associated change in the regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter testifies to the degenerative alteration in the axon-myelin interrelationship in the aging nervous fibers.
4. Aged myelin is characterized by a lowered compactness caused by the increase of intermembrane distances.

MORFOMETRIA MIELINY STARZEJĄCEGO SIĘ MÓZGU LUDZKIEGO

Streszczenie

Przeprowadzono badania morfometryczne włókien nerwowych spoidła wielkiego na materiale autopsyjnym, zmarłych w wieku 70 do 80 lat. Wyniki porównano z materiałem kontrolnym pacjentów zmarłych w wieku młodym dojrzałym.

Oznaczenia wykonywano na zdjęciach mikroskopowo-elektronowych, wykonując pomiary za pomocą wielozadaniowego planimetru Reicherta. Określano obwód, przekrój i pole aksonu oraz grubość i liczbę blaszek mieliny. Z powyższych danych obliczono dodatkowo wskaźniki grubości mieliny do liczby blaszek (wskaźnik zbitości) oraz pola aksonu do liczby blaszek.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Przekrój i pole aksonu, grubość mieliny i liczba blaszek mieliny są w pozornie prawidłowych włóknach nerwowych spoidła wielkiego większe w mózgu starczym w porównaniu z analogicznymi wartościami w mózgu osób młodych dorosłych,

2. W przebiegu procesu starzenia następuje wybiórczy zanik cieńszych włókien nerwowych.

3. Zmiana równania regresji liczby blaszek mieliny do przekroju aksonu podczas procesu starzenia wskazuje na występowanie zmian we wzajemnym stosunku akson-mielina w toku starzenia się włókien nerwowych.

4. Mielina w wieku starczym charakteryzuje się zmniejszeniem zbitości spowodowanym przez wzrost odległości międzybłonowych.

МОРФОМЕТРИЯ МИЕЛИНА СТАРЕЮЩЕГОСЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЗГА

Резюме

Проведены морфометрические исследования нервных волокон мозолистого тела в секционном материале умерших в возрасте от 70 до 80 лет. Результаты сравнивались с контрольным материалом больных умерших в молодом зрелом возрасте. Исследования проводились на электронно-микроскопических фотографиях совершая измерения при помощи исполняющего многочисленные задания планиметра Reiherta. Определялась окружность, поперечное сечение и площадь аксона, а также толщина и количество миелиновых бляшек. С выше упомянутых данных добавочно вычислены указатели толщины миелина к количеству бляшек (индекс плосности) и площадь аксона к количеству бляшек.

Результаты привели к следующим выводам:

1. Поперечное сечение и площадь аксона, толщина миелина и количество бляшек миелина в, с виду здоровых, нервных волокон мозолистого тела являются больше в старческом мозгу по сравнению с аналогичными частями в мозгу молодых зрелых людей.
2. Процесс старения приводит к селективному убытку более тонких нервных волокон.
3. Изменение уравнения регрессии количества миелиновых бляшек к поперечному сечению аксона в процессе старения показывает, что в течение старения нервных волокон наступают изменения в соотношении аксон-миелин.
4. Миелин в старческом возрасте характеризуется понижением плотности, вызванным увеличением расстояния между миелиновыми бляшками.

REFERENCES

1. Adamczewska Z.: Myelin lipids in the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 11–23.
2. Adamczewska-Goncerczewicz Z.: Rozwój nerwu wzrokowego królika w świetle badań lipidowych. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 305–313.

3. 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.
4. Goncerzewicz A., Wender M.: Morphology of neuroglia in aging: autopsy data. Abstracts of the VII Conference of the Association of Polish Neuropathologists 1987, Gdańsk, pp. 7–8.
5. Iwanowski L.: Myelin in the senile rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 219–223.
6. Iwanowski L., Ostenda H.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old age. *Alternveränderungen des zentralen Nervensystems. Material der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR. Mühlhausen (Thür.) 1974*, 121–122.
7. Karnovsky M.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 137A.
8. Kirschner D., Ganser A., Caspar D.: Diffraction studies of molecular organisation and membrane interactions in myelin. In: *Myelin*. Ed. P. Morell, Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 51–96.
9. Norton W., Poduslo S.: Myelination in brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 759–773.
10. Pankrac J.: Myelin formation in developing rat brain with particular reference to the late maturation period. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 19–29.
11. Raine C.: Morphology of myelin and myelination: In: *Myelin* Ed. P. Morell, Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 1–50.
12. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Szczech J., Godlewski A.: Pattern of myelin lipids in the aging brain. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 235–245.
13. Wender M., Godlewski A., Szczech J.: Oligodendroglia of the aging human brain (karyometric and cytophotometric studies). *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 561–572.

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

IRENA NIEBRÓJ-DOBOSZ, WIESŁAWA WIŚNIEWSKA,
MARIA BARCIKOWSKA-LITWIN

INFLUENCE OF AGING ON DENSITY OF MYELIN FRACTIONS
ISOLATED FROM HUMAN BRAIN WHITE MATTER.
PRELIMINARY REPORT

Department of Neurology, Medical School, Warsaw

Recent studies have shown that the yield of myelin isolated from human brain declines in advanced age (Berlet, Volk 1980; Berlet et al. 1982; Niebrój-Dobosz et al. 1986). It was supposed that the decrease is due to a greater loss of myelin heavy fragments but no support was found to this assumption.

In the presented study myelin, isolated from human brain white matter of adults at various ages, was separated into different fractions in order to establish the exact age when the myelin yield starts to decline and which of the myelin fractions is mainly responsible for this.

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of eight cases aged from 25 to 91 years. There was no clinical and autopsy evidence of central nervous system involvement. The diagnoses were: muscle disease, polyneuropathy, heart infarct, pneumonia. In all cases autopsy was performed 24 hours after death. For histological studies formalin-fixed and paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin-eosin and the same sections were used for biochemical studies. The material was washed several times in water at 4°C to remove formalin, dried on Whatman paper No. 1 and weighed. White matter dry weight was determined in a conventional gravimetric way. Myelin was separated by the method of Agrawal et al. (1974) in a VAC 601 ultracentrifuge (Janetzki) in a discontinuous sucrose gradient. After centrifugation light myelin, heavy myelin and membrane fraction were separated at sucrose concentrations of 0.32 M, 0.55 to 0.75 M and 0.85 M, respectively. To check the exact distribution of the particular myelin fractions in the sucrose gradient, 0.5 ml fractions were

collected and their turbidity measured at 660 nm in a Specol spectrophotometer (Zeiss, Jena). Afterwards, the collected myelin fractions were diluted with distilled water, and weighed after centrifugation at $100\,000 \times g$ during 15 minutes. The proportion of the myelin fractions was calculated assuming the weight of light myelin as equal to 1.0.

RESULTS

The dry weight of brain white matter changed during the adult human lifespan in narrow limits. The highest values appeared at the fourth decade of life, thereafter a progressive decrease of the percentage of white matter dry weight was noted. The decrease was especially pronounced in the seventh decade of life (Table 1), and also later on. The yield of isolated myelin was

Table 1. White matter weight and yield of myelin in adults

Tabela 1. Waga istoty białej i zawartość mieliny u dorosłych

Age (yrs)	White matter dry weight % of wet weight	Myelin yield mg per g of white matter	Myelin yield expressed as % of that of 25-year-old subject	Proportion of myelin fractions Light myelin:heavy myelin: membrane fraction
Wiek (lat)	Sucha waga istoty białej % wagi całkowitej	Zawartość mieliny w istocie białej mg na g istoty białej	Zawartość mieliny wyrażona jako % ilości u osobnika 25-letniego	Stosunek frakcji mielinowych Mielina lekka:mielina ciężka: frakcja błonowa
25	32.3	368.1	100.0	1:0.48:0.90
39	32.4	398.5	108.3	1:0.62:0.76
41	36.3	436.6	118.6	1:0.60:0.66
51	34.1	387.7	94.7	1:0.85:1.14
60	34.5	293.1	79.7	1:0.70:0.90
74	29.4	291.6	79.2	1:1.25:2.47
81	28.1	239.8	65.1	1:1.11:3.77
91	29.4	199.2	54.1	1:2.66:2.72

highest in the 41-year-old subject, in the older cases it was markedly lower, reaching in the 91-year-old subject a value amounting to nearly half of that at the age of 25 years (45.9%). The proportions of particular myelin fractions were similar to each other in the younger cases, distinct change appeared in the 74-year-old, and in older subjects. The weight of the membrane fractions exceeded in these cases that of the other fractions. In the 81- and 91-year-old subjects there was a distinct tendency of the membrane fraction, and also to some extent the heavy myelin fraction, to dissociate into two fractions as regards optical density (Fig. 1a and Fig. 1b).

DISCUSSION

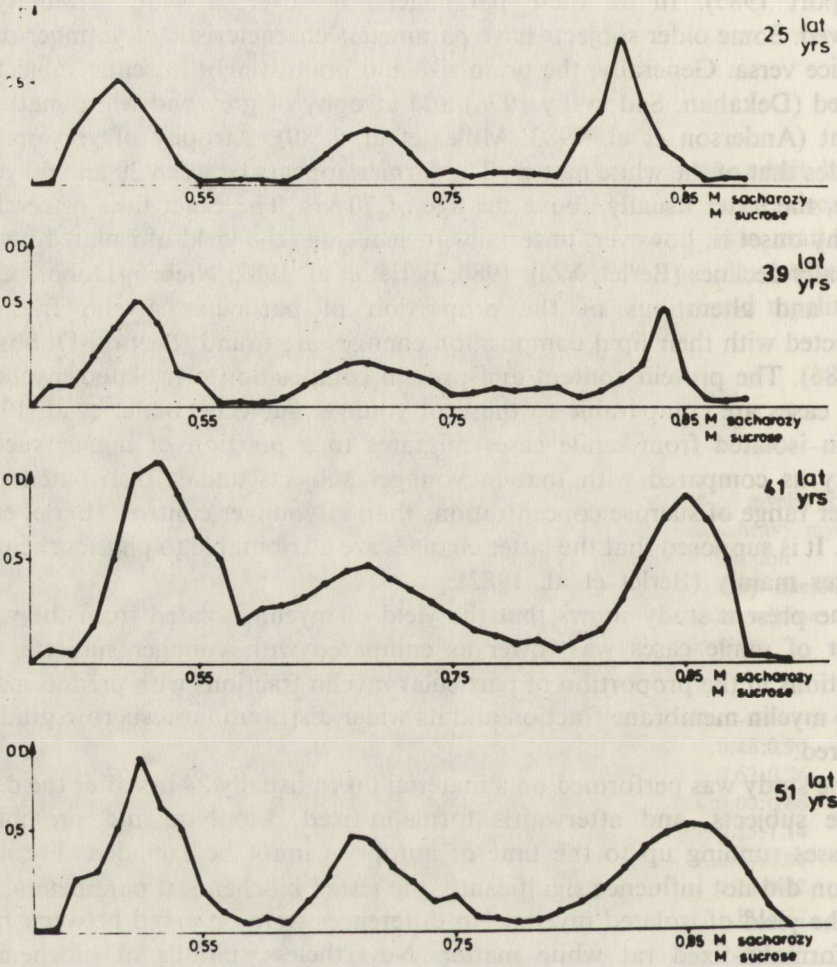
Anatomical, morphological and biochemical differences between young and old human brain have already been described (for review see Creasey, Rapoport 1985). In all these parameters, however, a wide variability is observed. Some older subjects have parameters characteristic of younger ones, and vice versa. Generally, the brain size and brain weight in senile subjects is reduced (Dekaban, Sadowsky 1978) and atrophy of grey and white matter is present (Anderson et al. 1983; Miller et al. 1980). Atrophy of grey matter precedes that of the white matter. The former appears between 20 and 50 years of life, the latter usually above the age of 70 yrs. The exact time of cerebral atrophy onset is, however, uncertain. In senile age the yield of isolated myelin gradually declines (Berlet, Volk 1980; Berlet et al. 1982; Niebrój-Dobosz et al. 1986) and alterations of the proportion of particular myelin fractions connected with their lipid composition changes are found (Niebrój-Dobosz et al. 1986). The protein content and protein composition of isolated myelin in senile cases are comparable to those of younger subjects (Berlet et al. 1982). Myelin isolated from senile cases migrates to a position of higher sucrose density as compared with that in younger subjects and is distributed over a wider range of sucrose concentrations than in younger controls (Berlet et al. 1982). It is supposed that the latter changes are attributable to physicochemical changes mainly (Berlet et al. 1982).

The present study shows that the yield of myelin isolated from the white matter of senile cases was lower as compared with younger subjects, and alterations in the proportion of particular myelin fractions with predominance of the myelin membrane fraction and its wider distribution in sucrose gradient occurred.

The study was performed on a material taken usually 24 hrs after the death of the subjects, and afterwards formalin-fixed. Lipolytic and proteolytic processes running up to the time of autopsy cannot be excluded. Formalin fixation did not influence significantly the tested biochemical parameters, and also the yield of isolated myelin. No differences were observed between fresh and formalin-fixed rat white matter. Nevertheless, pitfalls of biochemical studies on autopsy and also formalin-fixed material are well known and because of these the study should be treated as a pilot and preliminary one.

The observed lower yield of isolated myelin in senile cases may be the result of white matter atrophy. Decreased recovery of myelin cannot be, however, excluded as usually less than half the amount of myelin of the nervous tissue is recovered (Norton, Poduslo 1973) and this may be changed in senile age. The observed alteration of the proportion of particular myelin fractions with myelin membrane fraction predominance may be the consequence of a decreased ability to form compact myelin sheaths from glial plasma membranes. The higher proportion of myelin membrane fraction explains the observation of Berlet et al. (1982) of myelin migration to higher sucrose

la



1b

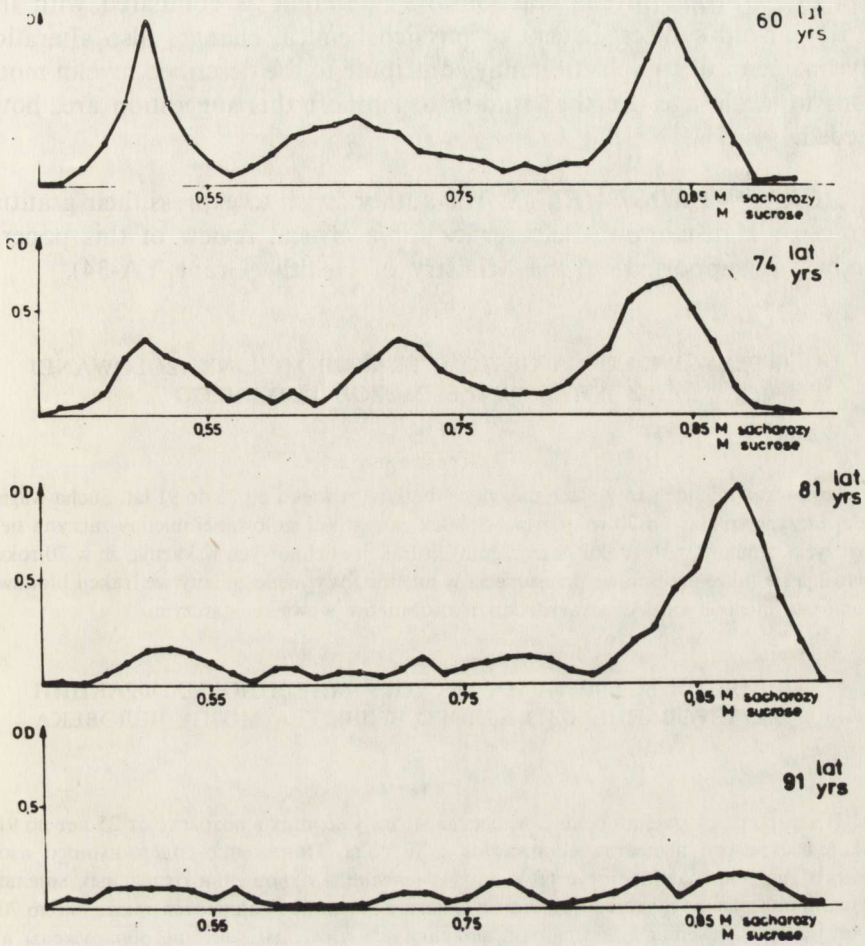


Fig. 1a, 1b. Distribution of myelin fractions in a discontinuous sucrose gradient
 Ryc. 1a, 1b. Rozdział frakcji mieliny w nieciągłym gradiencie sacharozy

densities in senile cases. It was already supposed (Berlet et al. 1982) that the latter change and also the greater heterogeneity of senile myelin are due to physicochemical changes solely. According to our previous observation (Niebrój-Dobosz et al. 1986) in the tested 91-year-old case the lipid composition of particular myelin fractions was different as compared with that of a 51-year-old subject. Except of physicochemical changes also alterations in myelin chemical composition may contribute to the described myelin modifications in senile age. Further studies to support this suggestion are, however, needed.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors wish to express their gratitude to Professor Hausmanowa-Petrusewicz for a critical review of this paper. The study was supported by the Ministry of Health (Grant YA-34).

WPLYW WIEKU NA GĘSTOŚĆ FRAKCJI MIELINY IZOLOWANEJ Z ISTOTY BIAŁEJ MÓZGU LUDZKIEGO

Streszczenie

Izolowano mielinę istoty białej mózgu osobników w wieku od 25 do 91 lat. Sucha waga istoty białej zaczyna spadać od 70 roku życia. Spadek zawartości izolowanej mieliny zaczyna się od 60 roku życia. Zmiany w stosunku poszczególnych frakcji mielinowych wskazują, że w 70 roku życia pojawiają się także jakościowe przesunięcia w mielinie. Wyraźnie zmiany we frakcji błonowej, jak również w mielinie ciężkiej stwierdzono u osobników w wieku starczym.

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА НА ГУСТОТУ МИЕЛИНОВЫХ ФРАКЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Изолировался миелин белого вещества мозга умерших в возрасте от 25 лет до 91 года. Цухой вес белого вещества понижается с 70 года. Понижение содержимого изолированного миелина начинается с 60 года. Изменения в отношении отдельных миелиновых фракции показывают, что качественные сдвиги в миелине появляются также около 70 года. Отчетливые изменения в мембранной фракции и в тяжелом миелине обнаружены в старческом возрасте.

REFERENCES

1. Agrawal H. C., Trotter J. L., Burton R. M., Mitchell R. F.: Metabolic studies on myelin. Evidence for a precursor role of myelin subfraction. *Biochem. J.*, 1974, 140, 99–109.
2. Anderson J. M., Hubbard B. M., Coghill G. R., Slidders W.: The effect of advanced old age on the neurone content of cerebral cortex. Observations with an automatic image analyser point counting method. *J. Neurol. Sci.*, 1983, 58, 235–246.
3. Berlet H. H., Volk B.: Age-related heterogeneity of myelin basic protein isolated from human brain. In: *Aging of the Brain and Dementia*. Eds. L. Amaducci, A. N. Davison, P. Antuono. Raven Press, New York, 1980, p. 81.
4. Berlet H. H., Ilzenhöfer H., Eohtenacher B., Volk B.: Old age alters density of myelin isolated from human brain. In: *Experimental Brain Research. The Aging Brain. Physiological and*

- Pathological Aspects. Ed. S. Hoyer. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, suppl. 5, 167–174.
5. Creasey H., Rapoport S. J.: The aging of human brain. *Ann. Neurol.*, 1985, 17, 1–17.
 6. Dekaban A. S., Sadowsky D.: Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann. Neurol.*, 1978, 4, 345–356.
 7. Miller A. K. H., Alston R. L., Corsellis J. A. N.: Variation with age in the volumes of grey and white matter in the cerebral hemispheres of man: measurements with an image analyser. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1980, 6, 119–132.
 8. Niebrój-Dobosz I., Rafałowska J., Barcikowska-Litwin M.: Brain myelin in senile patients with brain infarction. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 351–364.
 9. Norton W. T., Poduslo S. E.: Myelination in rat brain. Method of isolation of myelin. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749–757.

Authors' address: Department of Neurology, Medical School, 1a Banacha Str., 02-097 Warszawa.

IRMINA B. ZELMAN, ANNA TARASZEWSKA

HISTOLOGICZNA OCENA GLEJU W PROCESIE MIELINIZACJI U KRÓLIKA PT

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Proces rozwoju mieliny u królika pt, mutanta z hipomielinizacją ośrodkowego układu nerwowego (OUN), został szczegółowo opracowany w mikroskopie świetlnym (Zelman, Taraszewska 1984) i w mikroskopie elektronowym (Taraszewska 1983) oraz oceniony ilościowo w badaniach morfometrycznych (Taraszewska, Zelman 1985, 1986). W naszych dotychczasowych badaniach stosunkowo mało uwagi poświęcono populacji komórek glejowych, a zwłaszcza rozwojowi glejozy mielinizacyjnej, od której właściwego przebiegu zależy prawidłowa mielinizacja struktur ośrodkowego układu nerwowego. Z dotychczasowych naszych obserwacji wiadomo, że u królika pt opóźnionej i przedłużonej mielinizacji OUN towarzyszy wzmożona i przedłużona glejoza mielinizacyjna (Taraszewska, Zelman 1981; Zelman, Taraszewska 1984). W badaniach ultrastrukturalnych stwierdzono ponadto, że u mutanta pt występuje opóźnienie dojrzewania komórek oligodendrogleju (Taraszewska 1983). Powyższe wyniki uzyskano na materiale królików pt objawowych, badanych najwcześniej w wieku 14 dni, a więc w zaawansowanym okresie zmian premyelinizacyjnych, które rozwijają się ze znacznym wyprzedzeniem w stosunku do okresu rozwoju osłonek mielinowych (Schönback i wsp. 1968; Friede 1970).

U normalnego królika mielinizacja większości struktur rozpoczyna się wkrótce po urodzeniu (Almeida, Pearse 1958; Wender i wsp. 1969). Stosunkowo późno mielinizuje się spoidło wielkie, w którym pierwsze zmielinizowane włókna obserwowano dopiero pomiędzy 14 a 16 dniem życia (Dąmbska, Danielewicz-Kotowicz 1978; Taraszewska, Zelman 1986).

Celem niniejszej pracy było ustalenie, w jakim okresie ujawniają się u królika pt nieprawidłowości w obrębie populacji komórek glejowych oraz określenie różnic w histologicznym obrazie gleju pomiędzy zdrowym królikiem i mutantem pt w okresie premyelinizacyjnym, w trakcie mielinizacji włókien i po zakończeniu mielinogenezy.

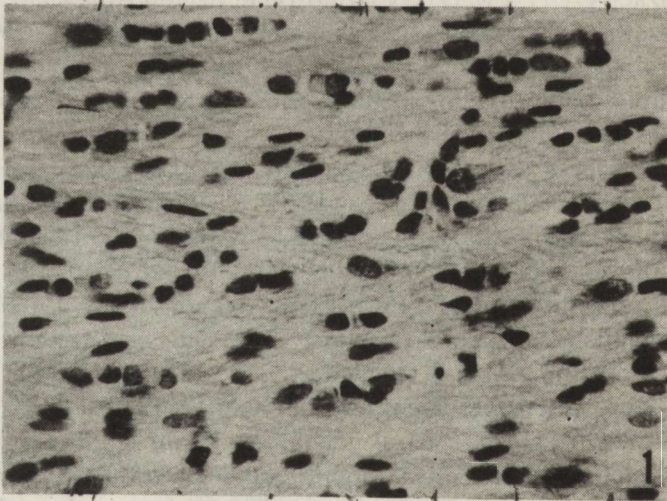
MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na materiale królików pt i kontrolnych w przedziale wieku od 5 dni do 5 miesięcy oraz na dorosłych królikach pt i kontrolnych w wieku 1 do 3 lat. W większości stanowiły one wyselekcjonowaną grupę, przeznaczoną do badań nad patologią mieliny u mutantu pt. Mózgi królików utrwalano *in situ* wykonując przezsercową perfuzję 10% roztworem zobojętnionej formaliny w soli fizjologicznej. Skrawki z 4 poziomów mózgu obejmujące obie półkule oraz wycinki z pnia mózgu wraz z mózdzkiem zatapiano w parafinie. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu oraz według metody Heidenhaina i Klüvera-Barrery. Króliki w wieku 5 i 8 dni życia, pt i kontrolne, stanowiły materiał archiwalny, wykorzystany uprzednio w pracy Taraszewskiej i Osetowskiej (1975) do oceny zmian patomorfologicznych w mózgach królików pt w okresie przedobjawowym.

Do celów niniejszej pracy zastosowano również impregnację według metody Cajala skrawków mrozkowych, pochodzących z bloków tkankowych utrwalonych w brom-formolu bezpośrednio po pobraniu z mózgu. Pochodziły one z mózgow królików pt i kontrolnych w wieku 1, 2 i 3 miesiące, a także dorosłych królików pt z poprawą kliniczną i zdrowych zwierząt w tym samym wieku.

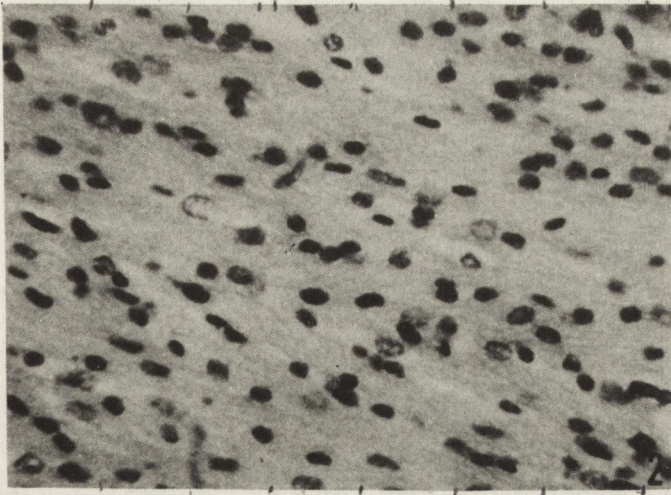
WYNIKI

U 5- i 8-dniowych królików pt i kontrolnych w spoidle wielkim widoczny jest wzrost gęstości komórek bez uchwytynych różnic pomiędzy zdrowym zwierzęciem i bezobjawowym w tym czasie mutantem. U 8-dniowych królików pt zwracają uwagę drobniejsze i słabiej zróżnicowane jądra komórkowe niż u królików kontrolnych w tym samym wieku (ryc. 1 i 2).



Ryc. 1. Królik kontrolny 8-dniowy. Proliferacja komórek glejowych w spoidle wielkim w okresie przedmielinizacyjnym. H.—E. Pow. 400 ×

Fig. 1. Control rabbit 8-day-old. Corpus callosum. Glial cells proliferation in premyelination period. H—E. ×400



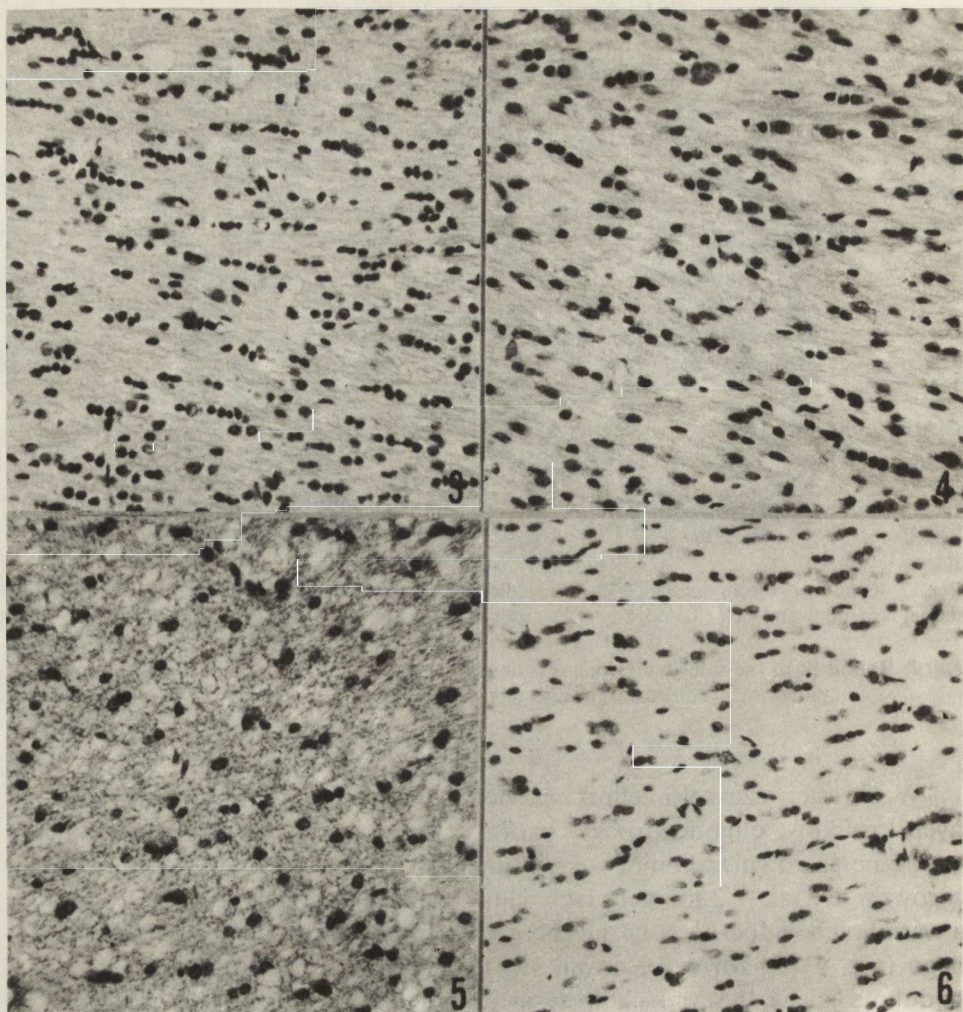
Ryc. 2. Królik pt w tym samym wieku. Spoidło wielkie. W porównaniu z kontrolą drobniejsze, słabiej zróżnicowane jądra komórkowe. Zagęszczenie komórek glejowych podobne jak w kontroli. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 2. Rabbit pt of the same age. Corpus callosum. Smaller and less differentiated glial nuclei as compared with controls. The cell density seems to be similar. H—E. ×400

W okresie wczesnej mielinizacji spoidła wielkiego, u zdrowych 1-miesięcznych królików, oligodendrocyty tworzą typowe dla tej struktury układy, ale widoczne są również komórki gleju mielinizacyjnego (ryc. 3). U królików pt zarówno 1-, jak i 2-miesięcznych jądra glejowe rozrzucone są chaotycznie, a wśród nich widoczne są liczne jasne jądra młodych postaci gleju mielinizacyjnego (ryc. 4). U zdrowych królików w wieku 2 miesięcy w spoidle wielkim, podobnie jak we wszystkich wcześniej mielinizujących się strukturach OUN, obraz komórkowy gleju jest taki sam jak u dorosłych zwierząt. Natomiast u królików pt w wieku 3 miesięcy i starszych stwierdzano nadal duże zagęszczenie jąder komórkowych z obecnością gleju mielinizacyjnego tworzącego często drobne skupienia. Tego typu zmiany obserwowano nie tylko w późno mielinizujących się strukturach, ale także w pasmach wzrokowych (ryc. 5 i 6), w których u zdrowych królików osłonki mielinowe widoczne są w mikroskopie świetlnym pomiędzy 2 a 4 dniem życia.

Różnice w nasileniu glejozy mielinizacyjnej i obrazie komórek glejowych, u zdrowego królika i u mutantu pt, są zróżnicowane w poszczególnych strukturach OUN odpowiednio do zaawansowania procesu mielinizacji. Są one najbardziej nasilone w tym okresie, w którym u normalnych królików faza najbardziej aktywnej mielinizacji włókien jest już zakończona. Wraz z postępem mielinizacji obserwuje się u królika pt stopniową normalizację obrazu komórkowego.

W impregnacji metodą Cajala astrocyty włókniste, u normalnych królików, występują w zróżnicowanej ilości w poszczególnych strukturach OUN. Najliczniej obserwowano je w podkorowej istocie białej mózgu i w istocie rdzennej



Ryc. 3. Królik kontrolny 1-miesięczny. Spoidło wielkie. Charakterystyczny szeregowy układ oligodendrocytów, widoczne również komórki gleju mielinizacyjnego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 3. Control rabbit 1-month-old. Corpus callosum with characteristic rows of oligodendroglial cells, myelination glia is also present. H—E. × 200

Ryc. 4. Królik pt w wieku 2 miesięcy. Chaotyczny układ komórek oligodendrogleju w spoidle wielkim. Widoczne liczne jasne jądra młodych postaci gleju mielinizacyjnego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 4. Rabbit pt 2-month-old. Irregular arrangement of glial cells in the corpus callosum. Numerous clear nuclei of young myelination glial cells. H—E. × 200

Ryc. 5. Królik kontrolny w wieku 3 miesięcy. Pasma wzrokowe. Obraz komórkowy gleju taki sam jak u dorosłego zwierzęcia. H—E. Pow. 200 ×

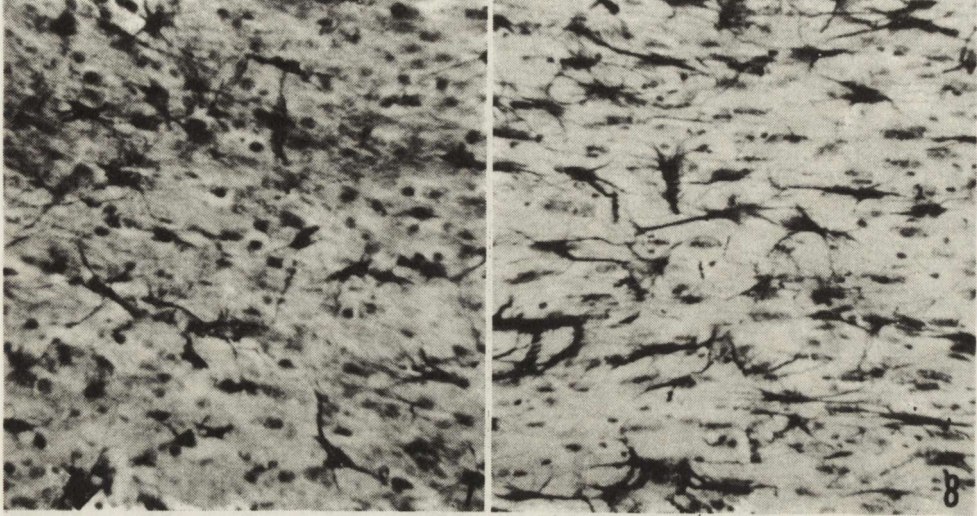
Fig. 5. Control rabbit 3-month-old. Optic tract. Glia pattern the same as in adult animals. H—E. × 200

Ryc. 6. Królik pt w wieku 3 miesięcy z ciężkim postępującym przebiegiem choroby. Pasma wzrokowe. Wzmocniona glejoza komórkowa z obecnością gleju mielinizacyjnego tworzącego nieregularne skupienia, nieregularny układ oligodendrogleju. Widoczne liczne, jasne jądra astrocytów. Fiolet krezyłu. Pow 200 ×

Fig. 6. Rabbit pt 3-month-old with severe protracted course of the disease. Optic tract. Increased cellular gliosis with the presence of myelination glia and numerous clear astrocytic nuclei. Irregular arrangement of oligodendrocytes. Cresyl violet. × 200

mózdzku, najmniej licznie w strukturach pnia mózgu. W okresie mielinizacji aksonów astrocyty włókniste wykazują cechy przerostu: mają większe ciała komórkowe, dłuższe i liczniejsze wypustki cytoplazmatyczne. Progresywne cechy astrocytów włóknistych zwiększają się wraz z postępem mielinizacji i ulegają regresji po jej zakończeniu.

U królika pt astrocyty włókniste są pomnożone w porównaniu do kontroli (ryc. 7 i 8) i to w okresie, w którym mielinizacja dopiero się rozpoczyna lub



Ryc. 7. Królik kontrolny w wieku 1 miesiąca. Astrocyty włókniste w spoidle wielkim. Cajal. Pow. 200 ×

Fig. 7. Control rabbit 1-month-old. Fibrous astrocytes in the corpus callosum. Cajal. ×200

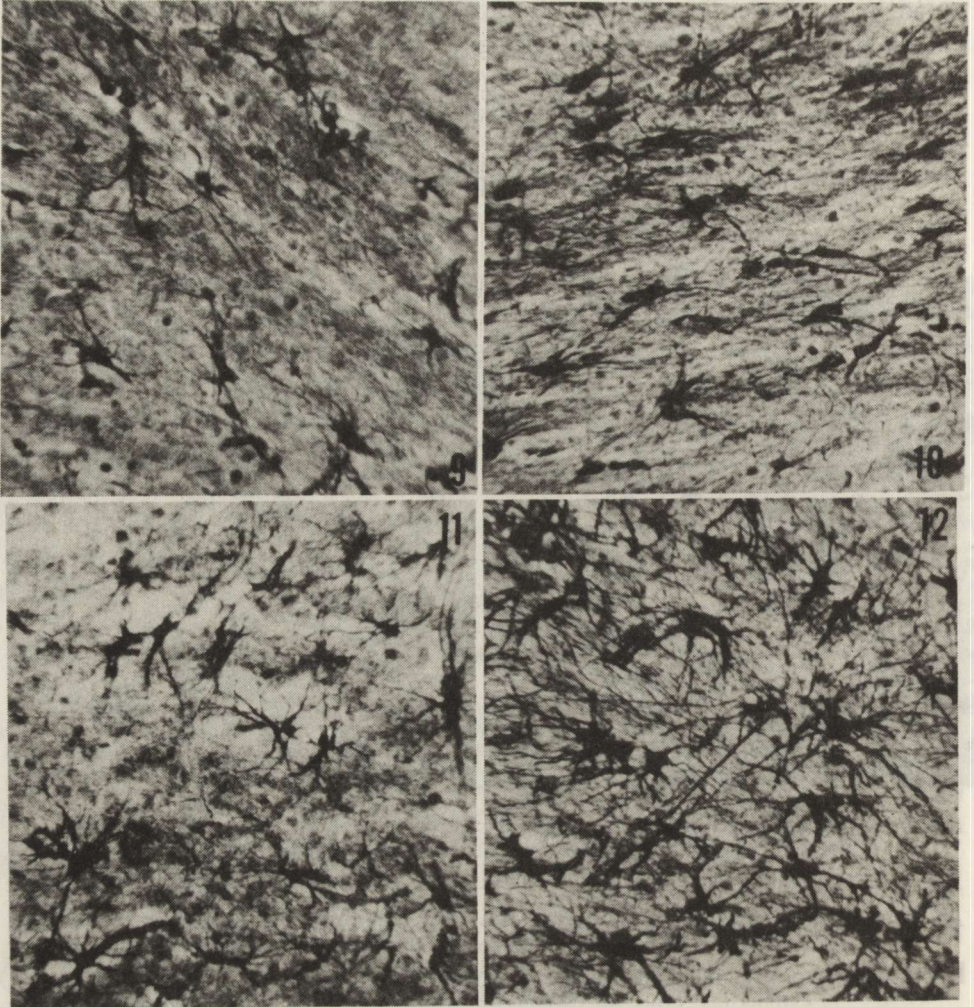
Ryc. 8. Królik pt w wieku 1 miesiąca. W porównaniu z kontrolą komórki astrogleju liczniejsze, z dłuższymi wypustkami. Cajal. Pow 200 ×

Fig. 8. Rabbit pt 1-month-old. Fibrous astrocytes more numerous with longer and thicker cytoplasmic processes as compared with controls. Cajal. ×200

nawet z wyprzedzeniem w stosunku do rozwoju osłonek rdzennych. Mają one liczniejsze, dłuższe i grubsze wypustki cytoplazmatyczne. Wraz z wiekiem królików pt i postępem mielinizacji przerost astrocytów włóknistych zwiększa się (ryc. 9 i 10) oraz przekraczając rozmiary zmian odczynowych przybiera charakter patologicznego rozplemu z wybitnym pomnożeniem i pogrubieniem wypustek cytoplazmatycznych (ryc. 11 i 12).

Przerost i rozplem astrocytów włóknistych występował w zróżnicowanym nasileniu u poszczególnych królików pt. Odczyn astrocytarny w poszczególnych strukturach OUN wykazywał zależność od proporcji tego typu gleju u normalnych królików (ryc. 13 i 14) oraz od nasilenia zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u mutantu pt.

W pniu mózgu, u niektórych królików pt, obserwowano liczne postacie



Ryc. 9. Królik kontrolny 2 miesięczny. Spoidło wielkie. Bardziej rozwinięte wypustki astrocytów włóknistych niż u królika w wieku 1 miesiąca. Cajal. Pow. 200 ×

Fig. 9. Control rabbit 2-month-old. Corpus callosum. Fibrous astrocytes with more developed processes than in 1-month-old normal animals. Cajal. ×200

Ryc. 10. Królik pt w wieku 2 miesięcy. Spoidło wielkie. Przerosłe astrocyty włókniste z grubymi, nieregularnymi wypustkami. Cajal. Pow. 200 ×

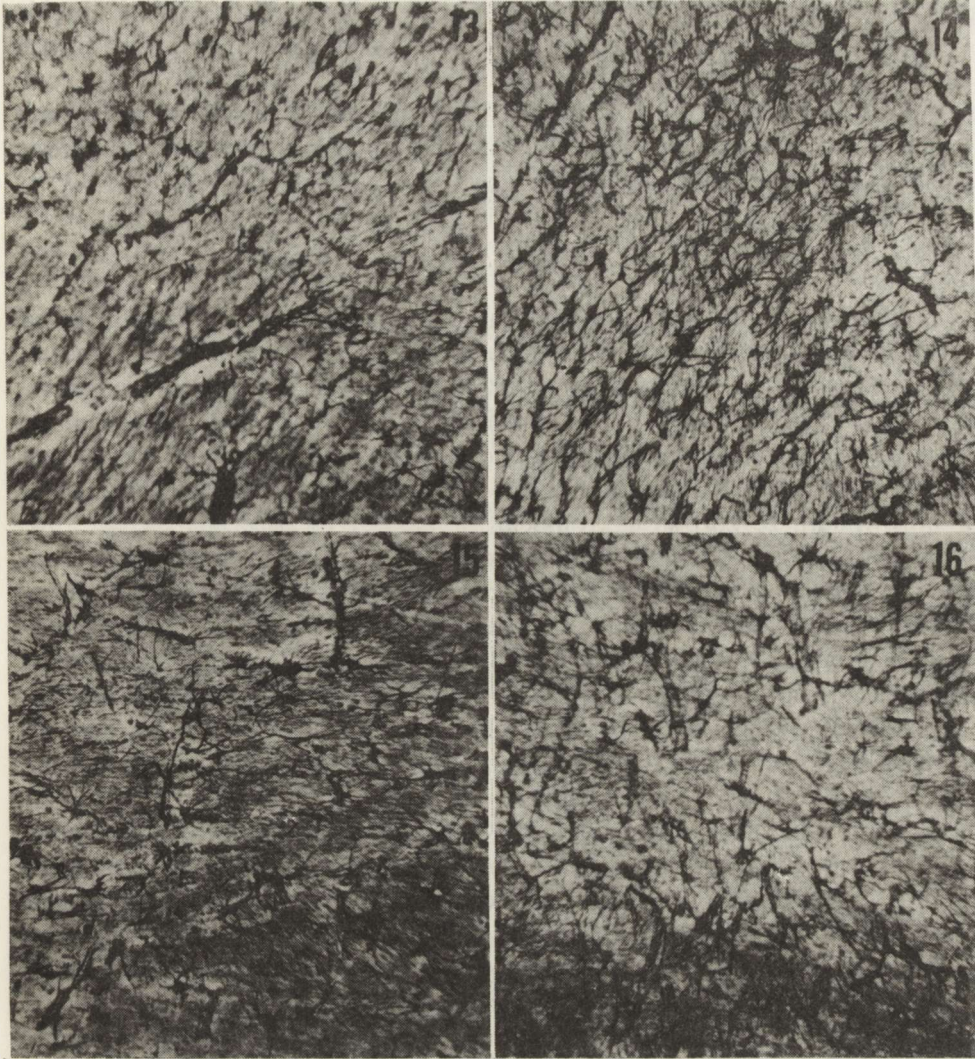
Fig. 10. Rabbit pt 2-month-old. Corpus callosum. Hypertrophic fibrous astrocytes with thick irregular processes. Cajal. ×200

Ryc. 11. Królik kontrolny w wieku 3 miesięcy. Astrocyty włókniste z cienkimi, rozgałęzionymi wypustkami. Cajal. Pow. 200 ×

Fig. 11. Control rabbit 3-month-old. Fibrous astrocytes in the corpus callosum with thin branching processes. Cajal. ×200

Ryc. 12. Królik pt w wieku 3 miesięcy. Wybitne pomnożenie i przerost astrogleju w spoidle wielkim. Cajal. Pow. 200 ×

Fig. 12. Rabbit pt 3-month-old. Remarkable proliferations and hypertrophy of fibrous astrocytes in the corpus callosum. Cajal. ×200



Ryc. 13. Królik kontrolny w wieku 3 miesięcy. Astrocyty włókniste w podkorowej istocie białej. Cajal. Pow. 100 ×

Fig. 13. Control rabbit 3-month-old. Fibrous astrocytes in subcortical white matter. Cajal. ×100

Ryc. 14. Królik pt w wieku 3 miesięcy. Rozplęm astrocytów włóknistych w podkorowej istocie białej. Cajal. Pow. 100 ×

Fig. 14. Rabbit pt 3-month-old. Proliferation of fibrous astrocytes in subcortical white matter. Cajal. ×100

Ryc. 15. Astrocyty włókniste w spoidle wielkim dorosłego królika kontrolnego. Cajal. 200 ×

Fig. 15. Fibrous astrocytes in the corpus callosum of adult control rabbit. Cajal. ×200

Ryc. 16. Dorosły królik pt, objawowy z poprawą kliniczną. W porównaniu z kontrolą komórki astrogleju liczniejsze. Cajal. Pow. 200 ×

Fig. 16. Adult pt rabbit with clinical recovery. Astroglial cells more numerous as compared with controls. Cajal. ×200

przerosłych, bogatowypustkowych astrocytów włóknistych, często w obrębie szwu, ale także w innych strukturach, zwłaszcza w przypadkach, w których zaburzenia mielinizacji były bardziej nasilone.

U dorosłych królików pt komórki astrogleju były liczniejsze niż w kontroli (ryc. 15 i 16), jednakże bez tak zaakcentowanych cech przerostu jak w okresie procesu mielinizacji włókien.

OMÓWIENIE

Przeprowadzone obserwacje wykazały u mutantu pt zmiany wskazujące na zaburzenie różnicowania i dojrzewania komórek mielinizacyjnych, a nie na zahamowanie ich proliferacji. We wczesnym okresie przedmielinizacyjnym, u najmłodszych mutantów, w najpóźniej mielinizującym się spoidle wielkim nie stwierdzono wyraźnej różnicy w gęstości komórek, natomiast już w tym okresie widoczne było słabsze zróżnicowanie komórek glejowych u mutantu pt w porównaniu ze zdrowym królikiem.

Wzrost liczby jąder glejowych jest pierwszą zmianą w procesie mielinogenezy, która obejmuje całokształt zmian strukturalnych i biochemicznych w tkance, wyprzedzając rozwój mieliny i proces formowania się osłonek mielino- wych. Schonbach i wsp. (1968) wykazali, że proliferacja komórek mielinotwórczych osiąga największą intensywność bezpośrednio przed początkiem mielinizacji. W pełni zróżnicowane postaci oligodendrogleju pojawiają się dopiero z początkiem mielinizacji struktur, a cała ich populacja osiąga dojrzałość wraz z końcem okresu aktywnej mielinizacji (Sturrock 1975).

U królika pt zmiany w gęstości komórek ujawniają się w okresie mielinizacji struktur, to jest w czasie, w którym u normalnych królików przeważają procesy różnicowania i dojrzewania komórek glejowych. Zdaniem Skoffa i wsp. (1976) oraz Meinecke i Webstera (1984) zdolność do podziału ma tylko niedojrzały oligodendroglej, w przeciwieństwie do astrocytów, które mogą ulegać podziałowi niezależnie od stopnia ich zróżnicowania.

Zaburzenia dojrzewania komórek oligodendrogleju, wykazane w badaniach mikroskopowo-elektronowych (Taraszewska 1983; Taraszewska, Zelman 1987), stwierdzone przez nas w badanym materiale królików pt mogą tłumaczyć wzmożoną i przedłużoną glejową mielinizacyjną u tego mutantu oraz obecność gleju mielinizacyjnego i niedojrzałych postaci oligodendrogleju u królików pt w tym okresie, w którym u normalnych zwierząt tego gatunku proces gliogenezy został już dawno zakończony. Jest bardzo prawdopodobne, że przedłużona proliferacja komórek mielinotwórczych pozwala u królika pt na tak znaczne wyrównanie zaburzeń hipomielinizacji (Taraszewska, Zelman 1985, 1986) w okresie, w którym u normalnych królików poszczególne struktury istoty białej znacznie wcześniej zostały całkowicie zmielinizowane.

Udział populacji astroglejowej w procesie prawidłowo przebiegającej mielinizacji nie jest określony. Wiadomo, że astrocyty różnicują się znacznie

wcześniej niż komórki oligodendrogleju i w momencie urodzenia stanowią one około 80% całej populacji glejowej (Vaughn, Peters 1967; Black i wsp. 1986), a pozostała część stanowią nieróżnicowane glioblasty. Intensywna proliferacja komórek linii oligodendroglejowej, wyprzedzająca rozwój osłonek mielino- wych, zmienia w sposób zasadniczy proporcje w populacji glejowej, w której w tym okresie występuje zdecydowana przewaga komórek mielinotwórczych (Black i wsp. 1986). Równocześnie normalnym zjawiskiem towarzyszącym prawidłowo przebiegającej mielinizacji jest przerost astrocytów włóknistych. Natomiast u znanych mutantów z hipomielinizacją zmiany w populacji astrocytów włóknistych kształtują się w sposób zróżnicowany. Poświęca się im na ogół stosunkowo mało uwagi i traktuje przeważnie jako zmiany wtórne, nie związane bezpośrednio z procesem zaburzonej mielinogenezy. Wyjątek pod tym względem stanowi Skoff (1976), a także Matthieu i Omlin (1983), którzy na podstawie wyników badań własnych, przeprowadzonych na myszy Jimpy, sugerują u tego mutantu współdziałanie astrocytów w nieprawidłowej mielinizacji włókien nerwowych.

U królików pt przerost i rozrost astrocytów włóknistych zwiększał się wraz z wiekiem królików i postępowaniem mielinizacji, pojawiał się jednak z wyprzedzeniem w stosunku do tego procesu (Taraszewska, Zelman 1987). Nie mamy żadnych przesłanek i podstaw do interpretacji tego odczynu. Progresywne zmiany w populacji astrocytów włóknistych wykazywały powiązanie czasowe i topograficzne z procesem mielinizacji, a więc prawdopodobnie są z nim związane przyczynowo. Przerosłe astrocyty włókniste miały bardzo liczne, długie i rozgałęzione wypustki, zwłaszcza u starszych mutantów. Nadmierna ilość i przebieg tych wypustek może prowadzić do zaburzenia normalnej organizacji strukturalnej tkanki i zakłóceń we wzajemnym oddziaływaniu tworzących tę tkankę elementów. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań mikroskopowo-elektronowych uzyskane na modelu królika pt (Taraszewska, Zelman 1987).

HISTOLOGICAL EVALUATION OF GLIA IN THE PROCESS OF MYELINATION IN PT RABBIT

Summary

The aim of the study was histological evaluation of glia in the brain of pt rabbits in premyelination period, during active myelin formation and in the postmyelination phase.

It was stated that morphological pattern of glial population exhibited evident abnormalities as compared with normal animals. They were characterized by delayed differentiation and maturation of myelination glia. Astrocytes, especially in later periods of myelin development revealed intense hypertrophy and proliferation. It is suggested that astroglial abnormalities in addition to abnormal maturation of oligodendrocytes may play the role of important factor of hypomyelination being a leading pathological feature in pt mutant.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЛИИ В МИЕЛИНИЗАЦИИ МУТАНТА pt

Резюме

Проведены наблюдения глии в структурах центральной нервной системы кролика мутанта pt в премиелинизационном периоде, во время формирования миелиновой оболочки и после окончания этого процесса. Обнаружено, что по сравнению со здоровыми кроликами, морфологическая картина глии показывает целый ряд патологических изменений, проявляющихся прежде всего более поздней дифференцировкой и созреванием миелинизационной глии. Нарушения созревания выступают прежде всего в олигодендроглии. Интенсивная пролиферация и гиперплазия астроцитов выступает преимущественно в более поздних периодах миелинизационного процесса. Предполагается, что патологические изменения астроцитов при пониженном созревании олигодендроглии могут быть одной из причин гипомиелинизации, являющейся доминирующей патологической чертой у мутанта pt.

PIŚMIENICTWO

1. Almeida D. F., Pearse de A. G. E.: Comparative histochemistry of lipids in relation to myelination in rabbit brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 132–138.
2. Black J. A., Waxman S. G., Ransom B. R., Feliciano M. D.: A quantitative study of developing axons and glia following altered gliogenesis in rat optic nerve. *Brain Res.*, 1986, 380, 122–135.
3. Dąbwska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203–209.
4. Friede R. L.: Glia and myelination. *Proc. VIth Internat. Congress of Neuropathology*. Masson, Paris, 1970, 293–305.
5. Matthieu J. -M., Omlin F. X.: Murine leukodystrophies as tools for study myelinogenesis in normal and pathological conditions. *Neuropediatrics*, 1983, 1–40.
6. Meinecke D. L., Webster H. F.: Fine structure of dividing astroglia and oligodendroglia during myelin formation in the developing mouse spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 1981, 222, 47–55.
7. Schonback J., Hu K. H., Friede R. L.: Cellular and chemical changes during myelination: histologic, autoradiographic and biochemical data on myelination in the pyramidal tract and corpus callosum of rat. *J. comp. Neurol.*, 1968, 134, 21–38.
8. Skoff R. P.: Myelin deficit in the Jimpy mouse may be due to cellular abnormalities in astroglia. *Nature*, 1976, 264, 560–562.
9. Skoff R. P., Price D. L., Stocks A.: Electron microscopic, autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. *J. comp. Neurol.*, 1976, 169, 291–312.
10. 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.
11. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt w oparciu o badanie mikroskopowo-elektronowe rdzenia kręgowego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327–342.
12. Taraszewska A., Osetowska E.: Zmiany w mózgu królika pt w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 283–290.
13. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441–459.
14. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 219–227.
15. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. II. Spoidło wielkie. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 443–454.

16. Taraszewska A., Zelman I. B.: Electron microscopic study of glia in pt rabbit during myelination. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 451-468.
17. Vaughn J. E., Peters A.: Electron microscopic study of the early postnatal development of fibrous astrocytes. *Am. J. Anat.*, 1967, 121, 131-152.
18. Wender M., Kozik M., Owsianowski M.: Histoenzymatic study of neuroglia during myelination of rabbit brain. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1969, 7, 135-150.
19. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205-218.

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

MIECZYSLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
ANDRZEJ ŻÓRAWSKI, EUGENIUSZ SROCZYŃSKI, ALINA GROCHOWALSKA

EFFECT OF MODERATE HYPOXIA ON CONTENT AND PATTERN OF FREE FATTY ACIDS IN CEREBRAL WHITE MATTER

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Neurocytes are the brain component most sensitive to the action of hypoxia. In acute or moderate hypoxia, however, also the white matter and its main component, the myelin-oligodendroglia complex in particular, are affected to some extent. Pronounced diffuse demyelination, evoked by atheromatosis and subsequent hypoxia of the brain, are known under the term of delayed hypoxic encephalopathy (Plum, Posner 1972). In rare cases, similar lesions represent sequelae of cardiac arrest, carbon monoxide intoxication or deep hypoglycemia (Wender et al. 1964; Traugott, Raine 1984). The cyanide-induced leucoencephalopathy represents the most widely recognized model of such lesions (Hirano et al. 1967; Bass 1968; Wender et al. 1975).

Biochemical studies have demonstrated that acute or mild hypoxia is followed by profound alterations in the composition and metabolism of myelin and its protein-lipid membranes in particular, which take place even in the absence of microscopically perceptible lesions in the white matter (Wender et al. 1987, 1988).

The sequence of events leading to these alterations is not fully understood, therefore, we have continued our studies on the problem, examining the content and pattern of free fatty acids in the white matter after mild hypoxia. Changes in the parameters are known to occur first and be strongly pronounced in conditions of ischemia or hypoxia (Bazan 1970; Strosznajder et al. 1972; De Medio et al. 1980).

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats, weighing 200–250 g. Mild hypoxia was induced by placing the animals for 30 minutes in a specially constructed glass chamber of 79.2 l. (0.0792 m³) capacity with gas mixture, containing 7% O₂ in 92.9 N₂ and 0.1% CO₂. Appropriate composition of gases in the chamber was secured by feeding the gases through a flowmeter and

rotometer. Normal level of body temperature (37°C) was maintained by heating the experimental rats with a lamp. The animals were sacrificed 4 min, 4 hrs, 24 hrs, 14 days and 2 months after hypoxia, by decapitation in light halotan anesthesia. The heads were immediately placed in liquid nitrogen. The white matter was isolated in a cold room at a temperature of 0°C.

Biochemical methods

Free fatty acids were extracted from the cerebral rat white matter with the mixture: iso-propylenic alcohol:n-heptane:1 N sulfuric acid 40:10:1 vol/vol according to the method described by Doll and Meinertz (1960). The heptane phase containing neutral lipids was separated by means of thin layer chromatography on silica gel G (Merck), using hexane:ethyl ether:glacial acetic acid, 70:30:10 vol/vol, according to Fishwick (1968) in the modification of Sroczyński and Fiedler (1978). Isolated free fatty acids were determined using the method of Düncombe (1964).

Eluted from thin layer chromatograms free fatty acids were next methylated using diazomethane and then separated by means of gas liquid chromatography using a Pye 104 gas chromatograph equipped with a flame ionizing detector. A 7 ft long column, was filled with 15% DEGS (diethylene glycol succinate) absorbed on Gas-Chrom Q 100/120 mesh and fatty acid 17:0 was used as the internal standard. Column temp. of 220°C, detector temp. of 280°C with argon as carrier gas (30 ml/min) were applied.

Fatty acids were identified by comparing respective peaks on the experimental chromatograms with those obtained with the standard mixture of fatty acid-methyl esters (Applied Sciences Laboratories).

Quantitation of chromatograms was based on evaluation of the respective peak areas calculated from the products of retention times and peak heights. The results were expressed in percentages at which individual fatty acids contributed to the total fatty acid content, i.e. at which the individual peak areas contributed to the total area of all peaks. From the relative values and from total fatty acids content, absolute concentrations of individual fatty acids were computed.

RESULTS

The clinical and morphological patterns of the brain after mild hypoxia were identical in the rat to those reported in our previous publication (Wender et al. 1988). Well defined myelinopathy was never found.

Results obtained in our chemical studies are presented in Tables 1 to 3. The total content of free fatty acids increased sharply as early as 4 minutes after hypoxia, then decreased but still remained twice as high as the normal level (4 and 24 hrs after hypoxia) to increase again in the late period after hypoxia (14 days and 2 months), reaching peak values 14 days after hypoxia.

In analysis of the fatty acid spectrum, obtained by means of gas liquid

Table 1. The effect of mild hypoxia (7% of oxygen) on concentration of total free fatty acids in the white matter of the rat brain (in mg/100 g of dry weight)

Tabela 1. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia (7% tlenu) na zawartość całkowitą wolnych kwasów tłuszczowych w istocie białej mózgu szczura (w mg/100 g suchej wagi)

	4 min after hypoxia	4 hrs after hypoxia	24 hrs after hypoxia	14 days after hypoxia	2 months after hypoxia	
Control Norma	4 min po niedotlenieniu	4 godz. po niedotlenieniu	24 godz. po niedotlenieniu	14 dni po niedotlenieniu	2 miesiące po niedotlenieniu	
	73.08 ± 3.55 ⁺	172.02** ± 9.55	142.38** ± 18.02	141.40** ± 11.50	237.76** ± 16.70	214.58** ± 6.27

⁺ Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd

** Difference significant at the level $p < 0.01$

Różnica wysoce istotna przy poziomie $p < 0.01$

Number of animals in each group: 6.

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6.

chromatography, it would appear that in absolute values almost all fatty acids showed increased content. However, the highest rise involved polyunsaturated fatty acids (tetra- and pentaenoic fatty acids) which showed manifold higher levels than that found in the control white matter. The presented deviations, although of variable intensity, were noted in all the studied periods. In the late experimental groups, beginning from 24 hours after hypoxia, the presence of 24:1 fatty acid (nervonic acid), not present in normal white matter, was observed.

When the results of fatty acids analysis were presented in percentages, a shift in the fatty acid spectrum towards unsaturated, especially polyunsaturated fatty acids, was disclosed. It is remarkable that the deviations are quite pronounced not only in the acute phase of the experiment, but also in the chronic phase, even 2 months after hypoxia.

Table 2. The effect of mild hypoxia (7% of oxygen) on pattern of free fatty acids in white matter of the rat brain (in mg/100 g of dry weight)

Tabela 2. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia (7% tlenu) na obraz wolnych kwasów tłuszczowych istoty białej mózgu szczura (w mg/100 g suchej wagi)

Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe	Control Norma	4 min after hypoxia	4 hrs after hypoxia	24 hrs after hypoxia	14 days after hypoxia	2 months after hypoxia
		4 min po niedotlenieniu	4 godz. po niedotlenieniu	24 godz. po niedotlenieniu	14 dni po niedotlenieniu	2 miesiące po niedotlenieniu
12:0	0.2 ± 0.04	0.6** ± 0.08	0.4 ± 0.12	0.2 ± 0.04	1.2 ± 1.16	0.5** ± 0.06
14:0	1.0 ± 0.13	2.8** ± 0.32	4.6** ± 1.13	1.0 ± 0.16	4.5 ± 1.06	2.9** ± 0.29
15:0	0.4 ± 0.13	0.6 ± 0.09	0.6 ± 0.11	0.2 ± 0.05	1.2** ± 0.05	0.7 ± 0.09
16:0	16.9 ± 0.98	37.9** ± 2.13	43.7** ± 1.76	29.0** ± 2.03	53.1** ± 5.53	43.7** ± 2.46
16:1	1.0 ± 0.16	2.8* ± 0.66	3.5** ± 0.48	1.5 ± 0.20	5.0** ± 0.41	3.2** ± 0.42
17:0	0.6 ± 0.05	1.4** ± 0.18	2.0* ± 0.27	0.5 ± 0.07	1.9** ± 0.23	1.0* ± 0.17

Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe	Control Norma	4 min	4 hrs	24 hrs	14 days	2 months
		after hypoxia 4 min po niedotlenieniu	after hypoxia 4 godz. po niedotlenieniu	after hypoxia 24 godz. po niedotlenieniu	after hypoxia 14 dni po niedotlenieniu	after hypoxia 2 miesiące po niedotlenieniu
18:0	26.2±1.77	50.8**±2.12	39.2* ±4.66	44.6**±0.07	79.0**±9.57	80.6**±2.45
18:1	22.2±2.56	53.4 ±2.58	37.5* ±6.84	47.0**±4.39	66.7**±4.07	56.7**±2.45
18:2	0.4±0.04	2.2**±0.35	1.6**±0.36	1.1**±0.20	0.8* ±0.20	1.0**±0.17
18:3	0.3±0.12	0.8* ±0.14	1.3**±0.44	0.3 ±0.03	1.2**±0.17	0.5 ±0.11
20:0	0.4±0.03	1.0**±0.11	0.6 ±0.17	0.6**±0.07	1.7**±0.14	1.5**±0.07
20:1	1.0±0.09	4.2**±0.77	1.7* ±0.26	3.9**±0.31	5.8**±0.64	5.6**±0.68
20:2	0.1±0.03	0.3 ±0.11	0.2 ±0.10	0.3 ±0.14	0.8 ±0.08	0.8**±0.11
20:3	0.7±0.36	0.5 ±0.10	0.6 ±0.09	0.6 ±0.05	2.6 ±0.86	0.5 ±0.13
20:4	0.5±0.04	6.9**±1.14	1.1**±0.20	6.0**±1.05	3.9**±1.07	6.2**±1.16
20:5	0.4±0.04	2.3**±0.20	2.9* ±1.03	1.1**±0.10	2.3**±0.42	2.5**±0.56
24:0	0.9±0.13	2.9 ±1.14	0.7 0.29	2.3**±0.20	4.4**±0.77	4.1**±0.35
24:1	0.0	0.5 ±0.32	0.0	1.2**±0.08	1.6**±0.43	2.4**±0.27
Total saturated Całkowite nasycone	46.4±3.31	98.0**±6.62	91.9**±6.87	78.5**±2.68	147.1**±8.51	135.2**±4.13
Total unsaturated Całkowite nienasycone	26.6±1.62	74.0**±5.06	50.5**±3.49	62.9**±2.65	90.7**±3.48	79.4**±3.15
Total monoenes unsaturated Całkowite jednonienasycone	24.1±0.92	60.9**±0.93	42.8**±2.12	53.6**±1.29	79.1**±1.38	67.9**±1.03
Total dienes unsaturated Całkowite dwunienasycone	0.5±0.03	2.5**±0.23	1.8* ±0.19	1.4 ±0.17	1.6* ±0.14	1.8**±0.16
Total trienes unsaturated Całkowite trójnienasycone	1.0±0.22	1.3 ±0.12	1.9 ±0.22	0.8 ±0.04	3.8**±0.46	1.0 ±0.13
Total tetraenes unsaturated Całkowite czteronienasycone	0.5±0.04	6.9**±1.14	1.1**±0.20	6.0**±1.05	3.9**±1.07	6.2**±1.16
Total pentaenes unsaturated Całkowite pięcionienasycone	0.4±0.04	2.3**±0.30	2.9* ±1.03	1.1* ±0.10	2.3**±0.42	2.5 ±0.53
Ratio of <u>saturated</u> unsaturated Stosunek <u>Nasyconych</u> Nienasyconych	1.7±0.20	1.3 ±0.03	1.8 ±0.22	1.2 ±0.07	1.6 ±0.11	1.7 ±0.10

* – Difference significant at the level $p < 0.05$

Różnica istotna na poziomie $p < 0.05$

** – Difference significant at the level $p < 0.01$

Różnica wysoce istotna na poziomie $p < 0.01$

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Table 3. The effect of mild hypoxia (7% of oxygen) on pattern of free fatty acids in white matter of the rat brain (in % of total free fatty acids)

Tabela 3. Wpływ umiarkowanego niedotlenienia (7% tlenu) na obraz wolnych kwasów tłuszczowych istoty białej mózgu szczura (w % całkowitych wolnych kwasów tłuszczowych)

Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe	Control Norma	4 min	4 hrs	24 hrs	14 days	2 months
		after hypoxia 4 min po niedotlenieniu	after hypoxia 4 godz. po niedotlenieniu	after hypoxia 24 godz. po niedotlenieniu	after hypoxia 14 dni po niedotlenieniu	after hypoxia 2 miesiące po niedotlenieniu
12:0	0.3±0.1	0.3 ±0.04	0.3 ±0.05	0.2 ±0.04	0.5 ±0.03	0.2 ±0.03
14:0	1.3±0.2	1.6 ±0.2	3.0**±0.04	0.7 ±0.04	2.0 ±0.2	1.5 ±0.1
15:0	0.6±0.2	0.3 ±0.04	0.4 ±0.05	0.1 ±0.03	0.5 ±0.04	0.3 ±0.04
16:0	23.1±1.3	22.0 ±0.2	31.1**±1.8	20.6 ±0.9	22.1 ±1.5	20.4 ±1.1
16:1	1.3±0.1	1.6 ±0.3	2.6**±0.3	1.0 ±0.1	2.1**±0.2	1.5 ±0.2
17:0	0.8±0.1	0.8 ±0.1	1.6**±0.2	0.3**±0.04	0.8 ±0.1	0.5* ±0.1
18:0	35.8±1.8	29.6**±0.5	28.5 ±3.0	31.8 ±1.1	33.0 ±1.3	37.6 ±1.0
18:1	30.3±2.8	31.1 ±0.6	25.4 ±2.4	33.1 ±1.4	28.3 ±1.1	26.4 ±1.9
18:2	0.5±0.05	1.3 ±0.2	1.0* ±0.2	0.8**±0.1	0.4 ±0.1	0.5 ±0.1
18:3	0.4±0.05	0.5 ±0.1	1.0 ±0.3	0.2**±0.02	0.5 ±0.04	0.2* ±0.05
20:0	0.5±0.05	0.6 ±0.04	0.4 ±0.1	0.4 ±0.04	0.7 ±0.04	0.7* ±0.1
20:1	1.3±0.1	2.4**±0.1	1.4 ±0.2	2.8**±0.1	2.5 ±0.3	2.6**±0.2
20:2	0.2±0.05	0.3* ±0.02	0.2 ±0.1	0.2 ±0.04	0.4 ±0.05	0.4* ±0.04
20:3	1.1±0.5	0.3 ±0.03	0.4 ±0.1	0.4 ±0.04	1.0 ±0.3	0.2 ±0.1
20:4	0.7±0.05	4.0**±0.7	0.8 ±0.1	4.1**±0.6	1.8 ±0.6	2.9**±0.5
20:5	0.6±0.05	1.3**±0.2	1.5* ±0.4	0.8**±0.04	1.0* ±0.1	1.1**±0.2
24:0	1.2±0.1	1.7 ±0.2	0.4* ±0.2	1.6 ±0.1	1.8**±0.2	1.9**±0.1
24:1	0.0	0.3* ±0.1	0.0	0.9**±0.04	0.6**±0.1	1.1**±0.1
Total saturated Całkowite nasycone	63.6±4.7	56.9 ±1.0	65.7 ±5.1	55.7 ±2.3	61.4 ±3.6	63.1 ±2.8
Total unsaturated						
Całkowite nienasycone	36.4±1.4	43.1**±1.5	34.3 ±1.7	44.3**±1.1	38.6 ±1.5	36.9 ±1.6
Total monoenes unsaturated						
Całkowite jednonienasycone	32.9±0.9	35.4* ±0.3	29.4* 0.9	37.8**±0.4	33.5 ±0.4	31.6**±0.6
Total dienes unsaturated						
Całkowite dwunienasycone	0.7±0.05	1.6**±0.1	1.2* ±0.1	1.0 ±0.1	0.8 ±0.1	0.9* ±0.1
Total trienes unsaturated						
Całkowite trójnienasycone	1.5±0.3	0.8 ±0.05	1.4* ±0.2	0.6**±0.02	1.5 ±0.1	0.4**±0.1
Total tetraenes unsaturated						
Całkowite czteronienasycone	0.7±0.05	4.0**±0.7	0.8 ±0.1	4.1**±0.6	1.8 ±0.6	2.9**±0.5
Total pentaenes unsaturated						
Całkowite pięcionienasycone	0.6±0.04	1.3**±0.2	1.5* ±0.4	0.8 ±0.04	1.0* ±0.1	1.1 ±0.2

* - Difference significant at the level p < 0.05

Różnica istotna na poziomie p < 0.05

** - Difference significant at the level p < 0.01

Różnica wysoce istotna na poziomie p < 0.01

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

DISCUSSION

Noxious agents acting on the brain, with an intensity not leading to complete demyelination, provoke changes in the lipid membranes, characteristic for the early stage of myelin disintegration. The most pronounced changes of cerebral myelin lipids observed by us in rats exposed to mild hypoxia involved a marked increase of cholesterol esters and lysophosphatidylcholine content (Wender et al. 1988).

The cerebroside and phospholipid contents were undiminished, indicating that mild hypoxia induces a lesion to myelin membranes but does not provoke the reaction of lymphocytes and macrophages which, by production of myelinolytic factors, would evoke complete demyelination.

Cyanide intoxication, at an intensity not leading to anatomically visible demyelination, induces early cholesterol esterification and, in the late period, causes a decrease in cerebroside content and some minor changes in the content of particular phospholipids (Wender et al. 1986b). In the subsequent period of cyanide intoxication, when massive demyelination takes place in the corpus callosum, a significant decrease of sphingomyelin, sulfatides, cholesterol and some phospholipid contents as well as increased cholesterol esterification are the most characteristic biochemical alterations (Wender et al. 1973).

From the analysis of the fatty acid spectrum in individual lipid fractions of the cerebral white matter in cyanide-induced leucoencephalopathy it would appear that essentially only the phosphatidylethanolamine and plasmalogen fractions undergo appreciable deviations from the control pattern. However, no correlation could be disclosed between the alterations in phosphatide fatty acid composition and those in cholesterol esters suggesting that esterification of cholesterol in the myelin is not a secondary result of degradation of phospholipids (Wender et al. 1975).

Very pronounced biochemical changes observed in ischemia and hypoxia of the brain concern the pool of free fatty acids. The most characteristic finding in postdecapitation ischemia is an increase of free fatty acids, caused by their release from membrane phospholipids, provoked partially by activation of catabolic processes and probably also by inhibition of phospholipid synthesis (Bazan 1970; Strosznajder et al. 1972; Cenedella et al. 1975). Strosznajder et al. (1972) have emphasized that the excess of free fatty acids liberated in the brain after ischemia seems to be one of the decisive factors, responsible for the development of irreversible brain lesions after ischemia.

The studies of De Medio et al. (1980) have demonstrated in gerbils that transient ischemia also produces an increase in the free fatty acids pool in the brain. The major component of that pool comprises palmitic, stearic, oleic and arachidonic acids, and no significant deviations from the normal spectrum are found. However, bilateral ischemia produces an increase in the relative concentration of 20:4 and 22:6 fatty acids, probably as a result of degradation of various phospholipids and diglycerides.

Giusto and Bazan (1983) in *in vitro* experiments have established that anoxic incubation of neural tissue promotes pronounced changes in the

composition and concentration of nonpolar lipids, including the appearance of long-chain fatty acid methyl esters and an increase in the free fatty acid content. It is suggested that the excess of free fatty acids in neural tissue is removed by a protective mechanism, partly via acylation of diglycerides and the formation of less harmful fatty acid methyl esters.

In our experiments on rats subjected to mild hypoxia, we have also noticed the sharp rise in the free fatty acid pool, taking place already 4 minutes after hypoxia, with the spectrum of fatty acids deviating markedly from the normal one. The most striking alteration involved the excess of polyunsaturated fatty acids, especially of arachidonic acid (20:4), and nervonic acid (20:1), also observed after ischemia (Bazan 1976). De Medio et al. (1980) studied the problem thoroughly examining arachidonate distribution and specific activity in neutral and polar lipids of the brain, and concluded that phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol represent the main source for the release of arachidonate during ischemia. According to him, enzyme-mediated phenomena liberate free arachidonate from phospholipids by the mechanism yielding diglycerides, and lysophospholipids further transformed into fatty acids. The alternate pathway may involve phospholipid degradation through phospholipase A₂ activity.

The question as to which cellular and subcellular structures of the cerebral white matter rich in phospholipids are mainly affected by degradation, and subsequently responsible for the rise of the free fatty acids pool remains open. In our previous investigations, we have noticed only insignificant changes of phospholipids content in cerebral myelin after mild hypoxia. Therefore, myelin cannot be the main source of liberated fatty acids, which must originate from several membranes of the nervous tissue containing phospholipids.

An interesting finding in our experiments involved the observation of a long lasting increase in the fatty acids pool in the white matter after 30 minutes exposure of rats to the action of mild hypoxia. The highest levels of free fatty acids were noticed in experimental animals 14 days and 2 months after hypoxia which was associated with a high content of cholesterol esters found by us in previous studies (Wender et al. 1988). No satisfactory explanation of this phenomenon can be provided at present, and we may only speculate that the degradation processes of lipid-rich membranes in the brain, start immediately after hypoxia but go on for months. This may explain the progression of the clinical pattern observed in some cases of stroke.

WPLYW ŁAGODNEGO NIEDOTLENIEŃ NA ZAWARTOŚĆ I OBRAZ WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W ISTOCIE BIAŁEJ MÓZGU

Streszczenie

Badano wpływ łagodnego niedotlenienia wywołanego przez umieszczenie szczurów rasy Wistar na okres 30 minut w komorze zawierającej mieszaninę gazów z zawartością 7% tlenu, na zawartość i obraz wolnych kwasów tłuszczowych w istocie białej mózgu. Kwasy tłuszczowe

ekstrahowano metodą Dolla i Meinertza (1960), a oznaczano używając metody Düncomba (1964). Obraz kwasów tłuszczowych oznaczano przy użyciu chromatografii gazowej.

W wyniku badań stwierdzono znaczny wzrost puli wolnych kwasów tłuszczowych, rozpoczynający się w 4 minuty i utrzymujący się w okresie 14 dni i 2 miesięcy od zakończenia niedotlenienia. W puli wolnych kwasów tłuszczowych największy wzrost wykazują kwasy tłuszczowe wielonienasycone, szczególnie kwas archidonowy. Kwasy tłuszczowe wydają się pochodzić z różnych błon tkanki nerwowej, zawierających fosfolipidy, a nie tylko z osłonki mielinowej.

Długo utrzymujący się wzrost zawartości kwasów tłuszczowych w istocie białej mózgu może tłumaczyć narastanie objawów klinicznych, występujące w niektórych przypadkach po udarze mózgu.

ВЛИЯНИЕ СЛАБОЙ ГИПОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ И КАРТИНУ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БЕЛОМ ВЕЩЕСТВЕ МОЗГА

Резюме

Исследовалось влияние слабой гипоксии, вызванной помещением крыс расы Wistar на 30 минут в камеру содержащую смесь газов с 7% кислорода, на содержание и картину свободных жирных кислот в белом веществе мозга. Жирные кислоты были изолированы по методу Dolla и Meinertza (1960), и обозначались с употреблением метода Düncomba (1964). Картина жирных кислот определялась в газовой хроматографии.

Исследования показали значительное повышение пулки свободных жирных кислот, начинающееся 4 минуты и удерживающееся в отдаленном периоде (14 дней и 2 месяца) от конца гипоксии. В пулке свободных жирных кислот больше всего увеличиваются многоненасыщенные жирные кислоты, особенно арахидоновая кислота. Жирные кислоты происходят, вероятно, с разных мембран нервной ткани, содержащих фосфолипиды, а не только с миелиновой оболочки.

Удерживающееся долгое время увеличение содержания жирных кислот в белом веществе мозга может оправдывать нарастание клинических симптомов, выступающих в некоторых случаях после инсульта.

REFERENCES

1. Bass N.: Pathogenesis of myelin lesions in experimental cyanide encephalopathy. *Neurology*, 1968, 18, 167–177.
2. Bazan N.: Effect of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 218, 1–10.
3. Bazan N.: Function and metabolism of phospholipids in central and peripheral nervous system. Plenum Press, New York, 1976.
4. De Medio G., Goracci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Mazzari S., Porcellati G., Strosznajder J., Trovarelli G.: The effect of transient ischemia on fatty acid and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital. J. Biochem.*, 1980, 29, 412–432.
5. Doll V. P., Meinertz H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2595–2599.
6. Düncombe W. G.: The colorimetric microdetermination of non-esterified fatty acid plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1964, 9, 122–126.
7. Fishwick B.: Changes in the lipids of turkey muscle during storage at chilling and freezing temperatures. *J. Sci. Food Agricult.*, 1968, 19, 440–445.
8. Giusto N., Bazan N.: Anoxia-induced production of methylated and free fatty acids in retina, cerebral cortex and white matter. *Neurochem. Path.*, 1983, 1, 17–41.
9. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy. *Electron*

- microscopic observation of early lesions in white matter. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200–213.
10. Plum F., Posner J.: *Stupor and Coma*. Ed. F. A. Davis, New York, 1972.
 11. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 447–455.
 12. Sroczyński E., Fiedler A.: Ocena stopnia zjelenienia tłuszczu drobiowego. *Przemysł Spożywczy* 1978, 11, 420–421.
 13. Traugott U., Raine C.: The neurology of myelin disease. In: *Myelin*. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York, London, 1984, 311–335.
 14. Wender M., Jurczyk W., Stengert K.: Cerebral lipids in myelinopathy caused by cardiac arrest. *Acta Neuropath.*, 1964, 4, 238–244.
 15. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Wajgt A.: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 417–425.
 16. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in cyanide encephalopathy. *Exp. Pathol.*, 1975, 41, 233–238.
 17. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Sroczyński E., Żórawski A.: The effect of cyanide intoxication on free fatty acid pattern in the brain of rats developing on a diet with various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 341–350.
 18. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Knitter B., Talkowska D., Pankrac J.: Influence of cyanide intoxication on the composition of myelin lipids in rats fed during development on a diet containing various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986b, 24, 43–56.
 19. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipids. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 107–115.
 20. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Myelin lipids of the rat brain in experimental mild hypoxia. *Exp. Pathol.*, 1988, (in press).

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

JÓZEF KAŁUŻA, DARIUSZ ADAMEK, WITOLD MIEŻYŃSKI, WOJCIECH STOLFA

MORFOLOGICZNE WYKŁADNIKI ZMIAN W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM W SINICZYCH I NIESINICZYCH WADACH WRODZONYCH SERCA W WIEKU ROZWOJOWYM

I. MORFOMETRYCZNA OCENA UNACZYNIENIA MÓZGU I MÓZDŻKU W WRODZONYCH WADACH SINICZYCH I NIESINICZYCH SERCA

Samodzielna Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii, Zakład Patologii Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej, Kraków

W badaniach autopsyjnych dzieci z wrodzonymi wadami serca spotyka się różnego typu zmiany patologiczne ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wśród których najczęściej zwraca się uwagę na wtórne skutki procesów zakrzepowych, zatorowych i zapalnych włącznie z tworzeniem ropni. Dziecko z wadą serca, w zależności od rodzaju i stopnia wady, wykazuje ogólnoustrojowe i lokalne zaburzenia hemodynamiczne prowadzące z reguły do przewlekłych i ostrych stanów hipoksyjnych i hipoksemicznych, którym często towarzyszy policytemia.

Uszkodzenia hipoksyjne mózgu stanowią przedmiot prowadzonych od wielu lat licznych badań doświadczalnych, jak też kliniczno-patologicznych. Znacznie rzadziej przedmiotem analizy były efekty konkretnej sytuacji klinicznej, jaką jest wada serca, w dodatku wada serca, której skutki działają na nie w pełni jeszcze dojrzały układ nerwowy. Badając szkodliwe oddziaływanie niedotlenienia na OUN zwraca się zwykle uwagę na zmiany rozwijające się w istocie szarej i dotyczące struktur lub ugrupowań komórkowych o szczególnej wrażliwości (komórki Purkiniego, hipokamp, kora nowa). Rzadziej natomiast ocenia się uszkodzenia istoty białej. Tymczasem istota biała, zwłaszcza w rozwijającym się mózgu, może być bardziej wrażliwa na działanie różnych czynników uszkadzających niż istota szara. Stwierdzenie zmian w istocie białej dało podstawę Gillesowi i Murphymu (1969) do wyodrębnienia zespołu nazwanego perinatal telencephalic leukoencephalopathy (PLA). W zespole tym

Praca wykonana w ramach realizacji CPBP 06-02.

zmiany morfologiczne ujawniają się w postaci przerostu astrocytów, ogniskowych martwic, ostrego uszkodzenia gleju i nagromadzenia amfofilnych ziarnistości. Niektórzy autorzy obserwowali mniejsze uszkodzenie kory mózgu w niedotlenieniu, niżby to wynikało z rozległości zmian w istocie białej (Feigin i wsp. 1973; Ginsberg i wsp. 1974). Wydaje się, że w ukształtowaniu tego zjawiska, oprócz wrażliwości samej tkanki, mają znaczenie inne czynniki, jak np. system unaczynienia poszczególnych struktur mózgu, a zwłaszcza różnice w spływie żylnym między korą i istotą białą. Między innymi Towbin (1984) podkreśla znaczenie przekrwienia żylnego i zastoinowej zakrzepicy w układzie naczyń żylnych w rozwoju okołoporodowych uszkodzeń mózgu u dzieci. Reaktywne przekrwienie i obrzęk mózgu podobnie modyfikują skutki hipoksji.

Wieloletnie badania autopsyjne mózgów dzieci zmarłych z różnych przyczyn w Instytucie Pediatrii Akademii Medycznej w Krakowie, w tym dzieci z wadami serca, były i są okazją do poczynienia szeregu interesujących obserwacji dotyczących uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego.

Przeprowadzając sekcje mózgów dzieci, stwierdzono między innymi, że w pewnej liczbie przypadków występuje intensywne sepiowe zabarwienie istoty białej, któremu towarzyszy bardzo wyraźnie wzmoczony rysunek naczyń krwionośnych silnie wypełnionych krwią. Porównanie zmian o tym charakterze z danymi klinicznymi pozwoliło na stwierdzenie, że większość tych mózgów pochodziło od dzieci zmarłych bądź wśród objawów ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej, bądź też wskutek istniejących wrodzonych wad serca i dużych naczyń krwionośnych. Zwracał równocześnie uwagę fakt, że istota szara mózgu w tych razach nie wykazywała daleko idących zmian.

Wykorzystując zgromadzony materiał postanowiono prześledzić mózgowe skutki wrodzonych wad serca u dzieci z uwzględnieniem charakteru wady (siniczne i bezsiniczne). Do badań włączono tylko tzw. pierwotne wady siniczne, a nie wtórnie siniczne, w których prawdopodobnie może występować nakładanie się różnych skutków wady. Przedmiotem badań stały się zmiany w łożysku naczyniowym mózgu, które w celu obiektywizacji obserwowanych nieprawidłowości oceniano morfometrycznie.

Przy tym założeniu zasadnicze znaczenie miała odpowiednia selekcja posiadanego zbioru przypadków. Chodziło przede wszystkim o wyeliminowanie z badanej grupy tych przypadków, w których stwierdzono znane, wspomniane na początku efekty zakrzepicy, zatorów, a także ropnie i inne zmiany zapalne. Ponadto wyeliminowano przypadki z obrzękiem mózgu, niezależnie od jego przyczyny. W pewnej części przypadków u dzieci z wadami sinicznymi serca obserwowano rozlane zmiany w układzie naczyń krwionośnych, głównie na powierzchni półkul mózgu, które świadczyły o ich przebudowie stanowiącej prawdopodobnie wyraz procesu adaptacyjnego do zmienionych warunków hemodynamicznych. Zmiany te charakteryzowały się znacznym nieprawidłowym pomnożeniem i poszerzeniem oraz nieregularnym przebiegiem naczyń w przestrzeni podpajęczynówkowej. Tego rodzaju przypadki również nie zostały włączone do badanego zbioru.

Chodziło bowiem o to, by w miarę możliwości dobrać czystą grupę, w której obserwowane zmiany będą przypuszczalnie wiązać się wyłącznie z efektem hemodynamicznym i metabolicznym samej wady serca. W ten sposób wyselekcjonowano grupę kilkudziesięciu przypadków, z której losowo dobrano po 10 przypadków z wadami sinicznymi i bezsinnymi. W grupie wad sinicznych reprezentowane były przypadki tetralogii Fallotą oraz transpozycji wielkich pni tętniczych, w grupie wad bezsinicznych – różne typy ubytków międzykomorowych, międzyprzedsionkowych, przetrwałe przewody tętnicze Botalla i stenozy.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 20 mózgzach dzieci zmarłych w Instytucie Pediatrii Akademii Medycznej w Krakowie. 10 dzieci miało wrodzone wady serca siniczne, a 10 – wady wrodzone serca niesiniczne. Charakterystyka wady i wiek dziecka oraz nr badania sekcyjnego podano w tabelach 1 i 2.

Tabela. 1. Wady bezsiniczne
Table 1. Non-cyanotic malformations

Przypadek nr Case no.	Wiek Age	Rozpoznanie anatomiczne Anatomical diagnosis
1.	9/12	Defectus septi interatrialis (typus foramen ovale)
2.	4	Stenosis subvalvularis aortae. Dilatio et hypertrophia medii gradus ventriculi cordis sinistri
3.	6/52	Defectus (duo) partis muscularis septi interventricularis. Defectus septi interatrialis (typus vena cava inferior)
4.	6/52	Defectus partis membranacei septi interventricularis
5.	4/12	Defectus septi interventricularis
6.	2.5/12	Stenosis valvularis aortae. Hypoplasia cordis sinistri. Fibrosis endocardii ventriculi cordis sinistri. Ductus Botalli persistens et foramen ovale apertum. Hypertrophia ventriculi cordis dextri
7.	3/365	Ductus Botalli persistens permagnus. Foramen ovale apertum
8.	2/365	Defectus septi interatrialis (typus foramen ovale). Ductus Botalli persistens permagnus
9.	13/12	Coarctatio aortae. Defectus partis membranacei septi interventricularis. Dilatio cordis dextri
10.	2/12	Defectus partis membranacei septi interventricularis. Foramen ovale apertum

W czasie sekcji mózgzów pobierano wycinki zawsze z tych samych struktur i okolic mózgowia, a mianowicie z płata czołowego, ciemieniowego, potylicznego, skroniowego, z mostu, mózdzku i rdzenia przedłużonego. Wycinki przeprowadzono do parafiny w sposób typowy, a skrawki parafinowe o standardyzowanej grubości barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody Perdraua. Tę ostatnią metodę wybrano, ponieważ włókna retikulino-ścian naczyń krwionośnych wyznaczają wyraźnie granicę zajmowanej przez nie

Tabela 2. Wady sinicze
Table 2. Cyanotic malformations

Przypadek nr Case no.	Wiek Age	Rozpoznanie anatomiczne Anatomical diagnosis
1.	1/12	Transpositio vasorum vera (d-loop, d-transpositio, situs solitus). Defectus partis membranacei septi interventricularis. Ductus Botalli persistens. Foramen ovale permagnum. Dilatio cordis totius
2.	22/12	Tetralogia Falloti
3.	3/365	Hypoplasia arteriae pulmonalis maioris gradus. Stenosis valvularis et subvalvularis arteriae pulmonalis. Aorta et arteria pulmonalis e ventriculo dextro. Defectus partis membranacei septi interventricularis
4.	8/12	Tetralogia Falloti
5.	7/12	Transpositio vasorum vera (d-loop, d-transpositio, situs solitus). Defectus partis membranacei septi interventricularis. Foramen ovale apertum
6.	3/12	Tetralogia Falloti. Foramen ovale apertum. Ductus Botalli persistens
7.	4	Aorta et arteria pulmonalis e ventriculo dextro. Stenosis valvularis et subvalvularis arteriae pulmonalis. Hypoplasia rami sinistri arteriae pulmonalis. Defectus partis membranacei septi interventricularis. Arcus aortae duplex ad dextram. Foramen ovale apertum. Hypertrophia maioris gradus et dilatio ventriculi dextri cordis. Dilatio atrii cordis dex
8.	11	Tetralogia Falloti
9.	20/12	Tetralogia Falloti
10.	4/365	Transpositio vasorum vera (d-loop, d-transpositio, situs solitus). Ductus Botalli persistens et foramen ovale apertum

płaszczyzny. Stosując tę metodę można było przystąpić do badań morfometrycznych z zastosowaniem siatki (rastera testowego), na podstawie której dokładnie określano punkty trafienia znajdujące się w obrysach struktury naczynia. Na podstawie zasad podanych przez Thomsona (1930) i Glagoleff (1933) zastosowano metodę obliczenia gęstości naczyń krwionośnych na powierzchni tkanki według Oberholzera (1983).

Zgodnie z zasadą podaną przez wyżej wymienionych autorów, ilość punktów skrzyżowania siatki kwadratowej, które pokrywają się na płaszczyźnie z profilem badanej struktury, w stosunku do ilości wszystkich punktów przecięcia siatki testowej odzwierciedla stosunek powierzchni określonego profilu do całej powierzchni badanego materiału. W naszym przypadku chodziło o stosunek powierzchni naczyń krwionośnych do powierzchni przekroju mózgu w preparacie histologicznym. Gęstość naczyń w badanym polu tkanki można było obliczyć według następującego wzoru:

$$P_x/P_B = A_x/B,$$

gdzie: P_x oznacza liczbę punktów siatki testowej pokrywających się („trafiających”) z profilem naczyń krwionośnych, P_B oznacza liczbę wszystkich punktów skrzyżowania kwadratowej siatki testowej, natomiast A_x/B w nomenklaturze stereologicznej oznacza tzw. gęstość profilu (profile density), a więc gęstość powierzchni naczyń w preparacie histologicznym.

W badaniach wykorzystano fakt, że na podstawie tzw. zasady Delessego (Oberholzer 1983) obliczone stosunki pól z powierzchni przekroju mogą być ekstrapolowane na przestrzenne, trójwymiarowe relacje, a więc stosunki objętościowe badanych struktur. Innymi słowy, gęstość powierzchni naczyń obliczona w mikroskopie z użyciem siatki testowej może być przyrównana do gęstości objętości łożyska naczyniowego w tkankach mózgu według zasady:

$$V_v/x = A_x/B,$$

gdzie: V_v/x oznacza według nomenklatury stereologicznej tzw. gęstość objętości (volume density) komponentu „x”, w naszym przypadku naczyń krwionośnych.

Jak wspomniano wyżej, w każdym z badanych mózgów wyróżniono sześć okolic (pominięto badania rdzenia przedłużonego), w których osobno obliczano gęstość naczyń krwionośnych na podstawie punktów „trafienia” siatki testowej w obszar naczyń krwionośnych, przy czym w każdej wyróżnionej okolicy oceniano 10 pól widzenia w mikroskopie przy powiększeniu 200 razy. Spośród 10 pól, 5 przypadało na istotę szarą i 5 na istotę białą w danej okolicy. W każdym przypadku osobno obliczono średnią zawartość naczyń z rozróżnieniem istoty białej i szarej. Wyróżnienie określonych okolic mózgu miało na celu uzyskanie reprezentatywnych przeciętnych gęstości powierzchni naczyń w całym mózgu. Okolice te zostały oznaczone w następujący sposób: A – płaty czołowe, B – płaty ciemieniowe, C – płaty potyliczne, D – płaty skroniowe, E – most oraz F – mózdzek. Dla każdej z badanych okolic wyliczono średnią zawartość naczyń w dziesięciu mózgach z wadą siniczną i w dziesięciu mózgach dzieci z wadą bezsiniczną.

Tabela 3 przedstawia zbiorczo wyniki obliczeń. W poszczególnych szeregach podano średnią procentową zawartość naczyń krwionośnych w każdej z badanych okolic mózgu. W kolumnach oznaczonych jako „SA” dane odnoszą się do istoty białej, natomiast kolumny oznaczone jako „SS” przedstawiają średnią procentową zawartość naczyń w istocie szarej. Według zasad stereologii dane uzyskane z obliczeń za pomocą siatki testowej można bezpośrednio przedstawić w procentach, ponieważ siatka zawiera 100 punktów przecięć, stąd każda obliczona ilość trafień przedstawia procentową zawartość badanej struktury. Podane na dole tabeli podsumowane wartości po podzieleniu przez 6 (ilość wyróżnionych i osobno badanych okolic mózgu) daje ostateczny poszukiwany wynik, czyli przeciętną procentową zawartość (gęstość) naczyń krwionośnych w istocie szarej i białej mózgów dzieci zmarłych z wadami sinicznymi i bezsinicznymi serca. Wartości te figurują w najniższym szeregu tabeli oznaczonym nazwą „WYNIK”. Uzyskane w ten sposób wyniki badań przedstawiają się następująco:

- 1) Średnia zawartość naczyń krwionośnych w istocie białej u dzieci z wadami niesinicznymi wynosi 3,39%.
- 2) Średnia zawartość naczyń krwionośnych w korze i istocie szarej w tej samej grupie przypadków wynosi 4,38%.

Tabela 3. Wyniki pomiarów

Table 3. Measurement results

Okolice mózgu Brain region	Wady siniczne Cyanotic malformations		Wady bezsiniczne Non-cyanotic malformations	
	SA	SS	SA	SS
A	8,12	12,98	2,2	4,0
B	9,9	10,0	3,76	4,48
C	9,4	9,8	3,96	4,78
D	8,4	10,62	3,28	4,66
E	9,4	9,56	3,42	4,58
F	8,94	8,4	3,72	3,60
Suma Total	54,16	61,36	20,34	26,26
Wynik Result	9,03%	10,22%	3,39%	4,38%

SA – istota biała
white substance

SS – istota szara
grey substance

A – okolica czołowa
frontal region

B – okolica ciemieniowa
parietal region

C – okolica potyliczna
occipital region

D – okolica skroniowa
temporal region

E – most
pons

F – mózdzek
cerebellum

3) Średnia zawartość naczyń krwionośnych w istocie białej dzieci z wadami sinicznymi wynosi 9,03%.

4) Średnia zawartość naczyń krwionośnych w korze i istocie szarej tej grupy wynosi 10,22%.

Za pomocą testu *t*-Studenta zweryfikowano istotność różnic w stopniu gęstości naczyń krwionośnych, stwierdzając że:

– nie jest istotna statystycznie różnica zawartości naczyń krwionośnych między istotą szarą i białą, zarówno w przypadku mózgow z grupy wad sinicznych, jak też w grupie wad bezsinicznych (wartość testu *t* odpowiednio: 1,12 i 1,99).

– statystycznie znamienne jest różnica zawartości naczyń krwionośnych między istotą białą w grupie wad sinicznych i istotą białą w grupie wad bezsinicznych dla $P = 0,001$ (wartość testu $t = 6,18$), jak też między substancją szarą z grupy wad sinicznych a substancją szarą z grupy wad bezsinicznych dla $P = 0,01$ (wartość testu $t = 4,49$).

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań zdają się wyraźnie wskazywać na rolę układu naczyniowego jako istotnego czynnika w reakcji mózgu na patologicznie zmienione, wskutek wady serca, warunki metaboliczne ustroju dziecka. Czyn-

nikiem wyzwalającym zmiany w naczyniach krwionośnych krążenia mózgowego są stany niedotlenienia. Z doświadczeń Häggendahla i wsp. (1966) wynika, że krótkotrwałe niedotlenienie mózgu, wywołane wzmożeniem ciśnienia wewnątrzczaszkowego do poziomu ciśnienia rozkurczowego krwi, prowadzi do odczynowego przekrwienia mózgu trwającego od 1 do 2 godz. Freeman i Ingvar (1966) w podobnych doświadczeniach, w których niedotlenienie mózgu wywoływano przez podanie do oddychania mieszanki powietrza o niskim stężeniu tlenu, również obserwowali odczynowe, przetrwałe przekrwienie tkanek mózgu. Można zatem przyjąć, że odczynowość naczyń krwionośnych mózgu zależy od okresowego lub przetrwałego niedotlenienia tkanki.

Zarówno w zespole „mózgu oddechowo-wspomagane”, jak i w zespole przepływu luksusowego (luxury perfusion syndrome) Lassena (1966), zmiany w układzie żylnym nadają tkankom mózgu cechy charakterystyczne. W makroskopowej ocenie mózgu u dzieci spostrzegano dodatkowo, że układ żył transcerebralnych był bardziej włączony w proces zaburzeń przepływowych. Istota biała zmieniała bowiem barwę silniej w porównaniu ze strukturami szarymi.

Topografia naczyń żylnych mózgu różni się od topografii naczyń tętniczych. Dotyczy to zwłaszcza głębokiego albo śródmózgowego układu żylnego. Jak podają Kaplan i Ford (1976) głęboki układ żylny położony jest bliżej struktur cewy nerwowej niż układ tętniczy. Odprowadzenie krwi poprzez głęboki układ żylny odbywa się przy tym odmiennie od odprowadzania krwi poprzez układ żylny kory mózgowej. O ile krew ze struktur przykomorowych i istoty białej ośrodka półowalnego zlewa się poprzez żyły transcerebralne i żyły podwysciółkowe w jedną, wspólną żyłę wielką Galena, która osiąga zlewisko zatok, o tyle krew z kory mózgowej odprowadzana jest poprzez układ żylny bezpośrednio do zatok żylnych. Pomimo tych topograficznych odrębności, obydwie układy żyłne mają jednakże szereg połączeń pomiędzy sobą poprzez bardzo liczne anastomozy. W niektórych stanach patologicznych, zwłaszcza w przypadkach, w których zejście śmiertelne było poprzedzone mniej lub dłużej trwającym stanem nieprzytomności lub śpiączką mózgową, stwierdza się znacznego stopnia przekrwienie, przede wszystkim istoty białej ośrodka półowalnego, któremu towarzyszy znaczny obrzęk mózgu.

W badaniach uszkadzającego działania niedotlenienia na ośrodkowy układ nerwowy zwraca się zwykle uwagę na zmiany w istocie szarej, przede wszystkim w komórkach nerwowych struktur szczególnie wrażliwych, takich jak kora mózdzku, zakręt hipokampa i kora mózgowia oraz inne formacje, natomiast z mniejszą dokładnością ocenia się uszkodzenia istoty białej, ponieważ występują one rzadziej. Uszkodzenia istoty białej opisywano dotąd najczęściej w przypadkach śmiertelnych zatruc, bardzo rzadko w nagłych zatrzymaniach akcji serca lub urazach ośrodkowego układu nerwowego. W tych razach, w których stwierdzono uszkodzenie istoty białej w następstwie niedotlenienia (Mani i wsp. 1964; Girard i wsp. 1968; Feigin i wsp. 1973; Ginsberg i wsp. 1974), obserwowano mniejsze niż by to wynikało z rozległości

zmian w istocie białej uszkodzenie istoty szarej. Rozbieżność stopnia i rozległości nieprawidłowości strukturalnych istoty białej oraz szarej w stanach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego wskazywałaby na to, że w uszkodzeniach tych, oprócz samego niedotlenienia, odgrywają rolę jeszcze inne czynniki.

Ginsberg i wsp. (1974), na podstawie obserwacji 3 własnych przypadków uszkodzenia istoty białej u chorych zmarłych w różnym czasie z różnych przyczyn chorobowych, dochodzą do wniosku, że czynnikami tymi są: niskie ciśnienie tętnicze, podniesione ciśnienie żyłne, znacznego stopnia kwasica oraz zaburzenia oddechu.

Niewydolność krążeniowo-oddechowa w konsekwencji prowadzi do hypoksemii, lub do hipoksemii i hiperkapnii. Hipoksemia jest przyczyną reaktywnego przekrwienia mózgu, zwłaszcza u dzieci (Erbslöh 1977; Dreszer, Scholz 1939), ze szczególnym przepełnieniem krwią naczyń żylnych istoty białej mózgu. Bakay i Lee (1955) wykazali doświadczalnie, że hipoksemia i hiperkapnia są przyczyną obrzęku, z tym że pomiar zawartości wody w istocie białej wykazał jej wzrost o 20%, natomiast w istocie szarej tylko o 5%. Stopień przekrwienia istoty białej może być bardzo silny prowadząc nawet do wystąpienia okołożylnych wylewów krwawych. Hallervorden (1939) na podstawie spostrzeganych zmian w mózgach dzieci pisał o pogotowiu obrzękowym istoty białej (Ödembereitschaft), które miałyby być przyczyną tzw. niecałkowitych martwic („unvollständige Gewebsnekrose”) umiejscowionych najczęściej przykomorowo. Jakob (1940) przyczynę zmian w istocie białej upatrywał w utrudnionym odpływie krwi z jamy czaszkowej. Przemawiają za tym również badania doświadczalne Whitea i wsp. (1943), z których wynika, że zwiększenie przepływu przez naczynia mózgowe prowadzi do powiększenia objętości mózgu. Można zatem przyjąć za prawdopodobne zahamowanie odpływu krwi z jamy czaszkowej w tych przypadkach, w których w stanie niedotlenienia zwiększa się ukrwienie mózgu w następstwie reaktywnej hiperemii. Duża wrażliwość istoty białej na działanie czynników szkodliwych znalazła wyraz w postaci zmian, które stały się przyczyną wyodrębnienia wspomnianego już zespołu o nazwie perinatal thelencephalic leukoencephalopathy.

Plastyczność mózgowego układu krążenia u niemowląt z wrodzonymi wadami serca wydaje się bardzo duża. Znajduje to swój wykładnik we względnym lub rzeczywistym zwiększeniu objętości łożyska naczyniowego.

Zdaniem Erbslöh (1958), przystosowanie się do znacznego stopnia niedostatku tlenu jest procesem długotrwałym. Rozwija się w tych przypadkach sinica mieszana, w której dowóz tlenu do mózgu w pierwszych tygodniach i miesiącach życia jest jeszcze wystarczający. Niedostatek tlenu musi jednak osiągnąć takie nasilenie, aby stanowił odpowiednio silny bodziec do przystosowania się układu naczyniowego i tkanek mózgu do tych nieprawidłowych warunków. Mechanizmy przystosowawcze nie zostają uruchomione, jeśli niedostatek tlenu jest nieznaczny lub nadmierny. W pierwszym przypadku dochodzi do zgonu, gdy wystąpią ostre niedostatki tlenu. W drugim stopień niedostatku tlenu jest tak wysoki, że mechanizmy przystosowania nie mają

warunków do wytworzenia się i bardzo szybko dochodzi również do zgonu. Takie nienadążanie uruchomienia mechanizmów przystosowawczych prowadzi do zgonu w ciągu 1, najpóźniej 2 roku życia (Torplan 1976). W przypadkach sinicy małego lub średniego stopnia, związanej z istnieniem złożonej, wrodzonej wady serca, nagłe dołączenie się pogorszenia arterializacji płucnej krwi, prowadzącej do hipoksemii i niedotlenienia mózgowia, prowadzi do zejścia śmiertelnego. W tych przypadkach zmiany anatomiczne w mózgu są zaskakująco małe. Mosseberger (1949) w swojej pracy opisuje tylko ogólne przepełnienie krwią mózgowego układu naczyniowego i poszerzenie światła naczyń mózgowych, ze szczególnie silnym zaznaczeniem tych zmian w istocie białej. Mimo że w tych przypadkach nierzadko stopień przepełnienia układu naczyniowego krwią jest równomiernie rozłożony na istotę białą i szarą, co przyczynia się do zatarcia różnic między tymi dwoma strukturami, to jednak własne obserwacje oraz opisy różnych autorów, m.in. Erbslöh (1958), podkreślają, że nasilenie tych zmian w istocie białej i w pniu mózgowym występuje ze znamienne częstą regularnością. Zagęszczeniu naczyń w pniu mózgowym towarzyszy glioz (Takashima i wsp. 1978).

Interesujący wydaje się być wynikający z naszych badań fakt, że nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w gęstości łożyska naczyniowego między istotą białą i szarą w mózgach dzieci z tym samym typem wady. Istotną natomiast była różnica gęstości łożyska naczyniowego pomiędzy istotą białą w mózgach dzieci z wadą siniczą i bezsiniczą. Nasuwa się pytanie – skąd pochodzą te dodatkowo ujawniające się naczynia krwionośne w istocie białej dzieci z wadą siniczą? Czy są to anastomozy, które ulegają udroźnieniu w tych szczególnych warunkach krążenia? Czy są to naczynia krwionośne rezerwowe, wykorzystane tylko w warunkach szczególnego lub skrajnego obciążenia mózgowego układu krążenia? W badaniach histologicznych nie można wykazać zmian w tych naczyniach wskazujących na proces ich nowotworzenia. Pomnożenie ilości naczyń nie zapobiega jednak rozwijającym się zaburzeniom w istocie białej mózgu, a znajdujące wyraz w rozwijających się ogniskach demielinizacji.

Rozmiary tych zmian, ich rozwój, stopień nasilenia są przedmiotem dalszych badań.

MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN CYANOTIC AND NON-CYANOTIC CONGENITAL HEART FAILURES IN THE DEVELOPMENTAL AGE

I. MORPHOMETRIC EVALUATION OF CEREBRAL AND CEREBELLAR VASCULARIZATION IN CYANOTIC AND NON-CYANOTIC CONGENITAL HEART FAILURES

Summary

Morphometric evaluation of the vascular bed of the brain and cerebellum in children with congenital heart diseases of cyanotic type (10 cases) and non-cyanotic type (10 cases) was performed. The measurements were done by the use of an ocular test raster at 200 × magnification.

The studies were based on the observations of tissue slides from the frontal, parietal, occipital and temporal lobe and from the pons and cerebellum. From the mathematical calculations follows that the density of the blood vessels differs in the white matter between the group of cyanotic and non-cyanotic heart malformation on the level of $P = 0.001$ (the value of $T = 6.18$) and in the grey matter on the level of $P = 0.01$ (the value of $T = 4.49$). According to the findings it may be suggested that in brains of patients with cyanotic type of malformation there is a higher density of functioning blood vessels both in the grey and white matter.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИЗМЕНЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ В СИНЮШНЫХ И НЕСИНЮШНЫХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКАХ СЕРДЦА В ВОЗРАСТЕ РАЗВИТИЯ.

I. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МОЗГА И МОЗЖЕЧКА В СИНЮШНЫХ И НЕСИНЮШНЫХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКАХ СЕРДЦА

Резюме

Проведено морфометрическую оценку васкуляризации мозга и мозжечка во врожденных пороках сердца, синюшных (10 случаев) и несинюшных (10 случаев). Измерения проводились с употреблением окулярной сетки (raster) в увеличении 200 раза. Морфометрические исследования велись в срезах с лобных, теменных, затылочных и височных долей, с моста и мозжечка. Вычисления показали, что существует статистически значимая разница между количеством кровеносных сосудов белого вещества в группе синюшных и несинюшных пороков ($P = 0,001$, достоинство теста $T = 6,18$), а также между серым веществом в группе синюшных пороков и серым веществом в группе несинюшных пороков ($P = 0,01$, достоинство теста $T = 4,49$). Таким образом обнаружено увеличение количества проходимых сосудов в синюшных пороках сердца.

PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1966, 91, 697–706.
2. Dreszer R., Scholz W.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Hirndurchblutungsstörungen beim generalisierten Krampf. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.*, 1939, 194, 140–162.
3. Erbslöh F.: Hirnpathologie der kongenitalen Herzfehler mit Mischungscyanose. W.: Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie. Red. W. Scholz, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1958, pp. 1355–1375.
4. Feigin L., Budzilovich G., Wienberg S.: Degeneration of the white matter in hypoxia, acidosis and edema. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1973, 32, 125–143.
5. Freeman J., Ingvar D. H.: Elimination of the cerebral blood-flow-EEG relationship and autoregulation by hypoxia. W: Blood flow through organs and tissues. Red. W. H. Bain, A. M. Harper, Edinburgh, Livingstone, 1968, pp. 258–259.
6. Gilles H., Murphy A. J.: Perinatal leukoencephalopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1969, 34, 262–274.
7. Ginsberg M. D., Hedley-Whyte T. E., Richardson E. P.: Hypoxic ischemic leukoencephalopathy in the primate. I. Physiological and metabolic aspects. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 202–208.
8. Girard P. F., Tomassi M., Rochet M.: Leuco-encephalopathies avec cavitations massive, bilaterales et symetriques. Syndrome de decortication post-traumatique. *Press Med.*, 1968, 76, 163–166.
9. Hallervorden J.: Kreislaufstörungen in der Ätiologie des angeborenen Schwachsinn. *Z. Neurol.*, 1939, 167, 527–541.

10. Häggendahl E. J., Löfgen W. J., Milsson J., Zwetnow N.: Prolonged reactive hyperaemia after periods of increased cerebrospinal fluid pressure. *Acta Neurol. Scand.*, 1967, 43, 239–256.
11. Jakob H.: Über die diffuse Markdestruktion im Gefolge eines Hirnödems. *Z. Neurol.*, 1940, 168, 328–396.
12. Kaplan F. J., Ford D.: *Cerebral blood vessels*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976.
13. Lassen N. A.: The luxury perfusion syndrome and its possible relation in acute metabolic acidosis localized within the brain. *Lancet*, 1966, 2, 1112–1115.
14. Mani K. S., Mc Menemy W. H., Cumings J. W.: Ischemic leukoencephalopathy: A case presenting with presenile dementia. *Confin. Neurol.*, 1964, 24, 404–416.
15. Nosseberger J. I.: Anoxia of the central nervous system and congenital heart diseases. Report of three cases with a note on the history of asphyxia. *Amer. J. Dis. Child.*, 1949, 78, 28–34.
16. Takashima K. L., Armstrong D., Becker L., Bryan C.: Cerebral hypoperfusion in the sudden infant death syndrome? Brain stem gliosis and vasculature. *Ann. Neurol.*, 1978, 4, 257–262.
17. Terplan K. L.: Brain changes in newborn, infants and children with congenital heart diseases in association with cardiac surgery. Additional observations. *J. Neurol.*, 1976, 212, 225–236.
18. Towbin A.: Neuropathological aspects: II. Perinatal brain damage and its aspects. W: *Brain dysfunction in children: Ethiology, diagnosis and management*. Red. P. Black. Raven Press, New York, 1984, str. 47–77.
19. Oberholzer M.: *Morphometrie in der klinischen Pathologie. Allemeine Grundlagen* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983.
20. White J. C., Brooks J. R., Goldwaith I. C., Adams R. D.: Changes in brain volume and blood content after experimental concussion. *Ann. Surg.*, 1943, 118, 619–634.

Adres autorów: Samodzielna Pracownia Neuropatologii, Instytut Neurologii AM, ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków.

MIROSLAW BESKID, DANUTA MARKIEWICZ
ZMIANY MORFOLOGICZNE W MÓZGU SZCZURÓW
PO DOSERCOWYM I DOOTRZEWNOWYM
PODANIU KWASU CHINOLINOWEGO*

Pracownia Histochemiczna Zakładu Patofizjologii Komórki Centrum Medycznego Kształcenia
Podyplomowego, Warszawa

Po wykryciu kwasu chinolinowego w prawidłowym mózgu u ludzi i zwierząt (Wolfensberger i wsp. 1983) oraz stwierdzeniu jego neurotoksycznych właściwości (Schwarcz i wsp. 1983) wiele uwagi poświęcono zagadnieniu topograficznej wrażliwości neuronów na jego działanie (Schwarcz, Kohle 1983). W badaniach wykonywanych *in vivo* kwas chinolinowy stosowany był wyłącznie domózgowo (Schwarcz, Kohle 1983; Moroni i wsp. 1984; Perkins, Stone 1982; 1983a, b). Podkreślano przy tym fakt, że przy tej drodze podawania przejawia on wyłącznie miejscowe działanie neurotoksyczne nie powodując odległych uszkodzeń neuronalnych.

W związku z powyższym, wydało się uzasadnione podjęcie badań doświadczalnych nad działaniem kwasu chinolinowego na ośrodkowy układ nerwowy szczurów przy jego dosercowym i dootrzewnowym podaniu.

MATERIAŁ I METODY

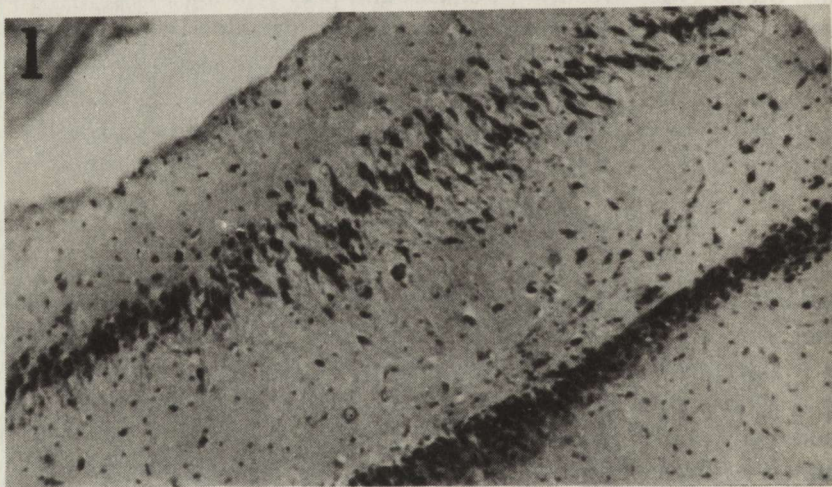
Badania doświadczalne wykonano na szczurach szczepu Wistar z hodowli wsobnej, samcach o masie ciała 200–220 g. Zwierzęta podzielono na dwie grupy w zależności od sposobu podania kwasu chinolinowego, a mianowicie: grupę A z dosercowym i grupę B z dootrzewnowym jego podaniem. W obu grupach było po 15 szczurów. Grupa kontrolna liczyła 10 zwierząt. Kwas chinolinowy (kwas pirydyno 2-,3-karboksylowy) firmy Sigma, wstrzykiwano zwierzętom w krótkotrwałej narkozie eterowej po 1 ml, w dawkach 30 mM/ml, 60 mM/ml i 100 mM/ml przez 4 i 8 kolejnych dni. Następnie po upływie 24 godz. od wstrzyknięcia ostatniej dawki kwasu chinolinowego, zwierzęta perfundowano przy użyciu 10% obojętnego roztworu formaliny. Do perfuzji

* Praca wykonana w ramach CPBP — temat 06-02.II.3.2.

używano zestawu kroplówkowego, którego zbiornik był umieszczony na wysokości 100 cm nad perfundowanym szczurem. Zwierzęta usypiano eterem, otwierano klatkę piersiową, nacinano prawą komorę serca i wprowadzano kaniulę do aorty wstępującej przez lewą komorę. Perfuzję przerywano po zeszywnieniu karku szczura. Następnie otwierano czaszkę, wyjmowano mózgowie i krojono je w płaszczyźnie czołowej na poziomie skrzyżowania nerwów wzrokowych, podwzgórza oraz w miejscu przejścia śródmózgowia w most. Wycinki tkankowe przeprowadzono w sposób rutynowy do parafiny. Preparaty krojone w serii nieciągłej barwiono hematoksyliną i eozyną, tioniną oraz według metody Klüvera-Barrery.

WYNIKI

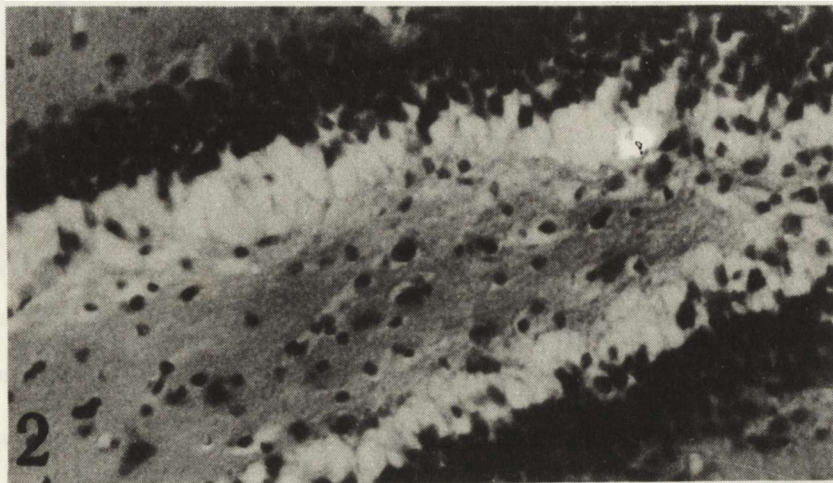
Grupa doświadczalna A. Obraz mikroskopowy mózgu szczurów, po dosercowym wstrzyknięciu kwasu chinolinowego, ujawniał wyraźnie różnice w zależności od wielkości dawki substancji toksycznej i czasu jej stosowania. Przy zastosowaniu kwasu chinolinowego w dawce 30 mM/ml, pierwsze uchwyte nieprawidłowości morfologiczne w mózgu szczurów stwierdzono po jego podaniu przez okres 8 dni. Dotyczyły one zakrętu hipokampa i wyrażały się ogniskowym zgąbczeniem tkanki w warstwie piramidowej, dyskretnym przereźdzeniem neuronów i obecnością zmian zwyrodnieniowych w zachowanych komórkach nerwowych (ryc. 1).



Ryc. 1. Dosercowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 30 mM/ml przez 8 kolejnych dni. Ogniskowe zmiany zwyrodnieniowe w warstwie komórek piramidowych hipokampa polegające na niewielkim ubytku neuronów i zgąbczeniu tkanki. H-E. Pow. 120 ×

Fig. 1. Intracardiac injection of quinolinic acid in a dose of 30 mM/ml during 8 consecutive days. Focal degeneration of pyramidal cell layer of hippocampus in the form of slight neuronal loss and tissue spongiosis. H-E. ×120

Po zastosowaniu dawki 60 mM/ml, uszkodzenie neuronów warstwy piramidowej hipokampa było widoczne już po 4 dniach i jego nasilenie wyraźnie wzrasta po 8 dniach kolejnych wstrzyknień. Ubytki neuronalne były widoczne w całej warstwie komórek piramidowych środkowego i dolnego hipokampa, a ponadto obecne były liczne neurony z cechami zwyrodnienia i rozpadu. Zgąbczenie występowało również na pograniczu warstwy ziarnistej *fascia dentata* i warstwy komórek piramidowych (ryc. 2). U niektórych zwierząt



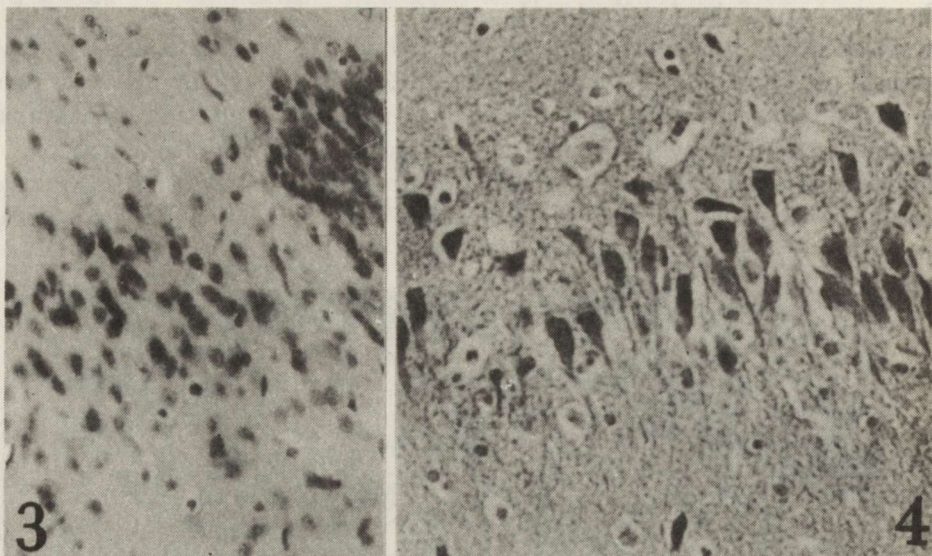
Ryc. 2. Dosercowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 60 mM/ml przez 8 dni. Zgąbczenie tkanki na pograniczu warstwy ziarnistej wnęki hipokampa. H-E. Pow. 300 ×

Fig. 2. Intracardiac injection of quinolinic acid in a dose of 60 mM/ml during 8 days. Tissue spongiosis at the border of the granular layer of hippocampus hilus. H-E. ×300

obserwowano ponadto dyskretne zmiany zwyrodnieniowe w komórkach nerwowych kory entorinalnej oraz w istocie czarnej. Towarzyszyło im zgąbczenie tkanki, szczególnie wyraźnie widoczne w otoczeniu uszkodzonych neuronów (ryc. 3).

Po podaniu kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml, wybitnie wzrastało zarówno nasilenie, jak i rozległość neuronalnych ubytków we wszystkich wyżej wymienionych strukturach anatomicznych mózgowia, tj. w warstwie piramidowej hipokampa, korze entorinalnej i w istocie czarnej (ryc. 4). Przerzedzenie obserwowano również w warstwie ziarnistej zawoju zębatego. Zgąbczenie tkanki przekraczało przy tym obszar ubytków neuronalnych. Stwierdzono ponadto cechy uogólnionego obrzęku mózgu, szczególnie silnie wyrażone w istocie białej półkul (ryc. 5).

Grupa doświadczalna B. Po dootrzewnowym podawaniu kwasu chinolinowego w dawkach 30 mM/ml, 60 mM/ml i 100 mM/ml przez 4 i 8 dni struktura



Ryc. 3. Dosercowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 60 mM/ml przez 8 dni. Zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych i ubytki neuronalne w korze entorhinalnej. H-E. Pow. 300×
 Fig. 3. Intracardiac injection of quinolinic acid in a dose of 60 mM/ml during 8 days. Neuronal degeneration and nerve cell loss in the entorhinal cortex. H-E. ×300

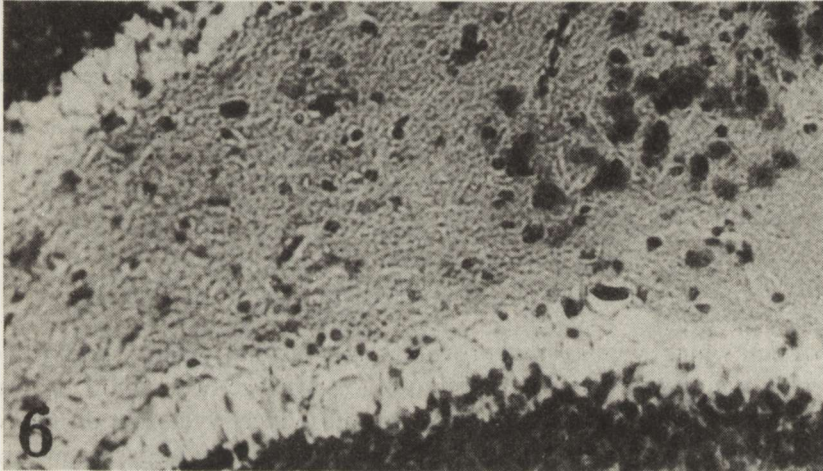
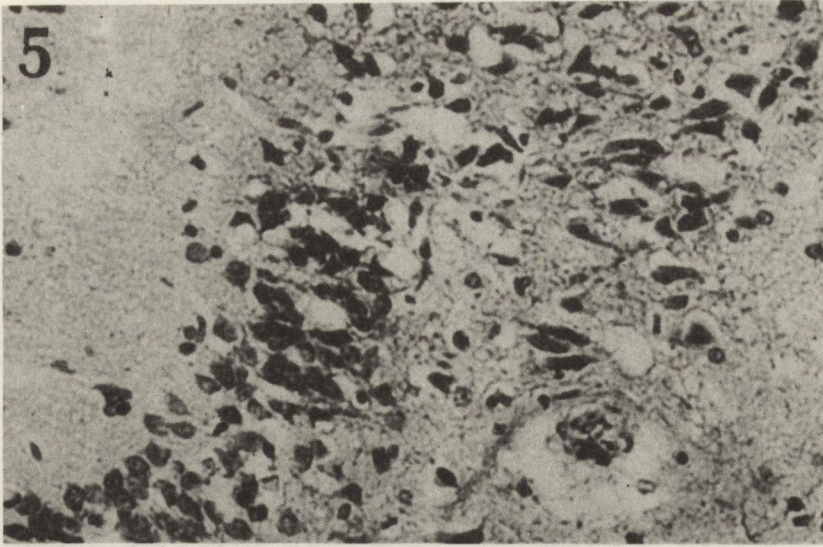
Ryc. 4. Dosercowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml przez 8 dni. Znacznego stopnia zwyrodnienie neuronów oraz zgębczenie tkanki w warstwie komórek piramidowych hipokampa. H-E. Pow. 300×

Fig. 4. Intracardiac injection of quinolinic acid in a dose of 100 mM/ml during 8 days. Marked degeneration of neurons and tissue spongiosis in the pyramidal cell layer of hippocampus. H-E. ×300

i topografia zmian były podobne, jak po dosercowym stosowaniu substancji toksycznej. Stwierdzone różnice pomiędzy obydwoma grupami doświadczalnymi dotyczyły wyłącznie nasilenia i czasu pojawienia się uszkodzeń. Po dootrzewnowym podawaniu kwasu chinolinowego w dawce 30 mM/ml nie stwierdzono żadnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym zarówno po 4, jak i po 8 dniach jego stosowania.

Najwcześniejsze mikroskopowo uchwytne zmiany widoczne były w mózgu szczurów po 8 kolejnych wstrzyknięciach kwasu chinolinowego w dawce 60 mM/ml. Były one dyskretne i występowały ogniskowo. Miały one postać zwyrodnienia komórek piramidowych hipokampa i zgębczeń w warstwie komórek ziarnistych zawoju zębatego (ryc. 6). U pojedynczych zwierząt stwierdzono również dyskretne zaznaczone zmiany zwyrodnieniowe i zgębczenie w korze entorhinalnej oraz istocie czarnej.

Po wstrzyknięciu kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml przez 4 i 8 dni, przy braku różnic w lokalizacji uszkodzeń, wzrastało wyraźnie ich nasilenie. Wśród dużej liczby zwyrodniałych neuronów zaobserwowano znacz-



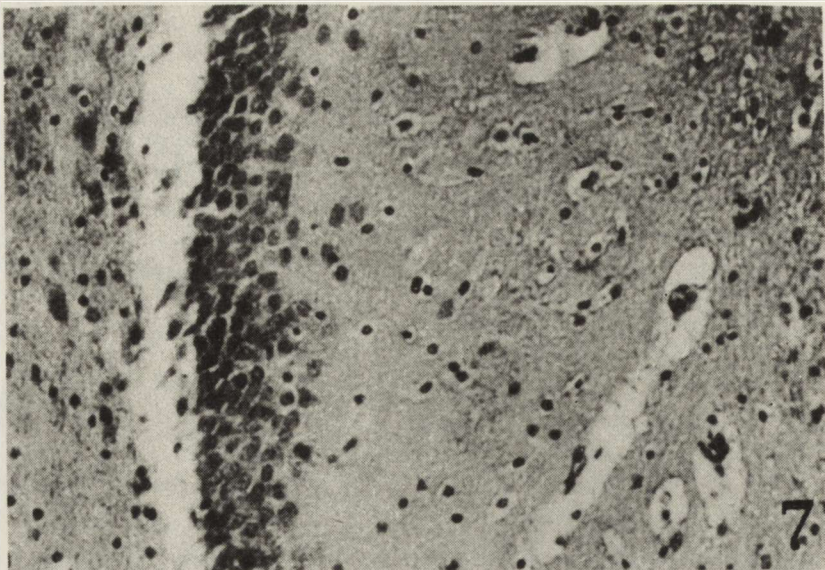
Ryc. 5. Dosercowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml przez 8 dni. Zmiany zwyrodnieniowe i ubytki neuronalne w korze entorhinalnej z widocznym zgębczeniem podłoża. Klüver-Barrera. Pow. 300 ×

Fig. 5. Intracardiac injection of quinolinic acid in a dose of 100 mM/ml during 8 days. Neuronal degeneration and nerve cell loss in the entorhinal cortex. Tissue spongiosis is also visible. Klüver-Barrera. × 300

Ryc. 6. Dootrzewnowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 60 mM/ml przez 8 dni. Zgębczenie na pograniczu warstwy komórek ziarnistych i wnęki hipokampa. H-E. Pow. 300 ×

Fig. 6. Intraperitoneal injection of quinolinic acid in a dose of 60 mM/ml during 8 days. Tissue spongiosis at the border of granular cell layer and hippocampus hilus. H-E. × 300

ne ubytki komórkowe. Stwierdzono również większe zgębczenie podłoża tkankowego w polach neuronalnych uszkodzeń. Ponadto widoczne były zmiany stanowiące wykładniki uogólnionego obrzęku mózgu wyrażające się rozrzedzeniem podłoża tkankowego w istocie białej mózgu i poszerzeniem przestrzeni okołonaczyniowych (ryc. 7).



Ryc. 7. Dootrzewnowe podanie kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml przez 4 dni. Uszkodzenie neuronów i zgębczenie tkanki w zakręcie zębatym oraz zmiany obrzękowe pochodne w istocie białej hipokampa. H—E. Pow. 300 ×

Fig. 7. Intraperitoneal injection of quinolinic acid in a dose of 100 mM/ml during 4 days. Neuronal damage and tissue spongiosis in the dentate gyrus. Edematous changes in the white matter of hippocampus. H—E. ×300

OMÓWIENIE

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań należy podkreślić, że dosercowe podawanie kwasu chinolinowego w dawce 30 mM/ml prowadziło do rozwoju uszkodzeń komórkowych, ograniczonych wyłącznie do neuronów piramidowych zwoju hipokampa dopiero po 8 dniach jego stosowania. Ta sama dawka substancji toksycznej wprowadzona dootrzewnowo pozostawała bez wpływu na obraz morfologiczny mózgowia zarówno przy 4-, jak i 8-dniowym stosowaniu. Kwas chinolinowy podawany dosercowo i dootrzewnowo w dawce 60 mM/ml powodował już po 4 dniach uszkodzenia neuronów zarówno w hipokampie, jak i w korze entorinalnej i istocie czarnej. Po dosercowym wstrzyknięciu substancji nasilenie uszkodzeń było znacznie większe niż po jej podaniu dootrzewnowym. Po zastosowaniu kwasu chinolinowego w dawce 100 mM/ml zarówno dosercowo, jak i dootrzewnowo poza uszkodzeniami komórek nerwowych rozwijał się obrzęk mózgu z wtórnymi zmianami obrzękopochodnymi oraz pojawiały się cechy rozpadu elementów strukturalnych podłoża tkankowego.

Porównanie wyników badań uzyskanych w poszczególnych grupach doświadczalnych wykazuje, że zmiany morfologiczne stwierdzone w mózgu

szczurów po podaniu kwasu chinolinowego były zróżnicowane i uzależnione od wielkości dawki, czasu i sposobu stosowania substancji toksycznej. Na podkreślenie zasługuje jednakże fakt, że zarówno po dosercowym, jak i dootrzewnowym wprowadzeniu kwasu chinolinowego występowało wybiórcze uszkodzenie komórek nerwowych. Zwyródnienie i ubytki neuronalne obecne były w trzech strukturach ośrodkowego układu nerwowego: w hipokampie, korze entorinalnej i istocie czarnej. Topograficzny rozkład nieprawidłowości tkankowych, stwierdzony przez nas, obok podobieństw wykazuje również pewne odrębności w stosunku do doświadczeń z domózgowym stosowaniem kwasu chinolinowego. W tym przypadku bowiem poza uszkodzeniem komórek nerwowych w korze mózgu i hipokampie stwierdzono również intensywne zmiany zwyródnieniowe w neuronach prążkowania (Perkins, Stone 1983a,b; Schwarcz i wsp. 1983, 1984; Stone i wsp. 1985).

Na obecnym etapie badań trudno byłoby jednoznacznie określić przyczyny występowania różnic w topografii uszkodzeń neuronalnych obserwowanych po układowym i miejscowym zastosowaniu kwasu chinolinowego. W tym kontekście warto jednakże zwrócić uwagę na wyniki badań biochemicznych, wykonanych na ludzkim materiale sekcyjnym, które wykazały, że w jądrze ogoniastym i istocie czarnej stwierdza się najwyższą aktywność fosforybozylotransferazy – enzymu uczestniczącego w rozkładzie kwasu chinolinowego (Foster i wsp. 1985).

Zestawienie wyników własnych badań z danymi z piśmiennictwa (Schwarcz, Kohle 1983; Schwarcz i wsp. 1983, 1984; Stone i wsp. 1985) wskazuje, że pozamózgowe, a zwłaszcza dosercowe zastosowanie kwasu chinolinowego podobnie jak jego podawanie domózgowe powoduje wybiórcze uszkodzenie neuronów, a w związku z tym może mieć zastosowanie w dalszych badaniach doświadczalnych.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN OF RATS AFTER INTRACARDIAC AND INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF QUINOLINIC ACID

Summary

Quinolinic acid (QUIN) was administered intracardially and intraperitoneally in a dose of 30 mM/ml, 60 mM/ml and 100 mM/ml during 4 and 8 consecutive days. It was found that administration of QUIN in a dose of 30 mM/ml during 4 days does not produce a damaging effect, whereas in other experimental conditions it leads to neuronal damage and tissue changes. The characteristic feature of both intracardiac and intraperitoneal injections of neurotoxin was the presence of degenerated neurons and tissue spongiosis, selectively developing in hippocampus, substantia nigra and entorhinal cortex.

The presented results indicate that QUIN administered extracerebrally causes selective neuronal damage similar in its topography to changes found in the brain after intracerebral application of this drug.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГУ КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИСЕРДЕЧНОГО И ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ ХИНОЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Хинолиновая кислота вводилась внутрисердечно и внутривнутрибрюшинно в суточной дозе 30 мМ/мл, 60 мМ/мл и 100 мМ/мл в течение 4 и 8 дней.

Полученные результаты доказали, что хинолиновая кислота, употребляемая в дозе 30 мМ/мл в течение 4 дней не проявляла повреждающего действия, но в остальных случаях вела к изменениям нейронов и стромы.

Характерной чертой во внутрисердечном и внутривнутрибрюшинном употреблении хинолиновой кислоты было присутствие дегенерированных нейронов и спонгиоз стромы, обнаруженные селективно в гиппокампе, черном веществе и энторинальной коре. Показано, что хинолиновая кислота во внутримозговом употреблении вызывает избирательные повреждения нейронов, сходные в своей топографии с изменениями, обнаруженными при внутримозговом введении.

PIŚMIENNICTWO

1. Moroni F., Lombardi G., Carla V., Moneti G.: The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.*, 1984, 295, 352–355.
2. Foster A. C., Whetsell W. C. Jr., Bird E. D., Schwarcz R.: Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in human and rat brain: activity in Huntingtons disease and in quinolinate-lesioned rat striatum. *Brain Res.*, 1985, 336, 207–214.
3. Perkins M. N., Stone T. W.: An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenicines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.*, 1982, 247, 184–187.
4. Perkins M. N., Stone T. W.: Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res.*, 1983a, 259, 172–176.
5. Perkins M. N., Stone T. W.: Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1983b, 226, 551–557.
6. Schwarcz R., Kohle C.: Differential vulnerability of central nervous system of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.*, 1983, 38, 85–90.
7. Schwarcz R., Whetsell W. O. Jr., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogeneous metabolite that produces axon-sparing lesion in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
8. Schwarcz R., Brush G. S., Foster A. C., French E. D.: Seizure activity and lesions after intrahippocampal quinolinic acid injection. *Exp. Neurol.*, 1984, 84, 1–17.
9. Stone T. W., Connick J. H., Winn P., Hastings M. H., English M.: Endogenous excitotoxic agents. W.: Selective Neuronal Death. Ciba Foundation Symposium, J. Wiley and sons, London, 1985, 126, 204–214.
10. Wolfensberger A., Amsler H., Cuenod M., Foster A. C., Whetsell W., Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.*, 1983, 41, 247–245.

Adres autorów: Pracownia Histochemiczna Zakładu Patofizjologii Komórki, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

TERESA BUGERA-PIECUCH

POZIOM KWASU HOMOWANILINOWEGO (HVA) I AKTYWNOŚĆ
AMINOTRANSFERAZY 4-AMINOMAŚLAN:2-OKSOGLUTARANU
(GABA-T) W MÓZGU SZCZURA
PO ZATRUCIU OCTANEM KOBALTAWYM

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Badania doświadczalne nad modelem pozapiramidowym, u szczura, w następstwie zatrucia octanem kobaltawym w warunkach niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wykazały, że głównym czynnikiem mogącym mieć wpływ na rozwój objawów neurologicznych jest naruszenie stosunku stężeń dopamina/GABA w mózgu. W modelu tym, narastającym objawom neurologicznym towarzyszyło obniżenie puli dopaminy (DA) i znaczne zwiększenie poziomu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) (Bugera i wsp. 1987a,b). Przyjmuje się, że podstawowym czynnikiem patogenetycznym zespołu parkinsonowskiego jest obniżenie poziomu DA (McGeer, McGeer 1976). W układzie nerwowym w warunkach jego prawidłowej czynności puli DA odpowiada określone stężenie kwasu homowanilinowego (HVA). Poziom HVA, który stanowi ostateczny produkt rozpadu DA, może wskazywać na stan układu dopaminergicznego w OUN (Hornykiewicz i wsp. 1968; Hornykiewicz 1973; McGeer, McGeer 1976). Zmiana stosunku DA/HVA może świadczyć zarówno o zaburzeniu syntezy DA, jak i o wzmożonym jej rozkładzie. GABA jest znanym neuromediatorem hamującym czynność układu dopaminergicznego. Zmiana stężenia GABA w układzie neuroprzebieżnikowej regulacji w OUN może stanowić o charakterze wywołanego zespołu pozapiramidowego. W badaniach wykonanych uprzednio na tym modelu, u szczurów, z zespołem pozapiramidowym po zatruciu octanem kobaltawym stwierdzono zwiększenie puli GABA w OUN bez powiązania tego zjawiska ze wzmożoną syntezą neuroprzebieżnika (Bugera i wsp. 1987a). Wu (1976) wykazał, że jony Co^{++} hamują *in vitro* w większym stopniu procesy rozkładu GABA aniżeli jego syntezę. Stężenie GABA w tkance ma wpływ na wielkość puli dopaminy (Anden, Stocł: 1973; Fowler 1973). McGeer i wsp. (1977) wykazali związek pomiędzy funkcją układu dopaminergicznego i GABAergicznego szlaku

nigroneostriatalnego, którego naruszenie prowadzi do rozwoju objawów pozapiramidowych.

Celem niniejszej pracy była ocena funkcji układu dopaminergicznego na podstawie stosunku stężeń DA/HVA oraz przyrostu GABA w powiązaniu z aktywnością GABA-T w mózgu szczura po zatruciu octanem kobaltowym w warunkach niedokrwienia OUN o różnym nasileniu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach o masie ciała 150–190 g. Zwierzęta podzielono na następujące grupy: 1. Norma – zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom; 2. Szczury, u których wywołano niedokrwienie mózgu przez podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej lewej; 3. Szczury, którym podwiązano tętnicę szyjną wspólną lewą i podano do tej tętnicy octan kobaltowy w 50 μ l fizjologicznego roztworu NaCl, w dawce 1 mg Co^{++} ; 4. Szczury, którym podwiązano obie tętnice szyjne wspólne; 5. Szczury, którym podwiązano obie tętnice szyjne wspólne oraz podano do tętnicy szyjnej wspólnej lewej octan kobaltowy, podobnie jak w poprzedniej grupie.

Zwierzęta grupy 2–5 przed zabiegiem operacyjnym usypiano gammabutylrolaktonem wstrzykiwanym dootrzewnowo w dawce 500 mg/kg masy ciała. Uśmiercano je po upływie 24 i 72 godz. od zabiegu, przez dekapitację. Dekapitowano również szczury grupy 1 (norma). Mózgi natychmiast po pobraniu oziębiano na suchym lodzie i izolowano prążkowie, istotę czarną, korę centralną oraz zakręt hipokampa. Izolowane struktury natychmiast zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem i ważono. Pobrany materiał wykorzystano do oznaczenia poziomu HVA oraz aktywności GABA-T.

Oznaczanie poziomu HVA – metoda Corrodi i Werdinius (1965) w modyfikacji Farleya i wsp. (1977). Wyizolowane struktury mózgowia homogenizowano w 0,05 mol/l buforze Trizma o pH 8,5 w stosunku 1:20. Homogenat wirowano w $+4^{\circ}\text{C}$ przez 10 min. przy 3600 g. Do 200–400 μ l odwirowanego homogenatu dodawano 1 ml 0,4 mol/l kwasu nadchlorooctowego (PCA) z cysteiną (150 ml PCA+25 mg cysteiny+ 0,4 g KCl). Mieszaninę tę wytrząsano 15 s w wytrząsarce, a następnie ręcznie przez 5 min. Osad odwirowywano w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przy 3600 g przez 10 min. Do nadsącza dodawano 4 ml octanu butylu oraz kilka kryształków KCl. Wytrząsano dwukrotnie po 1 min. Do 3,5 ml fazy organicznej dodawano 1,2 ml 0,05 mol/l buforu Trizma o pH 8,5 i wytrząsano przez 1,5 min. Odrzucano fazę z octanem butylu, a fazę wodną w objętości 1 ml uzupełniano o 0,1 ml 0,05 mol/l buforu Trizma o pH 8,5, 0,1 ml 2 mol/l NH_4OH , 50 μ l 0,008% $\text{K}_3\text{Fe/CN}/_6$, a po 4 min 50 μ l 1% cysteiny. Równocześnie do każdej serii badań wykonywano krzywą standardową oraz oznaczano standard wewnętrzny i ślepą próbę. Wyniki odczytywano za pomocą spektrofлуorymetru Aminco-Bowman przy długości fali wzbudzenia 318 nm i długości fali emisji 420 nm.

Oznaczanie aktywności GABA-T wykonano metodą Baxtera (1972). Tkanę homogenizowano w 0,1 mol/l buforze boranowym, pH 8,2, wzmocnionym *ex tempore* fosforanem pirydoksalu (PLP – 20 µg/ml) i zredukowanym glutationem (10 µg/ml). Homogenaty 10% w objętości 0,3 ml inkubowano przez 1 godz. w temperaturze 37–38°C z objętością 0,7 ml mieszaniny inkubacyjnej, w skład której wchodził: alfa-ketoglutaran (0,25 mol/l), GABA (0,25 mol/l), PLP (200 µg/ml) i zredukowany glutation (200 µg/ml). Po inkubacji próby wstawiano natychmiast do lodu i dodawano do każdej z nich 0,5 ml 15% TCA. Następnie po pół godzinie wirowano przez 10 min przy 1200 g. Kwas trójchlorooctowy (TCA) usuwano przez wytrząsanie z 1,5 ml eteru, po czym eter odciągano pompką wodną, a jego nadmiar odparowywano w łaźni wodnej w temperaturze 80°C przez 1 min. W dalszym etapie do 1 ml nadsącza dodawano 3 ml odczynnika miedziowego. Próby wirowano przez 10 min przy 1200 g. Z kolei do 1 ml nadsącza dodawano 3 ml 0,0069 mol neocuproiny w buforze octanowym i 50 mg witaminy C. Jednocześnie do każdej serii badań wykonywano krzywą standardową oraz próby kontrolne. Wyniki odczytywano przy długościach fali 454 nm. Aktywność enzymu wyrażano w nmol glutaminianu/mg białka/godz. Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951).

WYNIKI

Obserwacje kliniczne. U szczurów, którym podwiązano jedną tętnicę szyjną wspólną oraz u tych zwierząt, którym dodatkowo podano do tej tętnicy octan kobaltawy po 24 i 72 godz. od zabiegu, nie zaobserwowano żadnych zaburzeń neurologicznych. Nie zanotowano ich także u zwierząt, którym podwiązano obie tętnice szyjne wspólne. Natomiast u szczurów, którym podwiązano obie wymienione tętnice i podano octan kobaltawy po 24 godz. od operacji, obserwowano drżenie głowy i zuchwy, wzmożone napięcie mięśniowe i postępujące obniżenie aktywności ruchowej.

Badania biochemiczne. Poziom HVA, stężenie DA oraz stosunek stężeń DA/HVA w badanych strukturach mózgu szczurów z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną wspólną i u szczurów, którym dodatkowo podano do tej tętnicy octan kobaltawy zestawiono w tabeli 1 (dane dotyczące DA wykorzystano z pracy T. Bugery i wsp. 1987b).

Po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej po 24 i 72 godz. od zabiegu operacyjnego nie stwierdzono znamiennych różnic w zawartości HVA i DA w porównaniu z normą, w żadnej z badanych struktur. Stosunek stężeń DA/HVA u zwierząt z 24 godz. przeżyciem wynosił w prążkowie 1,06, w istocie czarnej 1,01, w korze mózgu 0,96, a w zakręcie hipokampa 1,02. U szczurów z 72 godz. przeżyciem w prążkowie 0,99, w istocie czarnej 0,96, w korze mózgu 1,0 i w zakręcie hipokampa 0,98 (przy przyjęciu stosunku DA/HVA w badanych strukturach w normie równym 1). U zwierząt, którym podwiązano jedną tętnicę szyjną wspólną i podano octan kobaltawy nie

Tabela 1: Stężenie DA i HVA (pmol/mg białka) oraz stosunek stężeń DA/HVA w mózgowiu szczura po zatruciu octanem kobaltowym i jednostronnym niedokrwieniu OUN

Table 1: DA and HVA concentration (pmol/mg protein) and DA/HVA ratio in rats after cobaltous acetate intoxication and unilateral CNS ischemia

Struktury Structures	Norma Norm	Jednostronne niedokrwienie Unilateral ischemia		Jednostronne niedokrwienie + Co ⁺⁺ Unilateral ischemia + Co ⁺⁺ intox.		
		godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	
Prążkowie	DA	905,71 ± 65,71 (6)	945,15 ± 89,41 (6)	882,43 ± 88,10 (6)	873,52 ± 60,56 (6)	876,93 ± 80,89 (6)
	HVA	985,62 ± 16,24 (6)	1017,73 ± 111,43 (6)	967,82 ± 53,20 (6)	927,83 ± 85,71 (6)	931,65 ± 84,2 (6)
Striatum	DA/HVA	1 (6)	1,06 (6)	0,99 (6)	1,02 (6)	1,02 (6)
	DA	100,00 ± 14,08 (8)	108,56 ± 10,34 (8)	90,79 ± 10,23 (8)	92,65 ± 10,19 (8)	91,18 ± 10,19 (8)
Istota czarna	HVA	111,13 ± 12,21 (9)	120,32 ± 12,10 (9)	107,43 ± 10,97 (9)	101,32 ± 13,31 (9)	99,87 ± 10,62 (9)
	DA/HVA	1 (6)	1,01 (6)	0,96 (6)	1,03 (6)	1,02 (6)
Kora centralna	DA	48,57 ± 7,12 (6)	50,32 ± 5,54 (6)	50,11 ± 5,34 (6)	44,00 ± 3,69 (6)	42,59 ± 3,71 (6)
	HVA	63,49 ± 6,84 (6)	68,20 ± 6,60 (6)	65,31 ± 7,20 (6)	59,82 ± 5,10 (6)	58,64 ± 5,94 (6)
Central cortex	DA/HVA	1 (6)	0,96 (6)	1 (6)	0,97 (6)	0,95 (6)
	DA	20,00 ± 2,93 (6)	19,41 ± 1,44 (6)	20,45 ± 1,83 (6)	17,89 ± 1,94 (6)	19,78 ± 1,67 (6)
Zakręt hipokampa	HVA	21,35 ± 1,02 (6)	20,21 ± 2,00 (6)	22,25 ± 1,94 (6)	19,68 ± 1,85 (6)	20,03 ± 1,95 (6)
	DA/HVA	1 (6)	1,02 (6)	0,98 (6)	0,96 (6)	1,05 (6)

Wyniki stanowią średnią ± średni błąd średniej

Results are means ± SEM

W nawiasach podano liczbę zwierząt

In parentheses number of animals

* $p < 0,05$ – prawdopodobieństwo obliczone wg testu t-Studenta

* $p < 0.05$ – probability calculated according to Student's t-test

DA/HVA – przy przyjęciu normy za 1

DA/HVA – norm means 1

DA – wyniki z pracy Bugery i wsp. (1987b)

DA – results from paper of Bugera et al. (1987b)

stwierdzono również w obu grupach czasowych istotnych różnic w stężeniu DA i HVA w porównaniu z normą.

W tabeli 2 zestawiono zawartości HVA, DA (wykorzystane z pracy Bugery i wsp. 1987b) oraz stosunek stężeń DA/HVA w mózгах szczurów, którym podwiązano tętnicę szyjną wspólną obustronnie, oraz w mózгах zwierząt, którym dodatkowo podano dotętniczo octan kobaltawy.

U szczurów, którym podwiązano obie tętnice szyjne wspólne zarówno po 24, jak i po 72 godz. od zabiegu operacyjnego, nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniu HVA i DA w żadnej z badanych struktur mózgu. Natomiast u zwierząt, którym podano dodatkowo octan kobaltawy po 24 godz., zanotowano statystycznie znamienne obniżenie HVA: w prążkowie o 44,6%, w istocie czarnej o 44,7%, w korze centralnej o 43,7%, a zakręcie hipokampa

Tabela 2: Stężenie DA i HVA (pmol/mg białka) oraz stosunek stężeń DA/HVA w mózgowiu szczura po zatruciu octanem kobaltowym i obustronnym niedokrwiem OUN

Table 2: DA and HVA concentration (pmol/mg protein) and DA/HVA ratio in cobaltous acetate intoxication and bilateral CNS ischemia

Struktury Structures	Norma Norm	Obustronne niedokrwienie Bilateral ischemia		Obustronne niedokrwienie + Co ⁺⁺ Bilateral ischemia + Co ⁺⁺ intox.		
		godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	
Prążkowie	DA	905,71 ± 65,71 (6)	870,00 ± 63,57 (6)	858,86 ± 63,00 (6)	702,86 ± 72,30* (6)	322,86 ± 32,14* (6)
	HVA	985,62 ± 16,24 (6)	954,30 ± 98,10 (6)	1028,42 ± 94,71 (6)	548,33 ± 52,41* (6)	295,36 ± 10,30* (6)
Striatum	DA/HVA	1	0,99	0,91	1,39	1,18
	DA	100,00 ± 14,08 (8)	100,14 ± 9,14 (8)	97,14 ± 9,29 (8)	70,00 ± 6,43* (8)	42,86 ± 4,43* (8)
Istota czarna	HVA	111,13 ± 12,21 (9)	114,25 ± 9,04 (9)	113,33 ± 10,65 (9)	60,32 ± 6,37* (9)	32,11 ± 2,95* (9)
Subst. nigra	DA/HVA	1	0,99	0,97	1,30	1,49
	DA	48,57 ± 7,12 (6)	45,71 ± 4,14 (6)	44,29 ± 5,29 (6)	32,86 ± 3,57* (6)	20,00 ± 1,86* (6)
Kora centralna	HVA	63,49 ± 6,84 (6)	62,37 ± 6,09 (6)	64,55 ± 6,02 (6)	35,74 ± 4,15* (6)	20,92 ± 1,37* (6)
	Central cortex					
Zakręt hipokampa	DA/HVA	1	0,95	0,87	1,19	1,25
	DA	21,35 ± 1,02 (6)	22,11 ± 2,40 (6)	20,09 ± 1,52 (6)	15,35 ± 1,92* (6)	11,05 ± 1,68* (6)
Hippocampus	HVA	21,35 ± 1,02 (6)	22,11 ± 2,40 (6)	20,09 ± 1,52 (6)	15,35 ± 1,92* (6)	11,05 ± 1,68* (6)
	DA/HVA	1	0,96	1,06	1,16	0,96

Objaśnienia w tabeli 1

Explanations in Table 1

o 28,1%, przy czym stosunek stężeń DA/HVA wynosił w tych strukturach odpowiednio 1,39; 1,3; 1,19 i 1,16. W grupie zwierząt z 72 godz. przeżyciem spadek HVA w prążkowie wynosił 70%, w istocie czarnej 71,1, w korze centralnej 67,0% i w zakręcie hipokampa 48,2%. Stosunek stężeń DA/HVA wynosił w prążkowie 1,18, w istocie czarnej 1,49, w korze mózgu 1,25 i w zakręcie hipokampa 0,96.

Wyniki aktywności GABA-T w badanych strukturach mózgu po podwiązaniu szczurom jednej tętnicy szyjnej wspólnej i po podwiązaniu tej tętnicy i podaniu octanu kobaltowego przedstawiono w tabeli 3.

W obu grupach badanych zwierząt zarówno z 24-, jak i z 72 godz. przeżyciem, po zabiegu nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w aktywności enzymu w porównaniu z normą.

W tabeli 4 zestawiono wyniki badania aktywności GABA-T w grupie szczurów z obustronnie podwiązaną tętnicą szyjną wspólną i u zwierząt po podwiązaniu obu tych tętnic i dodatkowo zatrutym octanem kobaltowym.

Obustronne podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej nie spowodowało, w obu badanych przedziałach czasu, istotnych zmian w aktywności enzymu, w żadnej z badanych struktur mózgu. W grupie zwierząt, którym dodatkowo podano

Tabela 3: Aktywność GABA-T (nmole glutamianu/mg białka/min) w mózgowiu szczura po zatruciu octanem kobaltowym i jednostronnym niedokrwieniu OUN

Table 3: GABA-T activity (nmol glutamate/mg protein/min) in the rat brain after cobaltous acetate intoxication and unilateral CNS ischemia

Struktury Structures	Norma Norm	Jednostronne niedokrwienie Unilateral ischemia		Jednostronne niedokrwienie + Co ⁺⁺ Unilateral ischemia + Co ⁺⁺ intox.	
		godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.
Prążkowie Striatum	3,96 ± 0,75 (6)	3,94 ± 0,16 (6)	3,93 ± 0,26 (6)	3,70 ± 0,38 (6)	3,74 ± 0,10 (6)
Istota czarna Subst. nigra	2,96 ± 0,44 (9)	2,91 ± 0,17 (9)	2,93 ± 0,35 (9)	2,82 ± 0,27 (9)	2,57 ± 0,15 (9)
Kora centralna Central cortex	2,55 ± 0,35 (6)	2,58 ± 0,26 (6)	2,56 ± 0,37 (6)	2,38 ± 0,10 (6)	2,44 ± 0,28 (6)
Zakręt hipokampa Hippocampus	2,05 ± 0,18 (6)	2,07 ± 0,36 (6)	2,02 ± 0,47 (6)	1,94 ± 0,19 (6)	2,11 ± 0,10 (6)

Wyniki stanowią średnią arytmetyczną ± średni błąd średniej
Results are means ± mean error of the mean

W nawiasach – liczba zwierząt
In parentheses – number of animals

Tabela 4: Aktywność GABA-T (nmole glutamianu/mg białka/min) w mózgowiu szczura po zatruciu octanem kobaltowym i obustronnym niedokrwieniu OUN

Table 4: GABA-T activity (nmol glutamate/mg protein/min) in the rat brain after cobaltous acetate intoxication and bilateral CNS ischemia

Struktury Structures	Norma Norm	Obustronne niedokrwienie Bilateral ischemia		Obustronne niedokrwienie + Co ⁺⁺ Bilateral ischemia and Co ⁺⁺ intox.	
		godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.	godz. 24 hrs.	godz. 72 hrs.
Prążkowie Striatum	3,96 ± 0,75 (6)	4,02 ± 0,15 (6)	3,88 ± 0,13 (6)	3,40 ± 0,15* (6)	1,81 ± 0,10* (6)
Istota czarna Subst. nigra	2,96 ± 0,44 (9)	2,93 ± 0,18 (9)	2,71 ± 0,19 (9)	2,05 ± 0,18* (9)	1,81 ± 0,17* (9)
Kora centralna Central cortex	2,55 ± 0,35 (6)	2,51 ± 0,17 (6)	2,53 ± 0,10 (6)	2,32 ± 0,12 (6)	2,00 ± 0,10* (6)
Zakręt hipokampa Hippocampus	2,05 ± 0,18 (6)	2,01 ± 0,16 (6)	2,07 ± 0,26 (6)	1,92 ± 0,14 (6)	1,74 ± 0,16* (6)

Wyniki stanowią średnią arytmetyczną ± średni błąd średniej
Results are means ± mean error of the mean

W nawiasach – liczba zwierząt
In parentheses – number of animals

* p < 0,05 – prawdopodobieństwo obliczone wg testu t-Studenta

* p < 0,05 – probability calculated according to t-Student's test

octan kobaltowy po 24 godz. od zabiegu aktywność enzymu wynosiła w prążkowie 85,8% normy, w istocie czarnej 69,1%, przy czym różnice te były statystycznie istotne. W korze centralnej wynosiła ona 90,9% i w zakręcie hipokampa 93,7% (w obu strukturach p > 0,05). U zwierząt z 72 godz. przeżyciem aktywność GABA-T wynosiła w prążkowie 68,5% normy, w istocie czarnej 61,2%, w korze mózgu 78,3% i w zakręcie hipokampa 84,8%. Różnice w aktywności enzymu w tej grupie czasowej były statystycznie znamienne we wszystkich badanych strukturach OUN.

OMÓWIENIE

Podwiązanie jednej tętnicy szyjnej wspólnej, jak również dodatkowe podanie w tych warunkach octanu kobaltowego nie powodowało u szczurów zmian zawartości HVA i nie prowadziło do zaburzenia stosunków stężeń DA/HVA w badanych strukturach mózgu. Nie uzyskano również istotnych różnic w puli DA i HVA w wyniku obustronnego niedokrwienia mózgu szczura wywołanego podwiązaniem obu tętnic szyjnych wspólnych. Wyrównanie krążenia mózgowego w tych warunkach poprzez naczynia koła tętniczego Willizjusza jest zjawiskiem znanym. Podwiązanie obu tętnic szyjnych wspólnych powoduje w mózgu szczura krótkotrwałe i odwracalne zaburzenia metaboliczne, nie prowadzi natomiast do powstania ogniskowych uszkodzeń strukturalnych OUN (Śmiałek i wsp. 1971, Mossakowski i wsp. 1973). Natomiast dodatkowe podanie octanu kobaltowego po podwiązaniu obu tętnic szyjnych wspólnych prowadziło do stopniowego zmniejszania się puli HVA w strukturach dopaminergicznych OUN. Obniżenie poziomu HVA można przypisać obustronnemu spadkowi stężenia DA w korze mózgu. Obserwowano to zjawisko po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej (Welch i wsp. 1971, a także w badanym modelu doświadczalnym). Zmiany w poziomie monoamin katecholowych w niedokrwieniu mózgu przypisywano przejściowemu przyrostowi wody i obrzękowi mózgu (Kogura i wsp. 1976; Welch i wsp. 1976). W wyniku zatrucia octanem kobaltowym szczurów w warunkach niedokrwienia OUN stwierdzono również zmiany obrzękowe, najbardziej nasilone w istocie białej (Bugera-Piecuch, Śmiałek 1987).

Badania doświadczalne wskazują, że synteza amin katecholowych jest hamowana w warunkach niedostatku tlenowego (Moskowitz, Wurtman 1976; Mrsulja i wsp. 1976). Według Lavyne i wsp. (1975), podczas niedotlenienia zmniejsza się aktywność hydrolazy tyrozyny i na tej drodze dochodzi do obniżenia puli DA. Zahamowanie aktywności tego enzymu może znaleźć odbicie w poziomie HVA.

W zastosowanym w tej pracy modelu zatrucia octanem kobaltowym, przy użyciu tej samej dawki kobaltu, obserwowano obniżenie zawartości puli DA i HVA tylko w warunkach bardziej nasilonego niedokrwienia OUN. Zwiększenie stosunku DA/HVA w tej grupie zwierząt doświadczalnych wskazuje na większe obniżenie stężenia HVA i być może na przyspieszenie rozpadu DA. Ten mechanizm może mieć miejsce, jakkolwiek niektórzy autorzy uważają, że w późniejszym okresie niedokrwienia mózgu dochodzi do gromadzenia się HVA w uszkodzonych strukturach OUN, nawet w wypadku upośledzenia syntezy jego prekursora DA (Welch i wsp. 1976), co według Moskowitza i Wurtmana (1976) związane jest z zahamowaniem mechanizmu transportu z mózgu do krwi. W zastosowanym przez nas modelu nie obserwowano u szczurów ognisk rozpadu tkanki w OUN, dlatego należy uwzględnić inny mechanizm obniżenia stężenia HVA. Hamowanie procesów syntezy i rozpadu

DA o różnym nasileniu występują w chorobie Parkinsona (Hornykiewicz i wsp. 1968). Można sądzić, że w naszym modelu doświadczalnym zwiększenie rozpadu DA i obniżenie jej poziomu w OUN mogło stanowić przyczynę pojawienia się i narastania objawów pozapiramidowych u szczurów. Zbadanie efektu działania jonów Co^{++} na poszczególne etapy przemian DA mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu zaburzenia stosunku stężeń DA/HVA w warunkach niedokrwienia mózgu.

Uzyskane wyniki aktywności GABA-T wskazują, że większe niedokrwienie OUN (po podwiązaniu obu tętnic szyjnych wspólnych) przy użyciu takiej samej dawki octanu kobaltawego, prowadziło do zwiększenia zahamowania rozkładu GABA na poziomie katalizowanym przez aminotransferazę 4-amino-maślan-2-oksoglutaran. Zaobserwowano przy tym narastającą wraz z upływem czasu inhibicję tego enzymu we wszystkich badanych strukturach mózgu szczura. Wcześniejsze badania na tym samym modelu doświadczalnym wykazały, że synteza GABA ulega również zahamowaniu (Bugera i wsp. 1987a). Można więc sądzić, że w zastosowanych warunkach doświadczalnych występował efekt większego hamowania procesów rozpadu GABA niż proces jego syntezy. Również w badaniach prowadzonych *in vitro* (Wu 1976) stwierdzono, że jony Co^{++} mają większą zdolność do hamowania procesów rozkładu GABA. Znaczny obrzęk wszystkich badanych struktur mózgu po zatruciu octanem kobaltawym, (Bugera, Śmiałek 1987), może sugerować wpływ tego czynnika na zwiększenie poziomu GABA w zastosowanym w tej pracy modelu doświadczalnym. Zwiększenie poziomu GABA można również przypisać wpływowi jonów Co^{++} na zakończenie synaptyczne, głównie neuroprzekazników hamujących i na procesy ich uwalniania (Kita, Van der Kloot 1973; Weakly 1973; Nakajima 1975).

Można sądzić, że u badanych szczurów w zastosowanych w tej pracy warunkach doświadczalnych zwiększenie stężenia GABA i jego bezpośredni wpływ na pulę DA prowadzi do zmiany stosunków DA/GABA i DA/HVA, co w konsekwencji może prowadzić do wystąpienia zespołu pozapiramidowego u badanych zwierząt. Uzyskany w tym modelu zespół neurologiczny i biochemiczny stanowi efekt neurotoksycznego działania octanu kobaltawego oraz niedokrwienia mózgu. Na znaczący wpływ niedotlenienia ischemicznego w badanym modelu doświadczalnym może wskazywać wzrost stężenia GABA i obniżenie zawartości DA wykazany w niedokrwieniu mózgu u chomika mongolskiego (Lust i wsp. 1975).

WNIOSKI

1. Zahamowanie aktywności GABA-T oraz obniżenie poziomu HVA w mózgu szczurów, po zatruciu octanem kobaltawym tych zwierząt, zależy od stopnia niedokrwienia OUN.

2. Zmiany w stosunkach stężeń DA/HVA mogą wskazywać na przewagę hamowania procesów rozpadu DA nad jej syntezą w mózgowiach zwierząt zatrutowanych octanem kobaltawym w warunkach niedokrwienia OUN.

HOMOVANILIC ACID (HVA) LEVEL AND GABA-T ACTIVITY IN THE RAT BRAIN AFTER COBALTOUS ACETATE INTOXICATION

Summary

The aim of the studies was to evaluate changes of the DA/HVA ratio and of GABA-T activity in the adult Wistar rats subjected to cobaltous acetate intoxication and unilateral or bilateral cerebral ischemia by ligation of the common carotid artery.

The studies revealed decrease of DA and HVA concentration in all investigated brain structures only in the animals intoxicated with cobaltous acetate with concomitant bilateral cerebral ischemia. Higher drop of HVA level on the basis of DA/HVA ratio may suggest an increase of DA catabolism. In the same group of animals inhibition of GABA-T activity was noted being probably the cause of increased GABA content in the brain.

УРОВЕНЬ ГОМОВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ (HVA) И АКТИВНОСТЬ GABA-T В МОЗГУ КРЫСЫ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ СОЛЯМИ КОБАЛЬТА

Резюме

Целью исследования была оценка функции допаминергической системы на базе отношения концентрации допамина (DA) и HVA и изменения GABA в связи с активностью аминотрансферазы GABA-T. Исследовались мозги крыс после интоксикации кобальтавым ацетатом в условиях ишемии мозга. Эксперименты проводились на самцах крыс расы Wistar массой 150–190г.

Проведенные испытания обнаружили приостановление активности аминотрансферазы GABA-T и понижение уровня DA и HVA в мозгах интоксигированных животных. Наблюдалась зависимость полученных параметров от степени ишемии центральной нервной системы.

PIŚMIENNICTWO

1. Andén N. E., Stock G.: Inhibitory effect of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-aminobutyric acid on the dopamine cells in the substantia nigra. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1973, 279, 89–92.
2. Baxter C. F.: Methods for measurement of gamma-aminobutyric acid- α -oxoglutaric acid transaminase (GABA-T). W: *Methods of neurochemistry*. Red. R. Fried, 1972, 3, IV, 45–53.
3. Bugera T., Śmiałek M.: Zmiany patomorfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym szczura w następstwie zatrucia octanem kobaltowym i niedokrwienia mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1976, 24, 209–220.
4. Bugera T., Kosicka B., Kittel M., Śmiałek M.: Synteza GABA w ośrodkowym układzie nerwowym szczura z zespołem piramidowym po ostrym zatruciu octanem kobaltowym skojarzonym z niedokrwieniem mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 59–70.
5. Bugera T., Kosicka B., Śmiałek M.: Wpływ ostrego zatrucia octanem kobaltowym na poziom dopaminy i stosunek stężeń DA/GABA w mózgowiu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1987b (złożona do druku).
6. Bugera-Piecuch T., Śmiałek M.: Ocena stanu gąbczastego w mózgu szczura po zatruciu octanem kobaltowym w warunkach niedokrwienia OUN. *Neuropat. Pol.*, 1987 (złożona do druku).
7. Farley I. J., Price K. S., Hornykiewicz O.: Dopamine in the limbic regions of the human brain: Normal and abnormal. *Adv. Biochem. Pharmacol.*, 1977, 16, 57–64.
8. Fowler L. J.: Analysis of the major amino acids of rat brain after *in vivo* inhibition of GABA transaminase by ethanolamine O-sulphate. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 437–440.

9. Hornykiewicz O., Lisch H. J., Springer A.: Homovanilic acid in different regions of the human brain: Attempt at localizing central dopamine fibers. *Brain Res.*, 1968, 11, 662–671.
10. Hornykiewicz O.: Dopamine in the basal ganglia: It's role and therapeutic implications including the clinical use of L-dopa. *Brit. Med. Bull.*, 1973, 29, 172–178.
11. Jellinger K., Riederer P., Kothbauer P.: Brain monoamines in human cerebral infarcts. A preliminary study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1978, 41, 173–176.
12. Kita H., Van der Kloot W.: Action of Co and Ni at the frog neuromuscular junction. *Nature, New Biology*, 1973, 245, 52–53.
13. Kogure K., Scheinberg P., Kishikava H., Busto H.: The role of monoamines and cyclic AMP in ischemic brain edema. W: *Dynamics of brain edema*. Red. H. M. Pappius, W. Feindell, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1976, 203–214.
14. Lavyne M., Moskowitz M. A., Larin F., Zervas N., Wurtman R. J.: Brain ³H-catecholamine metabolism in experimental cerebral ischemia. *Neurology*, 1975, 25, 483–485.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
16. Lust W. D., Mrsulja B. J., Passenneau J. V., Klatzo I.: Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of the cerebral cortex. *Brain Res.*, 1975, 98, 394–399.
17. McGeer P. L., McGeer E. G.: Enzymes associated with metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human controls and the patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 65–76.
18. McGeer P. L., McGeer E. G., Hattori F.: Dopamine – acetylcholine – GABA neuronal linkages in the extrapyramidal and limbic system. *Biochem. Pharmacol.* 1977, 16, 397–402.
19. Moskowitz M. A., Wurtman R. J.: Acute stroke and brain monoamines. W: *Cerebrovascular diseases*. Red. P. Scheinberg. Reven Press, New York, 1976, 153–166.
20. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 53–76.
21. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I.: Monoamines in cerebral ischemia in relation to brain edema. W: *Dynamics of brain edema*. Red. H. M. Pappius, W. Feindell. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1976, 187–192.
22. Nichols R. A., Nakajima Y.: Effects of manganese and cobalt on the inhibitory synapses of crustacean stretch receptor neuron. *Brain Res.*, 1975, 86, 493–498.
23. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDPG-glucose and glycogen- α -1,4 glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) and α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1.) activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)*. 1971, 19, 242–248.
24. Weakly J. M.: The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 234, 597–612.
25. Welch K. M. A., Chabi E., Buckingham J., Bergin B., Achar V. S., Meyer J. S.: Catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in ischemic brain. Influence of p-chlorophenyl-alanine. *Stroke*, 1976, 8, 341–346.
26. Welch K. M. A., Chabi E., Dodson R. F., Wang T. P. F., Nell J., Bergin B.: The role of biogenic amines in the progression of cerebral ischemia and edema. W: *Dynamics of brain edema*. Red. H. M. Pappius, W. Feindell. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1976, 193–202.
27. Wu J. Y.: Purification, characterization and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain. W: *GABA in nervous system function*. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower, Raven Press, New York, 1976, 7–55.

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

PAWEŁ P. LIBERSKI

THE OCCURRENCE OF CYTOPLASMIC LAMELLAR BODIES IN SCRAPIE INFECTED AND NORMAL HAMSTER BRAINS

Department of Neurology, School of Medicine, Łódź

Scrapie, a naturally occurring neurodegenerative disorder of sheep and goats (Dickinson 1976), is an animal model for the study of kuru (Gajdusek et al. 1966) and Creutzfeldt-Jakob disease (Gibbs et al. 1968) in man. Together with the Gerstmann-Straussler syndrome (Masters et al. 1981), transmissible mink encephalopathy (Marsh, Hanson 1979) and chronic wasting disease in captive mule deer and elk (Williams, Young 1980), they present subacute spongiform viral encephalopathies (Gajdusek 1977) or infectious degenerative encephalopathies (Fraser, McBride 1985).

Despite numerous attempts to characterize these diseases ultrastructurally (Lampert et al. 1969, 1971; Gibson, Liberski 1987; Liberski 1987a, b) a full understanding of their pathology, even at the terminal stage of disease, has not been achieved, primarily because of improper controls and incorrect interpretations. In 1970 Peat and Field reported "unusual barred structures" in kuru-affected brains. Identical structures were later found in both normal and scrapie-affected mice (Liberski, Gibson 1987 — unpublished observations). We now report the occurrence of cytoplasmic lamellar bodies (CLB)* in hamsters.

MATERIAL AND METHODS

Sixty 6-week-old golden hamsters were inoculated intracerebrally with the 263K strain of scrapie (kindly supplied by Dr Richard H. Kimberlin, AFRC and MRC, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh, UK). The inoculum consisted of a 10% clarified suspension of brains from scrapie-infected terminally ill animals. 0.05 ml of the supernatant was injected into the right hamster brain hemisphere under light ether anesthesia. Age-matched controls were injected with physiological saline. Animals were examined daily for unequivocal signs of scrapie (tremor and ataxia), which appeared between 57 and 83 days (mean, 75 days) following inoculation.

* Cytoplasmic lamellar bodies correspond to similar fine structural findings known as confronting cisternae not infrequently seen outside the CNS in neoplastic and virus-infected cells.

Terminally ill animals were anesthetized with chloral hydrate and perfused through the heart with 100 ml of 1.25% of glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in cacodylate buffer pH 7.2, followed by 50 ml 5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in the same buffer. The brains were then removed and rinsed overnight in the second fixative. One cubic mm samples of cerebral cortex, thalamus, the CA₁ region of hippocampus, brainstem and cerebellum were postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded ethanols and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and viewed using EM 109 Zeiss and JEM 100C Jeol transmission electron microscopes.

RESULTS

Cytoplasmic lamellar bodies (CLB) were found in the dendrites and somata of Purkinje cells (Fig. 1) and rarely in myelinated axons (Fig. 2) in the cerebella of both the scrapie-infected and normal hamsters in approximately the same

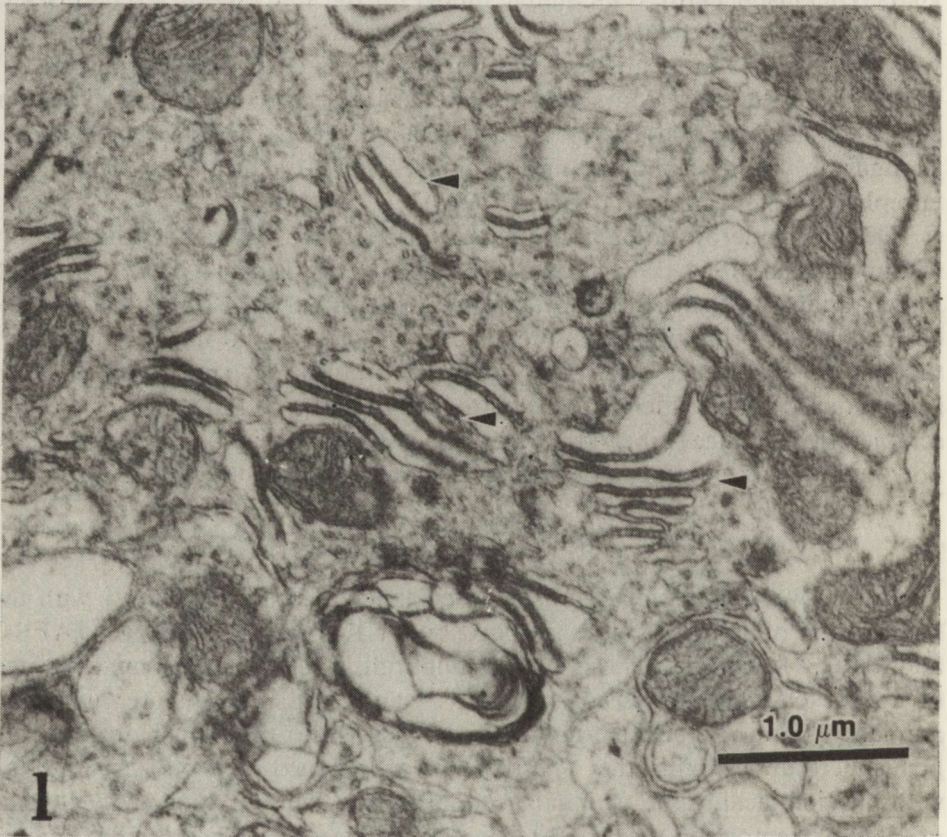


Fig. 1. Cytoplasmic lamellar bodies (arrowheads) in Purkinje cells. $\times 26\,000$

Ryc. 1. Cytoplazmatyczne ciała laminarne (strzałki) w komórkach Purkiniego. Pow. 26 000 \times



Fig. 2. Cytoplasmic lamellar bodies (arrowheads) in unidentified axon. $\times 15\,000$

Ryc. 2. Cytoplazmatyczne ciała laminarne (strzałki) w obrębie niezidentyfikowanego aksonu.
Pow. $15\,000\times$

number. The CLB were dispersed rather randomly in the cytoplasm of Purkinje cells and no particular localization of the CLB was found. However, the close apposition of the CLB to either Golgi apparatus or endoplasmic reticulum (Fig. 3) was frequently observed, but because an abundance of these structures was always seen, even this particular localization was interpreted as fortuitous.

Typically, the CLB were composed of stacks of electron-lucent cisterns separated by bands of higher electron density, several dense and light bars were observed in each CLB. The width of electron-dense bands was approximately 46 nm, while the electron-lucent cisterns varied in width from approximately 50 nm to three or four times that of dense bands.

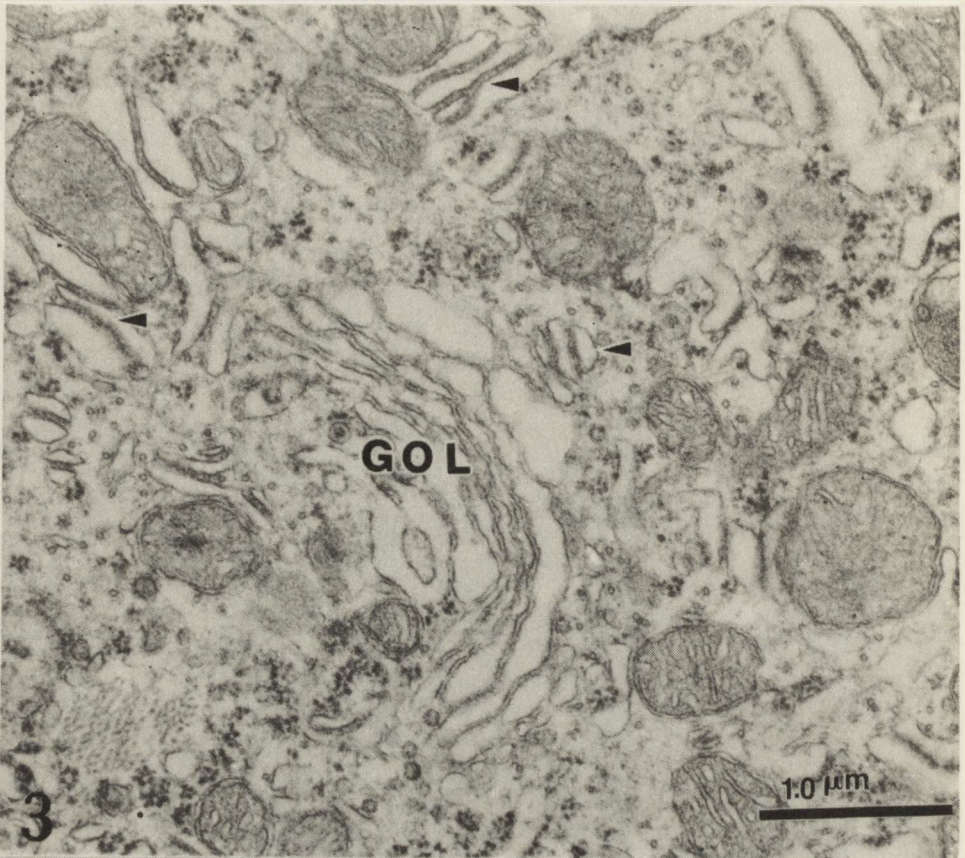


Fig. 3. Cytoplasmic lamellar bodies (arrowheads) in the cytoplasm of Purkinje cells. Note the close apposition of these structures to mitochondria and Golgi apparatus (GOL). $\times 26\,000$

Ryc. 3. Cytoplazmatyczne ciała laminarne (strzałki) w cytoplazmie komórek Purkiniego. Zwraca uwagę bliskie sąsiedztwo ciał laminarnych oraz mitochondriów i aparatu Golgiego (GOL).
Pow. $26\,000\times$

DISCUSSION

Peat and Field (1970) found CLB in the cerebellum of humans and chimpanzees with kuru and even suggested that CLB represents sites of kuru virus replication. Their electron micrographs are almost indistinguishable from those reported here, except for the smaller size of the CLB in kuru-affected brains (34 nm for dense bars and 30 nm for electron-lucent cisterns).

It seems however, and this study strongly supports such conclusion, that the CLB are structures of no connection with any subacute spongiform viral encephalopathies, as they have been observed in several models of murine and hamster scrapie (Liberski, Gibson 1987 — unpublished data) but also in control animals.

In fact the CLB were also observed in different species and in several normal and pathological conditions. They were seen in Purkinje cells of normal rats (Herndon 1964), in striatal neurons of rats treated with sodium oxide (Anzil et al. 1971), in caudate and substantia nigra neurons of normal rats and cats (LeBeux 1972), in Purkinje cells of dogs with rabies (Cameron, Couroy 1974), in Purkinje cells of humans with granule cell-type cerebellar degeneration (Hirano et al. 1973), olivopontocerebellar degeneration (Landis et al. 1974), and Menkes kinky hair disease (Hirano et al. 1977). They have also been observed in cerebella of brindled mice (Yamano et al. 1985) and in hyperstriatum accessorium neurons of domestic fowl (Spoerri, Glees 1978). Moreover, they have been noted during systemic studies of Purkinje cells and other neurons in cattle, goat, sheep, dog, cat, rabbit, rat and mouse, as well as in rat pituitaries and MtW15 pituitary neoplasms (Bestetti, Rossi 1980). Thus, it seems evident that CLB are normal constituents of Purkinje cells and sometimes other neurons.

The origin of CLB is uncertain (Hirano 1985). Rough endoplasmic reticulum is a subcellular component from which the CLB might have originated. However, the comparable electron densities of both mitochondria and the CLB (LeBeux 1972; Liberski, Gibson 1987 – unpublished data) suggest that the CLB may originate from these subcellular organelles. Additional work is needed to elucidate the origin of the CLB, as well as their functional, if any, significance.

ACKNOWLEDGEMENTS: I am grateful to the Polish Academy of Sciences for financial support (grant 771–VI), to Dr Richard Yanagihara, National Institutes of Health, Bethesda, USA, for helpful criticism and to Mrs. Leokadia Romanska for preparing electron microscopic sections.

WYSTĘPOWANIE CYTOPLAZMATYCZNYCH CIAŁ LAMINARNYCH W MÓZGACH CHOMIKÓW NORMALNYCH I CHOMIKÓW ZAKAŻONYCH SCRAPIE

Streszczenie

Wykazano obecność „cytoplazmatycznych ciał laminarnych” w komórkach Purkinjego zarówno u chomików zakażonych scrapie, jak i kontrolnych. Cytoplazmatyczne ciała laminarne są to organelle subkomórkowe utworzone z cystern przedzielonych elektronogęstymi pasmami. Ich obecność zarówno w warunkach patologicznych (scrapie), jak i kontrolnych świadczy, iż są one normalnymi składnikami komórek Purkinjego.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ЛЯМЕЛЯРНЫЕ ТЕЛА В МОЗГАХ НОРМАЛЬНЫХ ХОМЯКОВ И ХОМЯКОВ ЗАРАЖЕННЫХ SCRAPIE

Резюме

У хомяков зараженных scrapie а также у нормальных обнаружены в клетках Purkinje цитоплазматические лямелярные тела. Они являются субклеточными органеллами образованными цистернами, разделенными электронно-густыми полосами. Их присутствие как в паталогические (scrapie), так в нормальных условиях, свидетельствует о том, что они являются нормальным элементом клеток Purkinje.

REFERENCES

1. Anzil A. P., Blinzinger K., Matushima A.: Dark cisternal fields: specialized formation of the endoplasmic reticulum in striatal neurons of rat. *Z. Zellforsch.*, 1971, 113, 553–557.
2. Bestetti G., Rossi G. L.: The occurrence of cytoplasmic lamellar bodies in normal and pathological conditions. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1980, 49, 75–78.
3. Cameron A. M., Conroy J. D.: Rabies-like neuronal inclusions associated with a neoplastic reticulosis in a dog. *Vet. Pathol.*, 1974, 11, 29–37.
4. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus diseases in animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin. North-Holland Comp., Amsterdam-Oxford, 1976, pp. 209–241.
5. Fraser H., McBride P. A.: Parallels and contrasts between scrapie and dementia of the Alzheimer type: strategies and problems for experiments involving the life span studies. In: *Senile dementia of Alzheimer type*. Eds. J. Traber, W. H. Gispen. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1985, pp. 250–268.
6. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943–960.
7. Gajdusek D. C., Gibbs C. J. Jr., Asher D. M.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, 209, 794–796.
8. Gibson P. H., Liberski P. P.: An electron and light microscopic study of the numbers of dystrophic neurites and vacuoles in the hippocampus of mice infected intracerebrally with scrapie. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1987, 73, 379–382.
9. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science*, 1968, 161, 388–389.
10. Herndon R. M.: Lamellar bodies, an unusual arrangement of the granular endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, 1964, 20, 338–342.
11. Hirano A.: Neurons, astrocytes and ependyma. In: *Textbook of neuropathology*. Eds. R. L. Davies, D. M. Roberts. Williams and Wilkins, Baltimore-London-Sydney, 1985, pp. 1–91.
12. Hirano A., Dembitzer H. M., Ghatak N. R., Fan K. -J., Zimmerman H. M.: On the relationship between human and experimental granule cell type degeneration. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1973, 32, 493–502.
13. Hirano A., Llena J. F., Ghatak N. R.: Fine structure of the cerebellar cortex in Menkes kinky-hair disease. *Arch. Neurol.*, 1977, 52–56.
14. Lampert P. W., Earle K. M., Gibbs C. J. Jr., Gajdusek D. C.: Experimental kuru encephalopathy in chimpanzees and Spider monkeys. *Electron microscopic studies. J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1969, 28, 353–370.
15. Lampert P. W., Gajdusek D. C., Gibbs C. J. Jr.: Experimental spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease) in chimpanzees. *Electron microscopic studies. J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1971, 30, 20–32.
16. Landis D. M. D., Rosenberg R. N., Landis S. C., Schut L., Nyhan W. L.: Olivopontocerebellar degeneration. Clinical and ultrastructural abnormalities. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 295–307.
17. LeBeux Y.: Subsurface cisterns and lamellar bodies: particular forms of endoplasmic reticulum in the neurons. *Z. Zellforsch.*, 1972, 133, 327–352.
18. Liberski P. P.: Astrocytic reaction in experimental scrapie in hamsters. *J. comp. Pathol.*, 1987a, 97, 73–78.
19. Liberski P. P.: Electron microscopic observation on dystrophic neurites in hamster brain infected with the 263K strain of scrapie. *J. comp. Pathol.*, 1987b, 97, 35–39.
20. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system, Vol. 1*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Academic Press, New York, 1979, pp. 451–461.
21. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from Gerstmann-Straussler syndrome. *Brain*, 1981, 104, 559–588.

22. Peat A., Field E. J.: An unusual structure in kuru brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1970, 15, 288–292.
23. Spoerri P. E., Glees P.: Annulate lamellae, lamellar bodies and subsurface cisterns in neurons of the avian hyperstriatum accessorium. *Cell Tissue Res.*, 1978, 193, 423–432.
24. Williams H. M., Young S.: Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildlife Dis.*, 1980, 16, 89–98.
25. Yamano T., Paldino A., Suzuki K.: Ultrastructural and morphometric studies of Purkinje cells of brindled mouse after administration of cupric chloride. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1985, 44, 97–107.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 22 Kopcińskiego Str., 90-153 Łódź, Poland

EWA MATYJA, KRYSZYNA RENKAWEK

AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS) IN A PATIENT WITH DOMINATING DEMENTIA

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

Classical amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by selective degeneration and loss of the spinal or bulbar lower and cortical upper motor neurons (Boundelle 1975; Tandan, Bradley 1985). The occasional involvement of other neuronal systems suggests the existence of a multi-system neuronal degenerative disorders.

Loss of memory and intellectual disturbances have been rarely observed in ALS patients. Moreover, it seems that cases of ALS combined with dementia and parkinsonism documented in an isolated population of the Western Pacific (Kurland, Brody 1975; Shiraki, Yase 1975; Chen 1984, Tan et al. 1984) represented not simply ALS but more complicated degenerative process (Hudson 1981). Recently ALS in patients with presenile dementia in Japan was regarded as a new clinical-pathological entity (Mitsuyama 1984). Other cases of dementia occurring in association with motor neuron disease have also been diagnosed as a variant of classical ALS, Alzheimer's and Pick's disease or as a form of Creutzfeldt-Jakob disease (Myrianthopoulos, Smith 1962; Salazar et al. 1983).

This clinical-neuropathological report presents a patient who suffered from severe dementia before clinical manifestation of classical motor neuron disease. Neuropathological examination revealed both typical motor neuron damage and vascular wall changes together with vasogenic focal tissue destruction. The causative relationship between these factors which could be responsible for clinical ALS manifestation and dementia is discussed in reference to the neuropathological findings.

CASE REPORT

A 59-year-old female gradually developed loss of memory, difficulty of concentration and cognition function. A few months later she was significantly deteriorated. She was unable to perform her usual occupations. Advanced

disturbances in writing and speaking appeared. After one year she was completely unable to communicate with the family except affirmative or negative signs. At the same time she suffered from difficulty of swallowing and her speech became dysarthric. In this state the patient was admitted to the neurological ward.

Neurological examination revealed symptoms of pseudobulbar palsy. There were no other neurological abnormalities. Muscles strength and reflexes of all extremities were normal. Routine laboratory tests and cerebrospinal fluid examination disclosed no changes. Computerized tomography of the brain revealed moderate cerebral atrophy, mostly in the frontal regions, without enlargement of the ventricular system. The patient was clinically diagnosed as pseudobulbar palsy and cerebral atrophy.

In the next month progressive worsening of speech and imperfect use of the upper extremities developed. Muscle strength was greatly diminished in the arms and in a less extent in the legs. The patient was readmitted to the hospital because of rapid exacerbation of neurological disorders and deterioration of the physical state. On admission the neurological examination revealed anarthria and dysphagia. The tongue was markedly atrophied with numerous fasciculations and its movement was limited. Palatal and pharyngeal reflexes were absent. There was generalized weakness and wasting of the muscles both in the upper and lower extremities. Slight fasciculation was seen in the muscles of arms and shoulders. Muscle reflexes were hyperactive with bilateral clonus. There were no Babinski signs. Tremor was not observed. The condition of the patient progressed to complete deterioration and emaciation and she died two years after the onset of the mental symptoms. Clinically she was diagnosed as dementia in a patient with motor neuron disease (ALS). General autopsy disclosed no changes except acute bronchopneumonia and severe muscle atrophy.

Neuropathological findings

Macroscopical examination: The brain fixed in formalin weighed 1200 g. Gross examination showed diffuse cerebral atrophy, most intensive in the frontal and temporal lobes. The vessels at the base revealed slight arteriosclerotic changes. Coronal sections through the brain showed fresh foci of necrosis in the frontal, parietal, and temporal lobes and basal ganglia of the right hemisphere. Coronal sections of the spinal cord demonstrated some shrinkage and discoloration of the lateral column at the cervical and lumbar levels. **Microscopical examination:** Microscopical examination revealed widespread degeneration and loss of motor neurons in the spinal cord, brainstem and cerebral cortex.

Most severe changes were found in the anterior horns of the spinal cord especially in the cervical and lumbar segments. In some areas only few neurons remained (Fig. 1). Most of these cells exhibited degenerative changes. The neurons were frequently pycnotic or ballooned with a small amount of Nissl substance displaced peripherally (Fig. 2). Some cells showed intracytoplasmic

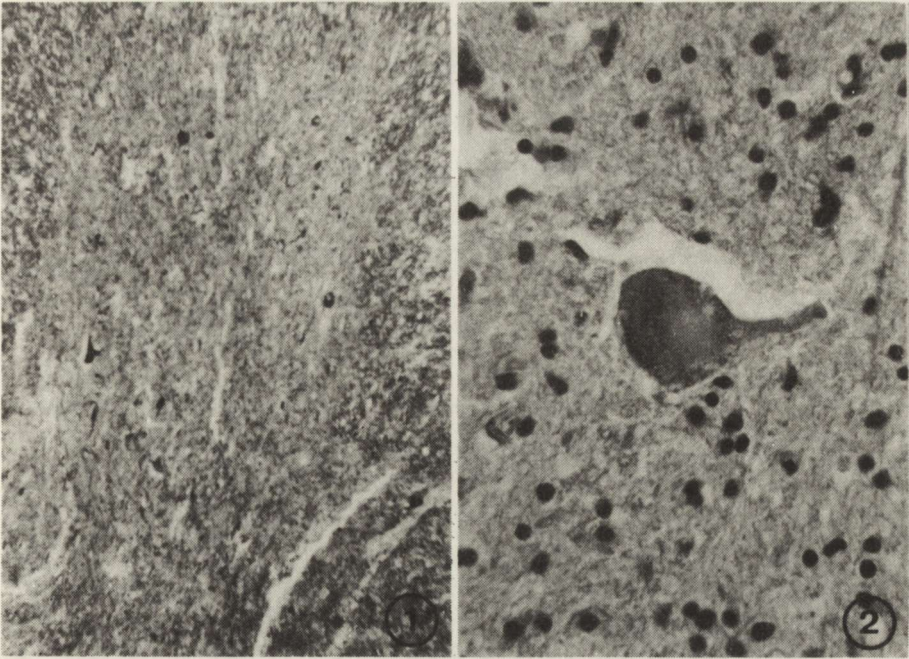


Fig. 1. Severe loss of motor neurons in the anterior horn of cervical segment of the spinal cord.
H-E. $\times 60$

Ryc. 1. Znaczne ubytki neuronów ruchowych w rogu przednim rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym. H-E. Pow. $60\times$

Fig. 2. Degenerated motor nerve cell of the anterior horn with ballon-like and vacuolized cytoplasm. H-E. $\times 400$

Ryc. 2. Zwyródniała komórka nerwowa ruchowa rogu przedniego z balonowato rozdętą i zwakuolizowaną cytoplazmą. H-E. Pow. $400\times$

lipofuscin accumulation of they were dark-stained and shrunken (Fig. 3). A mild astroglial reaction accompanied neuronal damage. At all levels of the spinal cord intensive changes of the vascular wall were seen. Small and large arteries exhibited thickening of the vessel wall. The vessels were surrounded by enlarged perivascular space. Occasionally minute foci of tissue necrosis were present (Fig. 4). In the lateral column of the spinal cord there was marked demyelination of the corticospinal tracts (Fig. 5). At the cervical level a slight reduction in number of myelinated fibers was also observed in the anterior column.

In the medulla there was marked reduction in number of the neurons of the hypoglossal nuclei and mild degeneration of olives. Most of the remaining neurons exhibited lipid degeneration or displacement of Nissl substance. Slightly affected neurons were observed in the facial, trigeminal and ambiguous nuclei.

In the midbrain degeneration of the corticospinal tract was present. The vessels of the brainstem were not noticeably changed.

In the brain large foci of fresh tissue necrosis in the white matter and

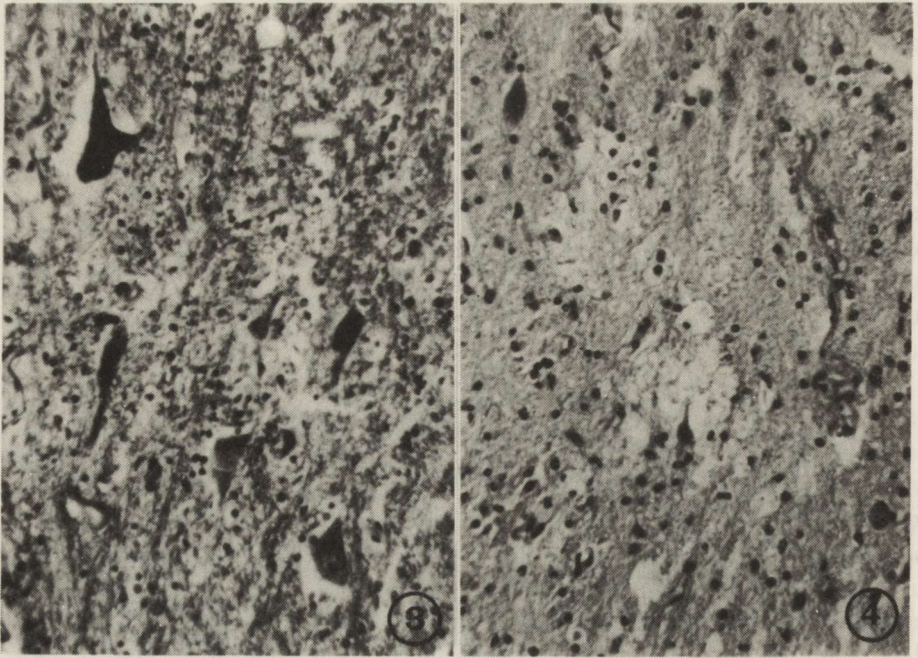


Fig. 3. Dark-stained, shrunken neurons at the cervical level. Klüver-Barrera. $\times 200$
Ryc. 3. Ciemne, obkurczone neurony na poziomie rdzenia szyjnego. Klüver-Barrera. Pow. $200 \times$

Fig. 4. Minute foci of tissue necrosis in the spinal cord. H-E. $\times 200$
Ryc. 4. Drobne ogniska martwicy w rdzeniu kręgowym. H-E. Pow. $200 \times$

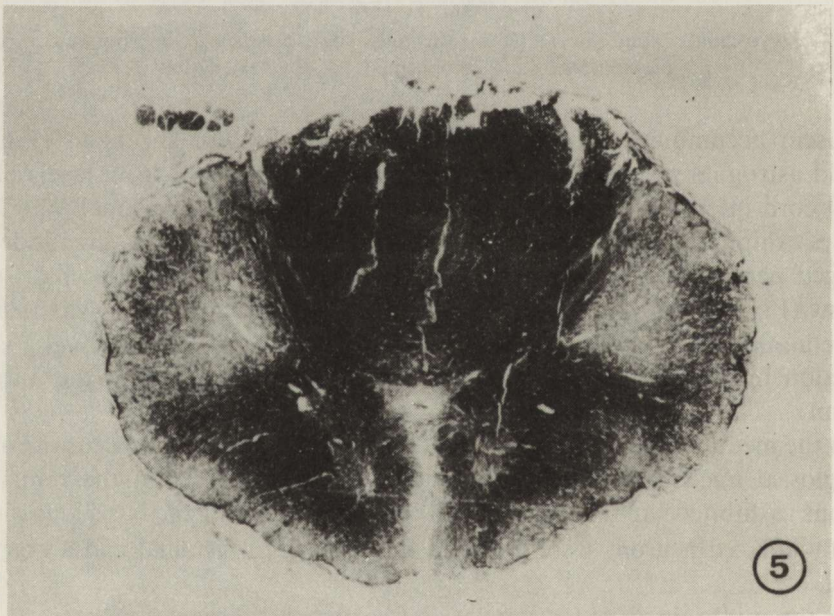


Fig. 5. Demyelination of the lateral columns. Klüver-Barrera. $\times 10$
Ryc. 5. Demielinizacja rdzenia kręgowego. Klüver-Barrera. Pow. $10 \times$

adjoining cerebral cortex of the frontal, parietal, temporal lobe of the right hemisphere and the right basal ganglia were found. The necrotic tissue was filled with numerous macrophages and small vessels surrounded by some lymphocytes and glial cells. At the periphery of malacia a marked astroglial reaction was visible. In all other regions of the cerebral cortex there were widespread loss of neurons and advanced ischemic and sclerotic changes. There was great loss of Betz cells and large pyramidal neurons in deep layers of the motor cortex. Severe cell depletion was also observed in the 2nd and 3rd layer of the frontal and temporal cortex. Numerous neurons were dark-stained and some of them exhibited ghost cells (Fig. 6). Astrogliosis in the subcortical

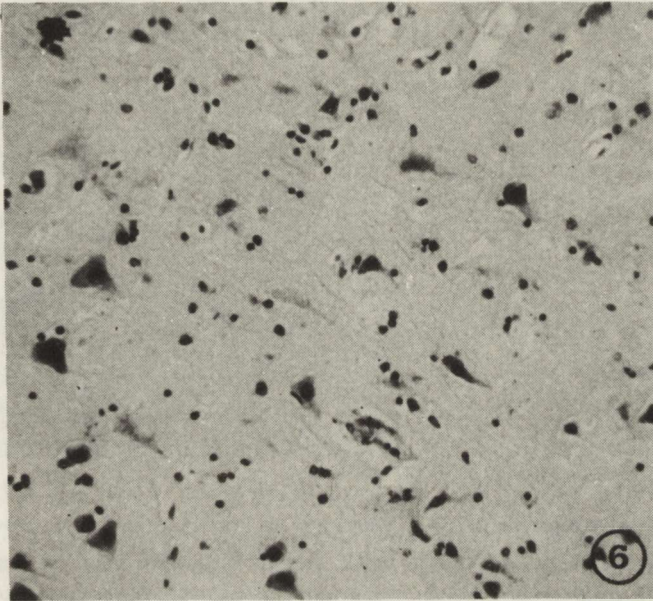


Fig. 6. Dark-stained neurons and ghost-like cells in the third layer of the frontal cortex. H—E. $\times 200$
Ryc. 6. Ciemne neurony oraz cienie komórkowe w trzeciej warstwie kory czołowej. H—E. Pow. $200\times$

white substance of the cortex was frequently observed. Occasionally a mild spongy appearance of the cortex could be noted. There were no arteriosclerotic changes of the vessels even in the vicinity of the malacia. A slight thickening of the vascular wall and enlargement of the perivascular spaces were seen only sporadically, and in some places perivascular rarefaction of the tissue appeared (Fig. 7). Moreover, minute foci of fresh necrosis were detectable in the cerebral cortex. There was no evidence of degeneration of the corticospinal tract.

The cerebellum was less affected. The number of Purkinje cells was diminished in number and proliferation of Bergmann glial cells was seen. A small focus of fresh necrosis was found in one folium.

When using the Bielschowsky silver impregnation method, no neurons with Alzheimer's neurofibrillary tangles, or granulovacuolar degeneration were identified in any regions examined, but a few senile plaques were present in the hippocampus and temporal lobes (Fig. 8). No ballooned cells and Pick's argentophylic inclusions were found. The Congo red staining for amyloid did not revealed amyloid deposits in the walls of blood vessels.

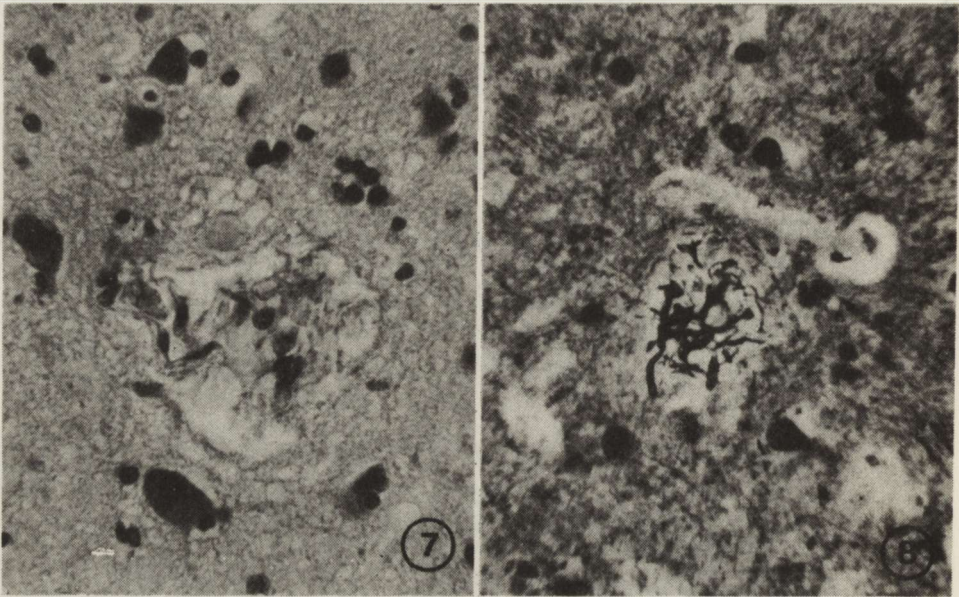


Fig. 7. Perivascular tissue rarefaction in the cerebral cortex. H-E. $\times 400$

Ryc. 7. Rozrzedzenie tkanki wokół naczynia w korze mózgu. H-E. Pow. $400\times$

Fig. 8. Senile plaque in the temporal cortex. Bielschowsky impregnation. $\times 500$

Ryc. 8. Płytką starcza w korze skroniowej. Impregnacja met. Bielschowskiego. Pow. $500\times$

DISCUSSION

The present case exhibited clinically severe mental deterioration occurring as the first symptom of the disease in presenile age, followed by upper and lower motor neuron damage. Both the clinical picture and neuropathological changes resemble the cases of presenile dementia with motor neuron disease previously described in Japan (Mitsuyama, Takamiya 1979; Mitsuyama 1984). Only a few cases of ALS associated with mental symptoms have been documented in other countries, but they disclosed exclusively a bulbar form of classical ALS and, moreover, the onset of dementia appeared in senile age, sometimes already during the course of the ALS syndrome (Wikström et al. 1982).

The factor(s) which could induce dementia in a patient exhibiting ALS remains unknown. In most cases of the endemic ALS-Parkinson-Dementia

complex from the Mariana Islands of the Western Pacific and from the Kii Peninsula of Japan, the mental symptoms may have developed as the result of intensive presenile and senile neuropathological changes such as Alzheimer's neurofibrillary tangles or senile plaques (Malamud et al. 1961; Hirano, Zimmerman 1962; Hirano et al. 1966).

In the present case, similarly as in the Japanese cases of presenile dementia with motor neuron disease, neurofibrillary changes were absent. In our case and the above mentioned cases the striking feature of the neuropathological picture consisted of diffuse widespread cerebral atrophy, markedly in the frontal and temporal lobes. Moreover, in the present case additional vasogenic changes with foci of tissue necrosis accompanied the neuronal loss and damage. The vascular abnormalities do not belong to the characteristic picture of the classical ALS, neither have they been described in the Japanese cases of dementia with motor neuron disease. The cerebrovascular changes may have an important role in the pathology of dementia and aging of the brain (Ferst, Cervos-Navarro 1983). However, progressive dementia appearing together with vascular disease is not connected exclusively with gradual narrowing of the cerebral arteries and reduction in cerebral blood flow due to arteriosclerotic changes (Tomlinson et al. 1977; Worm-Petersen; Pakkenberg 1968). It would seem that dementia is related with multiple small or large cerebral infarcts secondary to extracerebral vascular or cardiac disorders (Haschinski et al. 1975; Sourander, Walinder 1977). In the present case the arteriosclerotic changes of the vessels in the brain tissue were not pronounced and both the large foci of malacia in the right hemisphere and minute foci of necrosis in the cerebral cortex were very fresh so they could not have been responsible for the mental symptoms occurring at the onset of the disease. As has been mentioned, the most striking neuropathological feature consisted in diffuse loss and degeneration of neurons in all areas of the cerebral cortex. This severe neuronal loss seems to correspond to the symptoms of progressive dementia.

As far in the brain tissue slight arteriosclerotic changes did not reflect degeneration of neurons and clinical symptoms of dementia, the pronounced thickening of the vessel walls together with minute foci of necrosis in the spinal cord could be responsible, at least in some extent, for neuronal damage. The vascular factor could exacerbate the ALS syndrome and the chronic ischemia in the spinal cord may give rise to a syndrome closely resembling upper and lower motor neuron disease (Jellinger, Neumayer 1962; Jellinger 1967; Hughes, Brownell 1966). In the present case, apart from the role of pathological vascular changes in the spinal cord, it can be supposed that other factor(s) inducing generalized degenerative changes throughout the CNS also take place. The absence of presenile changes in the brain may indicate that both ALS and severe dementia resulted from advanced neuronal depletion and damage. Because of the similarity of neuropathological picture of the present case to the Japanese cases of motor neuron disease with presenile dementia, this case may be also considered as a separate clinicopathological entity.

PRZYPADK Z STWARDNIENIA ZANIKOWEGO BOCZNEGO (SLA)
U PACJENTA Z OBJAWAMI OTEPIENIA

Streszczenie

Zespół psychoorganiczny prowadzący do otępienia wystąpił jako pierwszy objaw kliniczny u pacjenta z narastającym uszkodzeniem neuronu ruchowego. W obrazie klinicznym występowały objawy typowe dla SLA takie jak objawy piramidowe, opuszkowe, rzekomoopuszkowe oraz objawy uszkodzenia obwodowego neuronu ruchowego. W obrazie neuropatologicznym obserwowano charakterystyczne dla SLA wybitne opustoszenia komórkowe oraz zwyrodnienie neuronów rogów przednich rdzenia kręgowego. Poza rdzeniem rozlane opustoszenia i zwyrodnienia komórkowe występowały w korze mózgu oraz w opuszce. Obok zmian typowych dla SLA stwierdzono mniej lub bardziej rozległe ogniska świeżej martwicy w korze mózgu i w zwojach podstawy. Występowanie objawów otępienia przedstarczego wraz z szybko postępującym zespołem uszkodzenia neuronu ruchowego stanowi rzadkość kazuistyczną.

БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ (БАС) У БОЛЬНОГО
С ДЕМЕНЦИЕЙ

Резюме

Психоорганический синдром ведущий к деменции был первым клиническим симптомокомплексом у больного с прогрессирующим поражением двигательного нейрона. В клинической картине появились тупические для БАС симптомы повреждения пирамидного и периферического двигательного нейрона с бульбарными и псевдобульбарными нарушениями. В невропатологическом исследовании наблюдались характерные для БАС клеточные убытки и дегенерация двигательных клеток переднего рога на всех взятых уровнях спинного мозга и демиелинизация боковых пирамидных путей. Кроме того диффузная атрофия и дегенерация клеток была обнаружена в коре головного мозга и в продолговатом мозгу. Наряду с этими изменениями наблюдались более или менее обширные очаги свежего некроза в мозговой коре и подкорковых ганглиях. Пресенильная деменция и быстро прогрессирующий синдром повреждения двигательного нейрона является редким казуистическим симптомокомплексом.

REFERENCES

1. Bonduelle M.: Amyotrophic lateral sclerosis. In: Handbook of clinical neurology. Part II. Eds. P. J. Vinken, C. W. Bruyn. Elsevier Publ. Co, New York, 1975, 22, 281–339.
2. Chen K. M.: Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam: an update. In: Amyotrophic lateral sclerosis in Asia and Oceania. Eds. K. M. Chen, Y. Yase, National Taiwan University, 1984, 199–240.
3. Ferst R., Cervos-Navarro J.: Cerebrovascular pathology — aging and brain failure. In: Brain aging: Neuropathology and neuropharmacology. Eds: J. Cervos-Navarro, H. J., Sarkander, Raven Press, New York, 1983, 133–152.
4. Haschinski V. C., Lassen N. A., Marshall J.: Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. Lancet, 1974, 27, 207–210.
5. Haschinski V. C., Jliff L. D., Zhilka E.: Multi-infarct dementia. Arch. Neurol., 1975, 32, 632–637.
6. Hirano A., Zimmerman H. M.: Alzheimer's neurofibrillary changes. A topographic study. Arch. Neurol., 1962, 7, 227–242.
7. Hirano A., Malamud E., Elizan T. S., Kurland L. T.: Amyotrophic lateral sclerosis and

- parkinsonism-dementia complex on Guam. Further pathologic studies. *Arch. Neurol.*, 1966, 15, 35–51.
8. Hudson A. J.: Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, Parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain*, 1981, 104, 217–247.
 9. Hughes J. T., Brownell B.: Spinal cord ischemia due to atherosclerosis. *Arch. Neurol.*, 1966, 15, 189–202.
 10. Jellinger K., Neumayer E.: Myelopathic progressive d'origine vasculaire. Contribution anatomoclinique aux syndrome d'une hypovascularisatic chronique de la moelle. *Acta Neurol. Belg.*, 1962, 62, 944–956.
 11. Jellinger K.: Spinal cord atherosclerosis and progressive vascular myelopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1967, 30, 195–205.
 12. Kurland L. T., Brody J. A.: Amyotrophic lateral sclerosis Guam type. In: *Handbook of clinical neurology. Part II. System disorders and atrophies.* Eds. P. J. Vinken, C. W. Bruyn. Elsevier Publ. Co, New York, 1975, 22, 339–342.
 13. Malamud N., Hirano A., Kurland L. T.: Pathoanatomic changes in amyotrophic lateral sclerosis on Guam: special reference to the occurrence of neurofibrillary changes. *Arch. Neurol.*, 1961, 5, 401–415.
 14. Mitsuyama Y., Takamiya S.: Presenile dementia with motor neuron disease in Japan. *Arch. Neurol.*, 1979, 36, 592–593.
 15. Mitsuyama Y.: Presenile dementia with motor neuron disease in Japan: clinico-pathological review of 26 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1984, 47, 953–959.
 16. Myrianthopoulos N. C., Smith J. K.: Amyotrophic lateral sclerosis with progressive dementia. Pathologic findings of the Creutzfeldt-Jakob syndrom. *Neurology (Minneap.)*, 1962, 12, 603–610.
 17. Salazar A. M., Master C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Syndromes of amyotrophic lateral sclerosis and dementia. Relation to transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, 1983, 14, 17–26.
 18. Shiraki H., Yase Y.: Amyotrophic lateral sclerosis in Japan. In: *Handbook of clinical neurology. Part II. System disorders and atrophies.* Eds. P. J. Vinken, C. W. Bruyn. Elsevier Publ. Co, New York, 1975, 22, 353–419.
 19. Sourander P., Walinder J.: Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1977, 39, 247–254.
 20. Tan N., Kakulas B. A., Masters C. L., Gajdusek D. C., Garruto R. M., Chen K. M., Gibbs C. J.: Observation on the clinical presentation and neuropathological findings of ALS in Australia and Guam. In: *Amyotrophic lateral sclerosis in Asia and Oceania.* Eds. K. M. Chen, Y. Yase. National University Taivan, 1984, 199–240.
 21. Tandan R., Bradley W. G.: Amyotrophic lateral sclerosis. Part 1. Clinical features, pathology and ethical issues in management. *Ann. Neurol.*, 1985, 18, 271–280.
 22. Tomlinson B. E., Blessed G., Roth M.: Observations on the brains of demented old peoples. *J. Neurol. Sci.*, 1977, 11, 205–242.
 23. Wikström J., Pateau A., Palo J., Sulkava R., Haltia M.: Classic amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Arch. Neurol.* 1962, 39, 681–683.
 24. Worm-Petersen J., Pekkenberg H.: Atherosclerosis of cerebral arteries; pathological and clinical correlations. *J. Gerontol.*, 1968, 23, 445–449.

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

PAWEŁ P. LIBERSKI, WIELISŁAW PAPIERZ, JANUSZ ALWASIAK,
JANINA SZULC-KUBERSKA, JACEK RÓŹNIECKI

DIAGNOSTIC DIFFICULTIES IN A CASE OF SUBACUTE SCLEROSING ENCEPHALITIS. LIGHT AND ELECTRON-MICROSCOPIC STUDIES*

Departments of Neurology, Pathology and Oncology, School of Medicine, Łódź

Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a slow „conventional” viral disorder associated with infection with defective measles virus (Choppin 1981; Wender 1981; Brownell, Tomlinson 1984). The typical clinical manifestation coupled with increased anti-measles antibodies in CSF, typical EEG picture, and characteristic both neuropathological and electron-microscopic pattern of lesions enable certain diagnosis in the vast majority of cases. However, there are cases in which the clinical and pathological pictures are atypical or incomplete and the diagnosis is uncertain. The case presented here is a good sample of the above mentioned difficulties.

CASE REPORT

The 19-year-old man was admitted to the Department of Neurology, School of Medicine, Łódź (head: prof. A. Prusiński) with a one-year history of behavioral abnormalities, apathy and learning difficulties. The disease started as vision disturbances associated with retina degeneration.

The neurological examination performed on the day of admission revealed left spastic hemiparesis and senso-motor ataxia. Extrapyramidal signs in the form of the paucity of facial movements and hypokinesia were evident. Ophthalmologic examination revealed optic disc atrophy and areas of retinopathy.

* This paper was presented at the meeting “Biochemical, immunological and clinical aspects of multiple sclerosis, SSPE and demyelinating processes” held in Poznań, June 24th-27th, 1986. Dr P. P. Liberski is the recipient of a AGVA-GAEVERT gift, what is kindly acknowledged here. Dr Z. Rucińska’s contribution in calling our attention to this interesting case is gratefully acknowledged.

The EEG examination showed low-voltage background activity with superimposed bursts of slow waves (1–2 Hz, 400 μ V) accompanied by sharp waves, highly reminiscent of Radermecker's complexes. Laboratory analysis of lumbar CSF revealed increased total CSF protein content (72 mg/dl and 2 cells/cu mm). Electrophoresis of the proteins was uneventful. The search for anti-measles antibodies was negative; both in the CSF and in the blood. No antibodies against HTLV-III were detected. An insignificant increase of antibodies against *toxoplasma gondi* was found. CT scan revealed a hypodense irregular area in the left temporal lobe. After enhancement the area of higher density appeared in the same region. Left carotid angiography showed a picture most consistent with tumor infiltrating the basal ganglia. The discrepancies between the clinical picture highly suggestive of SSPE and the radiological findings led to proposing brain biopsy performed with the conscious agreement of the patient's parents. Biopsy specimens $\pm 10 \times 5$ mm and aspiration fine needle biopsy material were obtained from the left temporal lobe of cerebral cortex at the same time.

The clinical course of the patient deteriorated slowly with appearance of seizures and myoclonic jerks, firstly restricted to the facial musculature, than generalized. The patient was still alive at the time of preparation of this paper in a clinical status most consistent with the III grade SSPE stage.

MATERIAL AND METHODS

The biopsy specimen was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin, PTAH and Masson's trichrome method. The material for electron microscopy was fixed in cacodylate buffered 4% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. The semithin sections were stained with methyl blue and ultrathin sections were double-stained with lead citrate and uranyl acetate. The grids were observed and photographed in a EM 199 Zeiss transmission electron microscope.

RESULTS

Light microscopic studies

The fine-needle biopsy specimen (Fig. 1) consisted of a cluster of lymphocytes, rod-like microglial and astrocytic cells incidentally containing Cowdry type A inclusion bodies, with admixture of numerous red cells.

Examination of the gross biopsy specimen revealed perivascular cuffs, composed of lymphocytes and plasma cells (Fig. 2). Sometimes the lumen of the blood vessels was obliterated. Rarefaction of the brain tissue was noticeable with formation of perivascular "lakes" characteristic of brain edema. Proliferation of glial cells was abundant. The astrocytic cells were of gemistocytic type, with eosinophilic cytoplasm and pale nucleus. Some cells had numerous nuclei. "Naked" nuclei of Alzheimer type II were also observed.

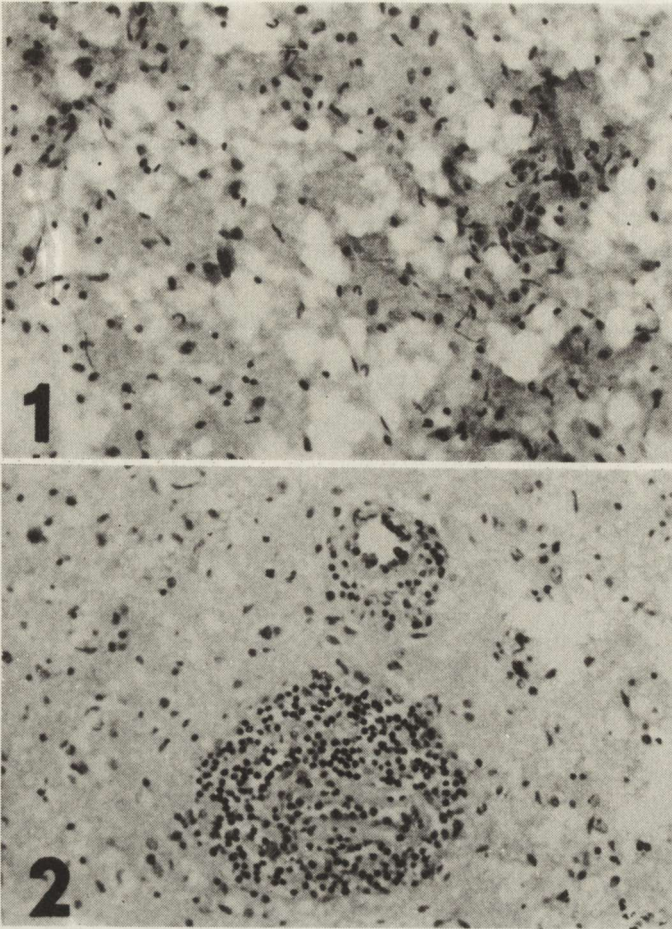


Fig. 1. Fine needle biopsy specimen. Note disperse lymphocytes and rod-like microglial cells. H—E. $\times 125$

Ryc. 1. Preparat z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Rozproszone limfocyty i komórki mikrogleju pałczkowatego. H—E. Pow. $125\times$

Fig. 2. Temporal brain cortex. Perivascular inflammatory infiltrates, rod-like microglial cells and hypertrophic astrocytes within nervous parenchyma. H—E. $\times 125$

Ryc. 2. Kora skroniowa. Okołonaczyniowy naciek zapalny. W tkance rozproszone komórki mikrogleju pałczkowatego oraz pobudzone astrocyty. H—E. Pow. $125\times$

The proliferation of microglial cells with formation of rod-like forms were visible. Cowdry type A inclusions were not observed in the available material.

White matter was not available for examination so any conclusions concerning the presence of demyelination are completely lacking.

Electron-microscopic studies

The electron-microscopic findings consisted of several elements which will be discussed as follows.

1. Abundant infiltration consisting of lymphocytes and plasma cells are

observed. Lymphocytes and plasma cells were observed either in close vicinity of blood vessels, or seen among the elements of neural parenchyma. Infiltrates in close apposition to neuronal and astrocytic processes, or perikarya were also found. Numerous macrophages were seen. The cytoplasm of these cells contained numerous granules of different electron-densities. Some of them were membrane-bound electron-dense, and amorphous in appearance, but some consisted of a narrow ring of moderate density and an electron-lucent vacuole in the center (Fig. 3). The last mentioned inclusions seemed to be lysosomes.

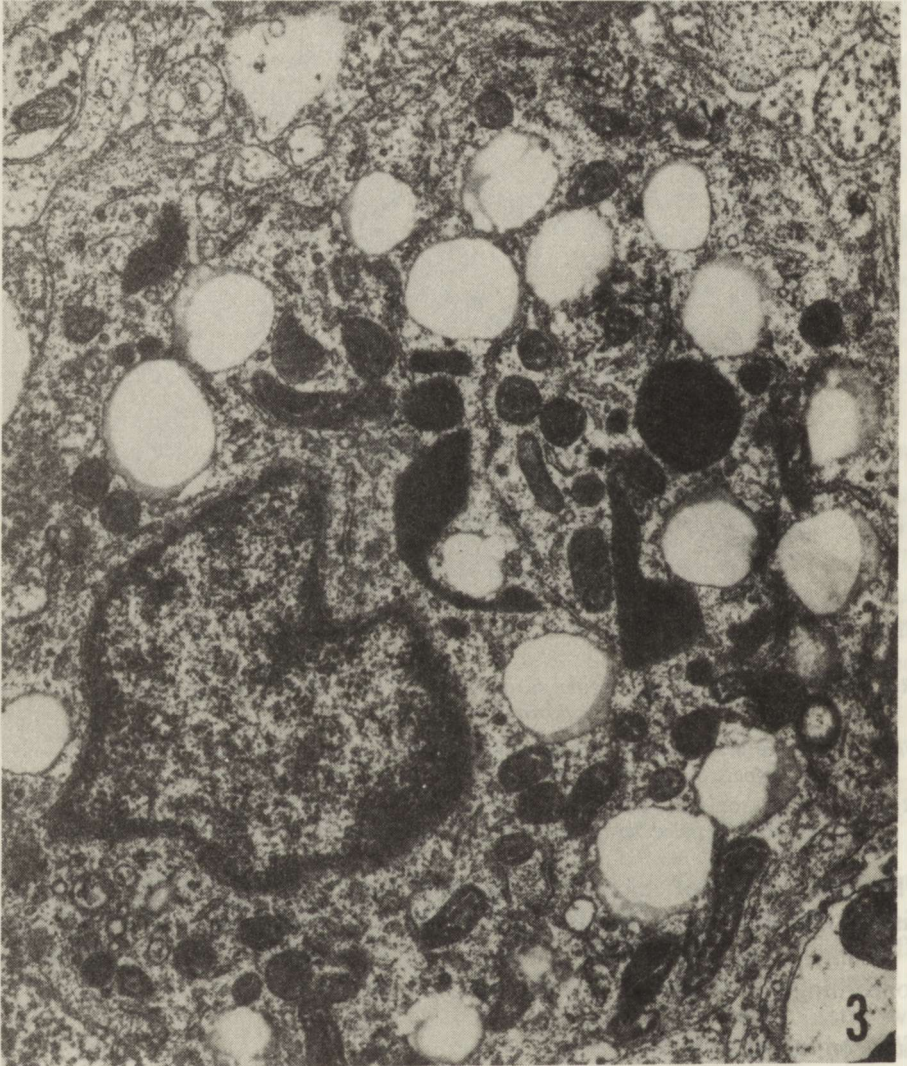


Fig. 3. Macrophage containing numerous inclusions. Note electron-lucent vacuoles probably containing lipid material. $\times 26\,000$

Ryc. 3. Makrofag zawierający liczne wtręty. Zwraca uwagę obecność elektronowo-jasných wakuoli prawdopodobnie zawierających materiał lipidowy. Pow. $\cdot 26\,000\times$

2. The astrocytic cells with electron transparent hyaloplasm and numerous 7–9-nm gliofibrils were a constant finding. The proliferation of glial bundles (Fig. 4) was very intense, and in some areas glial bundles of wavy appearance were observed, sometimes in close contact with dystrophic neurites. The “watery” astrocytic processes seen around the blood vessels represented brain edema.

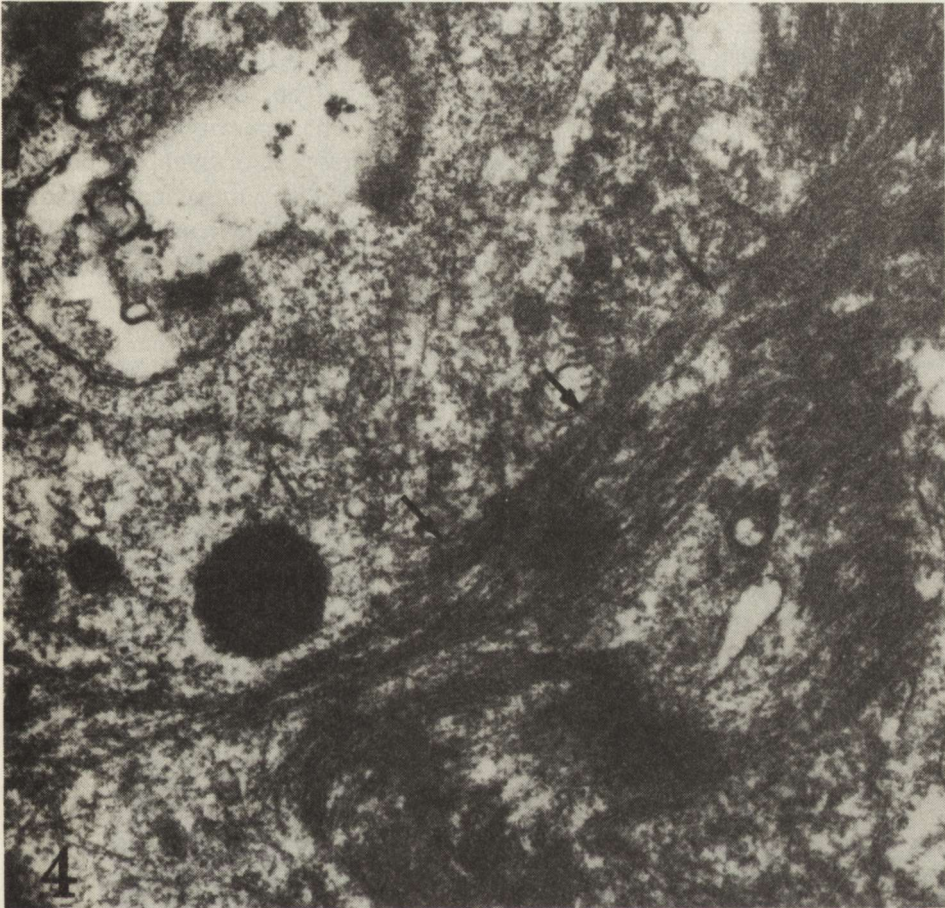


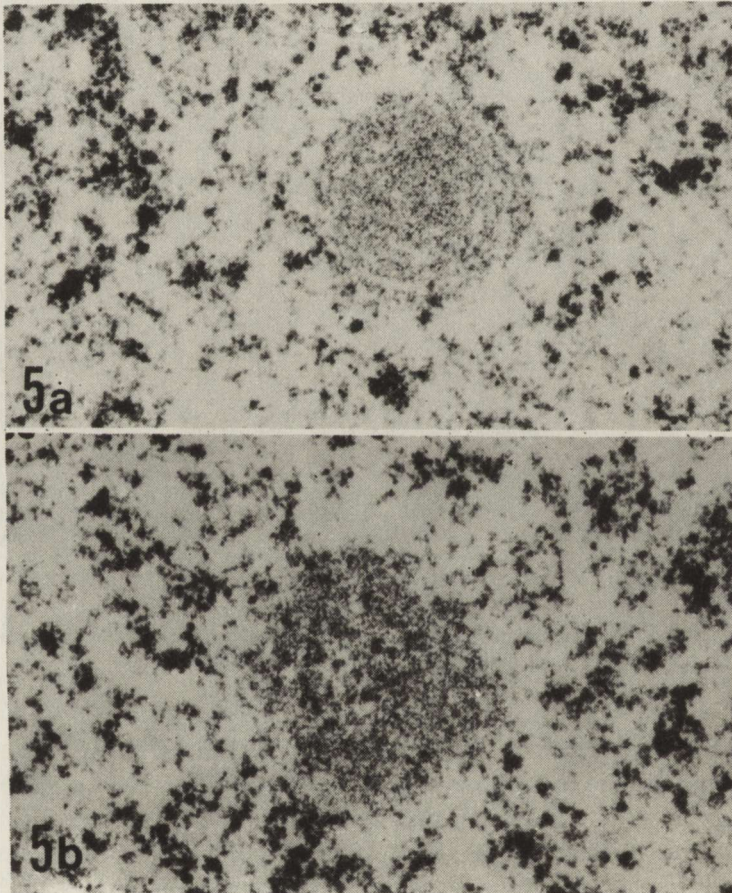
Fig. 4. Fragment of astroglial cell. The bundles of glial filaments (arrows) have a wavy appearance in some places. $\times 26\,000$

Ryc. 4. Fragment komórki astroglejowej. Pęczki filamentów glejowych (strzałki) tworzą miejscami faliste układy. Pow. $26\,000\times$

3. The five basic types of nuclear bodies as defined by Bouteille et al. (1967) were recognized. The majority of nuclear bodies were found in the astrocytic nuclei (Figs 5a–5d). Frequently only one nuclear body was seen per nucleus, but up to three nuclear bodies were observed occasionally. The first type of nuclear body consisted of homogeneous or slightly fibrillar material, surrounded by a clear halo. The second type consisted of fibrillar, onion-like material

without central granules (Fig. 5a). The third type consisted of a fibrillar collar surrounding the core composed of electron-dense granules (Fig. 5b). Sometimes, the clusters of granules were separated by a band of fibrils originating from the fibrillar coat (Fig. 5c). The "halo" separated the body from the rest of the nucleus. The fourth and fifth types appeared as complicated structures consisting of a large fibrillar collar separated by an electron-lucent ring from the core, composed of granular or globular material of higher density (Fig. 5d). In some of these bodies the electron-dense material similar to that of the nucleolus was seen inside the body.

4. The neuronal elements were considered as dystrophic neurites (Figs 6, 7) if containing inclusion bodies (Liberski 1986). The majority of dystrophic neurites were dendrites as recognized by the presence of synaptic boutons ending on the neurites, but a few were recognized as unmyelinated axonal preterminals if containing synaptic vesicles. The dystrophic neurites contained mitochondria and inclusion bodies. Several types of inclusions were found but heterogeneous and homogeneous inclusions predominated.



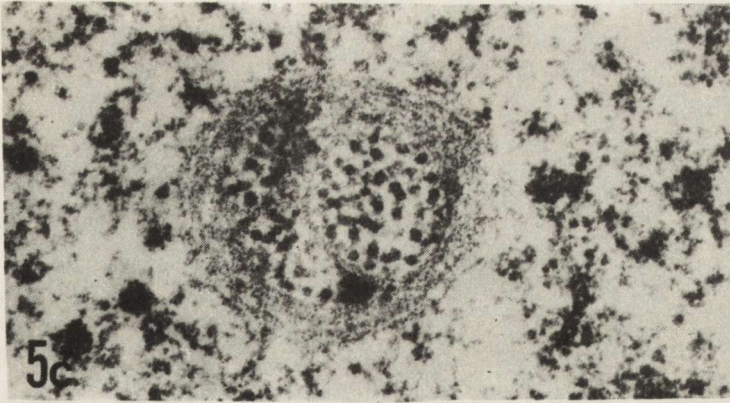


Fig. 5a–5d. Nuclear bodies in astrocytic nuclei. *Fig. 5a.* Nuclear body type II. The body consists of filamentous, onion-like material without central granules. $\times 26\,000$. *Fig. 5b.* Nuclear body type III, consisting of filamentous collar surrounding the core composed of electron-dense granules. $\times 26\,000$. *Fig. 5c.* Intranuclear body of type III. Note band of filaments separating the core. $\times 26\,000$

Ryc. 5a–5d. Astrocytarne ciała jądrowe. *Ryc. 5a.* Ciało jądrowe typu II. Tworzy je włóknikowy materiał o koncentrycznym układzie. Ten typ ciała jądrowego nie zawiera ziarnistości. Pow. $26\,000\times$. *Ryc. 5b.* Ciało jądrowe typu III, utworzone z koliście ułożonych filamentów otaczających rdzeń składający się z elektronowo-gęstego, ziarnistego materiału. Pow. $26\,000\times$. *Ryc. 5c.* Ciało jądrowe typu III. Ziarnisty rdzeń jest wyraźnie odgraniczony przez koliście ułożone filanty. Pow. $26\,000\times$

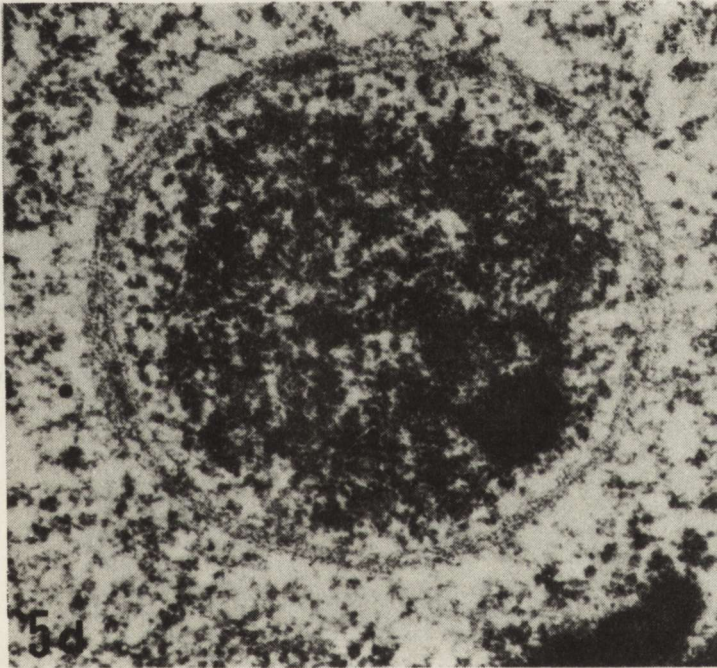


Fig. 5d. Nuclear body type IV. Large fibrillar collar is separated by the electron-lucent ring from the core composed of granular and globular material. $\times 26\,000$

Ryc. 5d. Ciało jądrowe typu IV. Jego pierścień zewnętrzny utworzony z koncentrycznie ułożonych włókienek, oddziela od ziarnistego rdzenia elektronowo-przeźroczyste „halo”. Pow. $26\,000\times$



Fig. 6. Dystrophic neurite (in the center) in close vicinity to the lymphoid cell. $\times 15\,000$
Ryc. 6. Dystroficzny neuryt (w środku ryciny) w bliskim sąsiedztwie komórki limfoidalnej.
Pow. $15\,000\times$

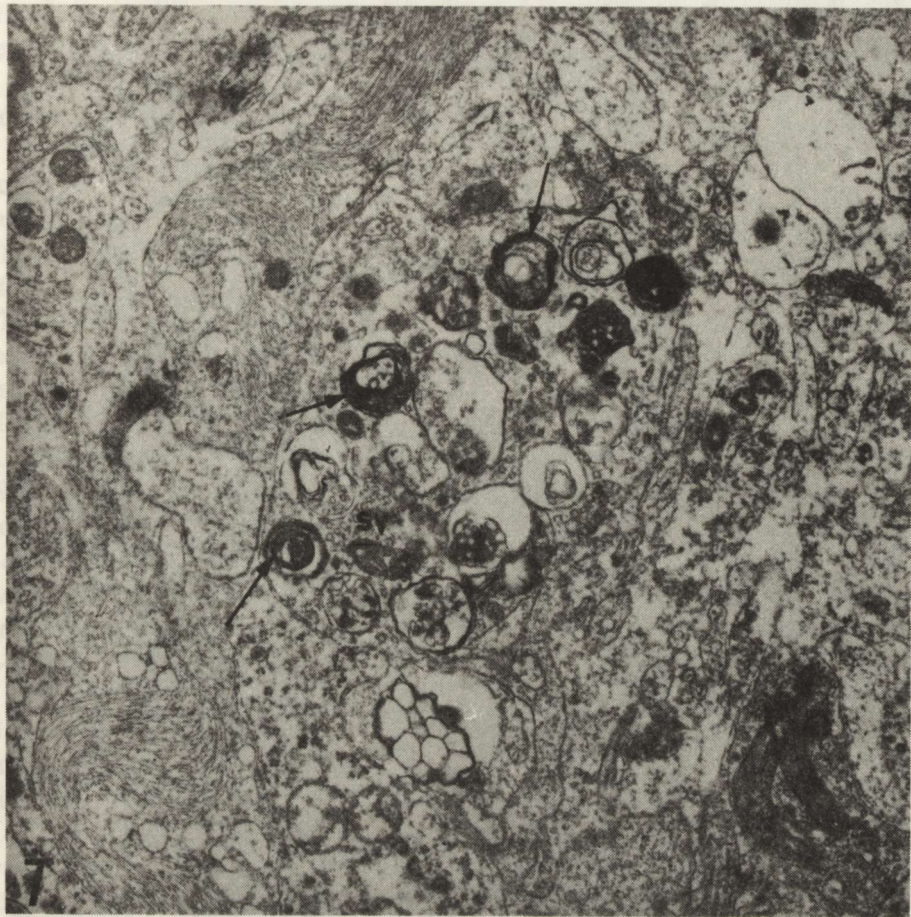


Fig. 7. Dystrophic axon containing lamellar bodies (arrows). Note the synaptic vesicles inside the neurite(sv). $\times 26\ 000$

Ryc. 7. Dystroficzny akson zawierający gęste ciała lamellarne (strzałki). Zwraca uwagę obecność pęcherzyków synaptycznych (sv) w obrębie zakończenia aksonalnego. Pow. 26 000 \times

5. Abnormal tubules were recognized in several undefined cell processes (Fig. 8). The tubules were of different length and wavy appearance. The diameter of tubules measured about 26 nm. The electron dense core was occasionally visible inside the tubule.

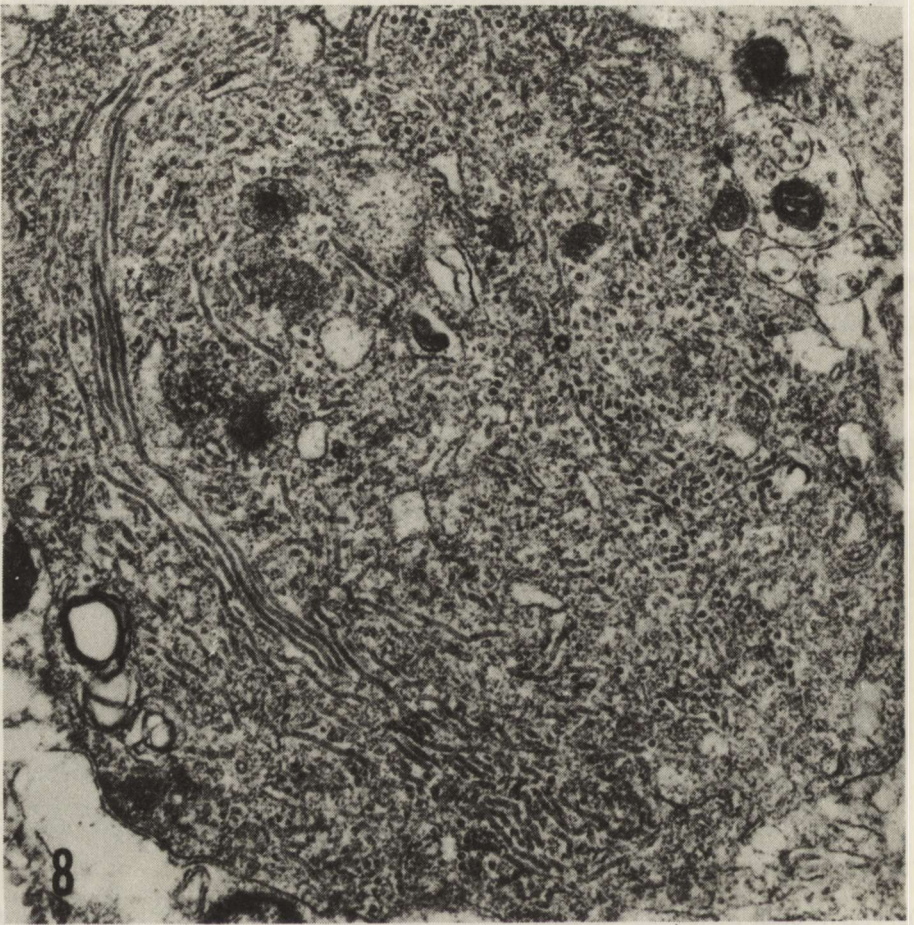


Fig. 8. Cell process filled with abnormal tubules. $\times 26\,000$.

Ryc. 8. Wypustka komórkowa wypełniona nieprawidłowymi tubulami. Pow. $26\,000\times$

DISCUSSION

The clinical course of the case presented here, the Rademecker's complexes observed in the EEG and the results of both neuropathological and electron-microscopic examinations strongly suggested the diagnosis of SSPE. However, the lack of increased antibodies against the measles virus antigens and the absence of typical inclusions composed of paramyxovirus nucleocapsids raise

the question of different etiology. If the doubtful results of electron-microscopic inspection for nucleocapsids can be explained by a sample error, the lack of anti-measles antibodies enables us to speculate on the involvement of other viruses as rubella (Townsead et al. 1982) or infectious mononucleosis virus (Hochberg et al. 1976). The question remains unfortunately not satisfactorily settled in this study.

The presence of nuclear bodies was the constant finding in the study presented here.

It seems that the presence of nuclear bodies is the nonspecific nuclear degeneration being a consequence of hypermetabolic states in the course of numerous unrelated pathologic conditions (Bouteille et al. 1967; Gibson 1982). They were found most consistently in viral SSPE and necrotizing encephalitis of herpes type and neoplastic conditions (Bouteille et al. 1967; Gibson 1982). They were also seen in sarcoidosis and bronchial amyloidosis. The above mentioned authors claim that the type IV nuclear body, according to the quoted classification, was most consistently associated with viral disorders. Nuclear bodies were observed in abundance in SSPE cases (Majdecki, Kulczycki 1976; Perrier et al. 1967; Herndon, Rubinstein 1968; ZuRhein, Chou 1968; Toga et al. 1969; Silva et al. 1981). It is noteworthy that in spite of the presence of the nuclear bodies in conditions unrelated to viral infections, Bouteille et al. (1967), Brown, Thormar (1976), Gibson (1982) provided strong evidence that, at least some of the nuclear bodies were closely associated with or attached to the smooth viral nucleocapsids. The electron micrograph — Figure 5 of the quoted paper illustrates this very clearly.

Interestingly, the nuclear bodies were also present in a case of Creutzfeldt-Jakob disease (Payne, Sibley 1975) which to the best of current knowledge is unassociated with any type of conventional infection (Liberski 1983; Manueldis 1985).

The lack of typical "smooth" and "fuzzy" paramyxovirus nucleocapsids was a highly noticeable element of the case presented here. The tubular smooth structures observed by us had a diameter of about 25 nm and no cross striations were visible. The smooth nucleocapsids measured about 18 nm in diameter as pointed out consistently by several authors (Herndon, Rubinstein 1968; ZuRhein, Chou 1968; Brown, Thormar 1976; Majdecki, Kulczycki 1976; Shephard et al. 1976; Fidziańska et al. 1981; Silva et al. 1981; Dhib-Jalbut, Liwnicz 1984). Most similar to our findings are those of Toga et al. (1969) who furnished the electronmicrograph no. 2 almost identical to ours Figure 8. However, the diameter of tubules described by Toga et al. (1969) was much smaller (18–20 nm). It should be stressed, however, that paramyxovirus-like nucleocapsids observed in brain homogenates obtained from SSPE biopsy reveal diameters of 22.5 to 36 nm (Saeed et al. 1977).

Neuroaxonal dystrophy is one of the most important forms of neuronal degeneration (Jellinger 1973; Liberski 1986). Dystrophic neurites forming the ultrastructural basis for neuroaxonal dystrophy are commonly found in

numerous unrelated toxic, deficiency, degenerative and viral conditions. The most important is Alzheimer dementia complex, where dystrophic neurites are components of the neuritic plaque (Wiśniewski, Terry 1973). The neuritic or amyloid plaque is also a common finding in infectious degenerative encephalopathies (Bruce, Fraser 1975). The dendritic abnormalities were previously described in SSPE as "electron-dense dendrites" (Paula-Barbosa et al. 1980a), mitochondrial paracrystalline inclusions (Paula-Barbosa et al. 1984) and fragmentation or disruption of the atypical dendritic system of pyramidal cells (Paula-Barbosa et al. 1980b).

The dystrophic neurites described by us were observed by Silva et al. (1981). It is noteworthy that in infectious degenerative encephalopathies, scrapie included and Creutzfeldt-Jakob disease, dystrophic neurites in great numbers are a constant ultrastructural finding of possible diagnostic significance (Bignami, Parry 1971; Liberski 1986; Liberski, Gibson 1986). It is, thus interesting to speculate that dystrophic neurites are the common denominator of a diffuse degenerating process regardless of its etiology (Liberski 1986).

**TRUDNOŚCI DIAGNOSTYCZNE W PRZYPADKU PODOSTREGO
STWARDNIAJĄCEGO ZAPALENIA MÓZGU.
BADANIA W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM I ELEKTRONOWYM**

Streszczenie

Przedstawiono przypadek 19-letniego mężczyzny z typowym obrazem klinicznym SSPE i typowym zapisem EEG. Nie stwierdzono podwyższenia miana przeciwciał przeciwdrownych w surowicy i w płynie mózgowordzeniowym chorego.

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa i badania wycinka biopsyjnego mózgu pobranych z płata skroniowego wykazały nacieki zapalne złożone z limfocytów i komórek plazmatycznych oraz reakcję astrocytarno-mikroglejową. Badaniem mikroskopowo-elektronowym ujawniono liczne ciała jądrowe w astrocytach oraz tubule o średnicy 26 nm w nie zidentyfikowanych wypustkach. Stwierdzono także obecność dystroficznych neurytów, które są charakterystyczne dla dystrofii neuroaksonalnej. Pomimo intensywnych poszukiwań nie udało się znaleźć nukleokapsydów paramyksowirusów.

Przedstawione wyniki przedyskutowano w świetle danych z piśmiennictwa dotyczących ultrastruktury SSPE oraz dystrofii neuroaksonalnej.

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТРУДНОСТИ В СЛУЧАЕ ЭНЦЕФАЛИТИС СКЛЕРОТИКАНС
SUBACUTA. ИССЛЕДОВАНИЯ В СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Резюме

Представлен случай 19 летнего мужчины с типичной клинической картиной SSPE и типичной записью ЭЭГ. Не обнаружено повышения титра противокоревых антител в сыворотке и спинно-мозговой жидкости.

Тонкоигольная аспирационная биопсия и исследование биоптического среза мозга показали воспалительные инфильтраты составленные с лимфоцитов и плазматических клеток, а также реакцию астроцитов и микроглии.

Электронно-микроскопические исследование показало многие ядерные тельца и тубули

с диаметром 26 пт в неидентифицированных отростках. Обнаружены также дистрофические нейриты, характерные для нейроаксональной дистрофии. Несмотря на интенсивные поиски не удалось найти нуклеокапсидов парамиксовирусов.

Представленные результаты обсуждены в аспекте литературных данных касающихся ультраструктуры SSPE и нейроаксональной дистрофии.

REFERENCES

1. Bignami A., Parry H. B.: Electron microscopic studies of the brain of sheep with natural scrapie. II. The small nerve processes in neuronal degeneration. *Brain*, 1972, 95, 487–494.
2. Bouteille M., Kalifat S. R., Delarue J.: Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, 19, 474–486.
3. Brown H. R., Thormar H.: A non productive subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus of human and ferret. An ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1976, 34, 339–352.
4. Brownell B., Tomlinson A. H.: Virus diseases of the central nervous system. In: Greenfield's neuropathology. Eds. J. H. Adams, J. A. N. Corsellis, L. W. Duchon. Arnold, London, 1984, 260–303.
5. Bruce M., Fraser H.: Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie. Morphological variations and staining properties. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1975, 1, 189–202.
6. Choppin P. W.: Measles virus and chronic neurological diseases, *Ann. Neurol.*, 1981, 9, 17–20.
7. Dhib-Jalbut S., Liwnicz B. H.: Rapidly progressive subacute sclerosing panencephalitis: an ultrastructural and immunoperoxidase study. *Eur. Neurol.*, 1984, 23, 211–220.
8. Fidziańska A., Niebrój-Dobosz I., Rafałowska J., Ryniewicz B.: Correlative morphological and biochemical studies in a case of subacute sclerosing panencephalomyelitis caused by paramyxovirus. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 293–305.
9. Gibson P. H.: Electron microscopic study of intranuclear spheres of Bouteille type III in astrocytes with special reference to liver carcinoma. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1982, 8, 413–418.
10. Herndon R. M., Rubinstein L. J.: Light and electron microscopy observations on the development of viral particles in the inclusions of Dawson's encephalitis (subacute sclerosing panencephalitis). *Neurology*, 1968, 18, 8–20.
11. Hochberg F. H., Lehigh J. R., Richardson E. P., Feorino P., Astrom K. E.: Mononucleosis-associated subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1976, 34, 33–40.
12. Jellinger K.: Neuroaxonal dystrophy: its natural history and related disorders. In: *Progress in neuropathology*. Ed. H. M. Zimmerman. Grune and Stratton, New York, 1973, vol. 2, 129–178.
13. Liberski P. P.: Wirusy powolne układu nerwowego człowieka i zwierząt. I. Choroba Creutzfeldta-Jakoba. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1983, 37, 141–175.
14. Liberski P. P.: Degenerative neurites in experimental scrapie. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 79–88.
15. Majdecki T., Kulczycki J.: Badanie mikroskopowoelektronowe przypadku podostrego stwardniającego zapalenia mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 245–252.
16. Manuelidis E. E.: Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1985, 44, 1–17.
17. Paula-Barbosa M. M., Tavares M. A.: Mitochondrial abnormalities in cortical dendrites from patients with early forms of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1984, 63, 117–122.
18. Paula-Barbosa M. M., Tavares M. A., Saraiva A. A.: Dendritic abnormalities in patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1980a, 52, 77–80.
19. Paula-Barbosa M. M., Ruela C., Faria R., Cruz C.: Cerebral cortex dendritic degeneration in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Neurology*, 1980b, 30, 7–11.

20. Payne C. M., Sibley W. A.: Intranuclear inclusion in a case of Creutzfeldt-Jakob disease. An ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1975, 31, 353–361.
21. Perier O., Vanderhaegen J. J.: Subacute sclerosing leuco-encephalitis. Electron microscopic findings in two cases with inclusion bodies. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1967, 8, 362–380.
22. Saeed A. A., Gubitt D., Tomlinson A. H.: Subacute sclerosing panencephalitis. Paramyxovirus-like nucleocapsid observed in brain homogenate. *J. Med. Virol.*, 1977, 1, 239–241.
23. Shephard R. D., Feldmen L. A., Barbosa L. H., Raine C. S., Bornstein M. B.: The effect of measles virus and various strains of SSPE virus on organotypic cultures of nervous tissue. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1976, 34, 175–181.
24. Silva C. A., Paula-Barbosa M., Pereira S., Cruz C.: Two cases of rapidly progressive subacute sclerosing panencephalitis. Neuropathological findings. *Arch. Neurol.*, 1981, 38, 109–113.
25. Toga M., Dubois D., Berard M., Tripier M. F., Sesarini J. P., Choux R.: Etude ultrastructurale de quatre cas de leuco-encephalite sclerosante subaigue. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1969, 14, 1–13.
26. Townsed J. J., Stroop W. G., Beringer J. R., Wolinsky J. S., McKerrow J. H., Berg B. C.: Neuropathology of progressive rubella panencephalitis after childhood rubella. *Neurology*, 1982, 32, 185–190.
27. Wender M.: Podostre stwardniające zapalenie mózgu. In: *Podstawy neuropatologii*. Eds. M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. Polish Medical Publishers, Warszawa, 1981, 283–285.
28. ZuRhein G., Chou S. M.: Subacute sclerosing panencephalitis. Ultrastructural study of a brain biopsy. *Neurology*, 1968, 18, 146–160.
29. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of senile plaque. In: *Progress in neuropathology*, Ed. H. M. Zimmerman. Grune and Stratton, New York, 1973, vol. 2, 1–26.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 22 Kopcińskiego Str., 90-153 Łódź, Poland.

ANTONI GODLEWSKI, JÓZEF SZCZECH, JOLANTA FLORCZAK

MULTIPLE, PRIMARY MULTIFOCAL BRAIN ASTROCYTOMA CASE REPORT

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Primary multifocal cerebral tumors of glial origin are not frequent. Their incidence varies, according to different estimates (Henschen 1955; Moertel et al. 1961; Batzdorf, Malamud 1963; Russell, Rubinstein 1971; Mierzejewska 1976), within a wide range: between a fraction of a percent and 10% of all cerebral tumors of glial origin. Significant differences in the incidence of multiple central nervous system tumors of glial origin reflect mainly the fact that not in each case all criteria have been fulfilled which should not be omitted when diagnosing primarily the multifocal character of a neoplastic process (Batzdorf, Malamud 1963; Solomon et al. 1969; Jänisch et al. 1976). Spread of the tumor mediated by cerebrospinal fluid as well as continuous tumor passage along nervous fibers and perivascular spaces have to be excluded (Scherer 1940; Solomon et al. 1969). If the criteria are fulfilled, the incidence of the primarily multifocal tumors does not exceed 2.0–2.5% of all brain neoplasms of glial origin (Batzdorf, Malamud 1963; Solomon et al. 1969; Russell, Rubinstein 1971).

In the Polish literature of the subject few such cases of primarily multifocal glial tumors of the central nervous system have been presented (Borowska-Lehman et al. 1957; Imieliński et al. 1957; Kroh 1959; Hołyst 1977; Godlewski, Szczech 1986). Correct supravital diagnosis in such patients presents obvious diagnostic difficulties. Below, we present a case with 4 coexisting brain tumors in both cerebral hemispheres and in the cerebellum, exhibiting a histological structure of astrocytoma with differentiation of variable degree.

CASE DESCRIPTION

Clinical data

Male patient, aged 53, admitted to Neurological Department of Medical School in Poznań due to psychomotor slow-down, progressing for the last few months, with weakness, balance disturbances, headache and vertigo. The patient had never been seriously ill. Neurological examination at admission demonstrated a discrete tetraparesis, more evident on the right side, with

increased muscular tonus of spastic type, but no pyramidal pathological symptoms, the cerebellar syndrome: ataxia of all extremities, positive Romberg's sign, trunk asynergy. The patient was slowed down but maintained a full logical contact. Ocular fundi demonstrated dilated veins.

In the cerebrospinal fluid, the protein level augmented to 0.73 g/l. was associated with normal cell content. Central ECHO was symmetrical. Skull X-ray examination demonstrated an insignificant decalcification at the top of the pyramid of the right temporal bone. Computer tomography showed the presence of two hyperdense homogeneous, tumor-like fields, subject to contrast amplification and located parasagittally at the left frontotemporal border and in the left frontal lobe. Ventricles showed normal position although the frontal horn of the left cerebral ventricle was flattened at the top (Fig. 1). Subtentorially, a third hypodense tumor was noted within the left cerebellar hemisphere, undergoing marginal contrast amplification in a bicyclic form, causing partial obturation and shifting to the right of the IVth ventricle (Fig. 2).

Despite application of drugs lowering intracranial pressure, the patient gradually deteriorated. The psychomotor slow-down was intensifying, quantitative disturbances in consciousness developed, tetraplegia was becoming more severe. For the first time in the three weeks after admission, the patient developed partial convulsions of right extremities. Despite numerous laboratory tests (chest X-ray, digestive tract X-ray, liver scintigraphy, ultrasonography of the abdomen, prostate examination) no hypothetic primary neoplastic process was detected, besides the head. Two months after admission the patient died with symptoms of respiratory-circulatory insufficiency.

Pathological data

Autopsy demonstrated that a pulmonary embolus was the direct cause of death. Apart from signs of increased intracranial pressure, brain autopsy showed presence of several brain tumors, independent of each other, with diffuse borders, grey-pinkish in colour and of somewhat increased consistency as compared with brain tissue. One of them, $2.5 \times 1.5 \times 1.5$ cm in size, was positioned parasagittally in the right frontal lobe. The second tumor, $2 \times 3 \times 3$ cm in size, was positioned at the left frontoparietal border, close to the lateral ventricle. The third, 2.5 cm in diameter, was noted in the left cerebellar hemisphere and the fourth, the smallest one (not demonstrated by computer tomography), was found in the left frontal cortex, close to the great brain fissure, which was relatively sharply demarcated from the surrounding tissue, cherry-brown in colour and 4 to 5 mm in diameter.

Histopathology. Tumor of right frontal lobe: multicellular, composed mainly of elongated, small cells with darkly stained cell nuclei, arranged into fascicles and bands (Fig. 3), with occasional mitotic figures and binuclear cells. In some portions of the tumor and in those with an irregular array of neoplastic cells in particular, glia fibers were seen (Fig. 4). In numerous sites,

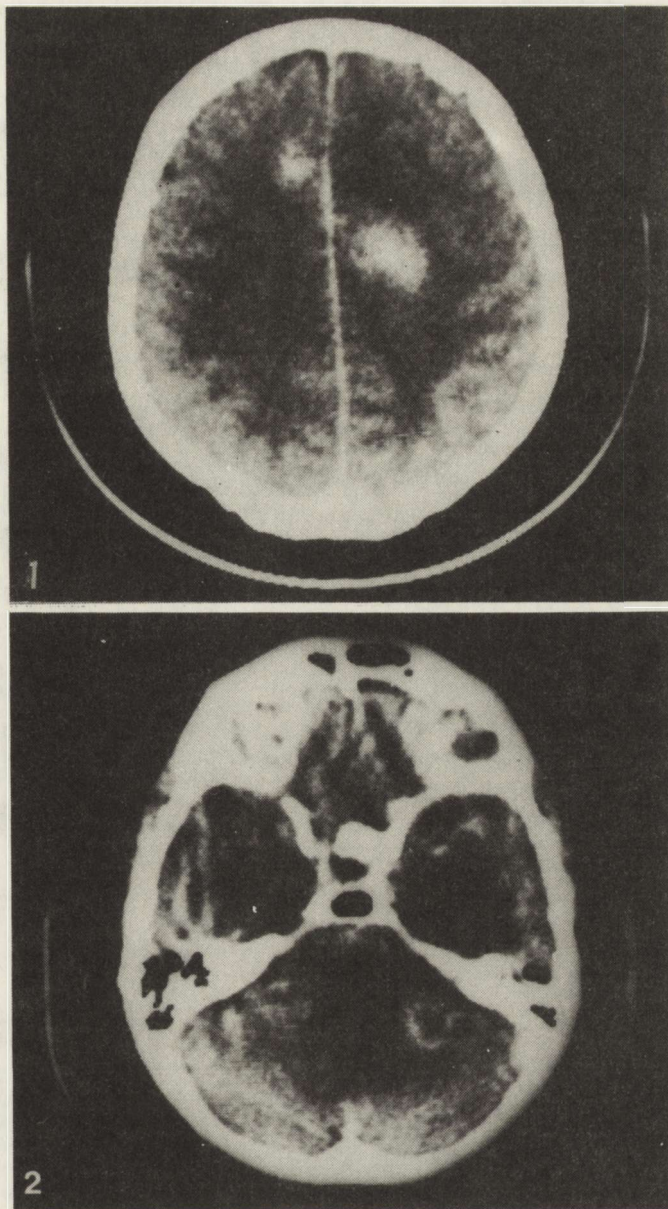


Fig. 1. Brain CT. Hyperdense focus located parasagittally in right frontal lobe, another one in the left frontoparietal region

Ryc. 1. Badanie TK głowy. Hiperdensyjne ognisko położone przystrzałkowo w płacie czołowym prawym, drugie w okolicy czołowo-ciemieniowej lewej

Fig. 2. Brain CT. Hypodense tumor of left cerebellar hemisphere undergoing marginal contrast bicyclic enhancement

Ryc. 2. Badanie TK głowy. Hipodensyjny guz lewej półkuli mózdzku ulegający brzeżnemu wzmocnieniu kontrastowemu w postaci bicyklicznej

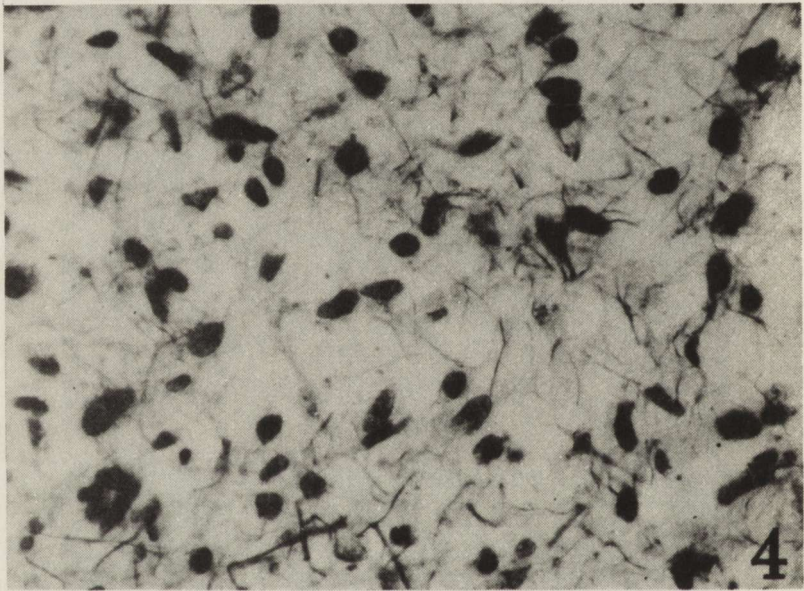
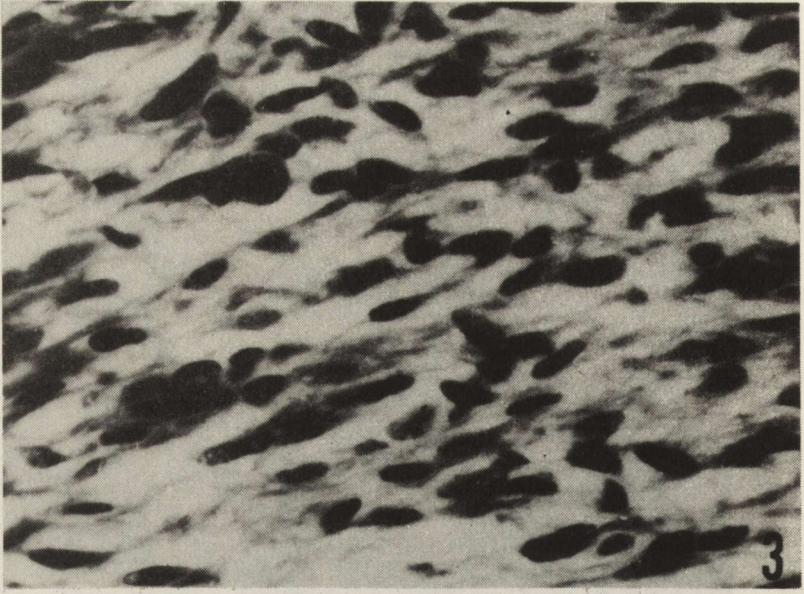


Fig. 3. Right frontal lobe. Shoal-type arrangement of elongated tumor cells. Cells with spindle-like, dark nuclei prevail. Note cells in mitotic division (arrow). H-E. $\times 600$

Ryc. 3. Płat czołowy prawy. Ławicowy układ wydłużonych komórek nowotworowych, przeważają komórki z ciemnym, wrzecionowatym jądrem komórkowym, obecne komórki w trakcie podziałów mitotycznych (strzałka). H-E. Pow. $600\times$

Fig. 4. Right frontal lobe. Tumor fragment consisting of loosely arranged small cells of spheric or irregular shape. Note glial fibers of irregular course. Kanzler's method. $\times 460$

Ryc. 4. Płat czołowy prawy. Fragment guza zbudowany z luźno ułożonych, niewielkich, okrągławych lub nieregularnych komórek, widoczne włókna glejowe o nieregularnym przebiegu. Kanzler. Pow. $460\times$

trapezoid and relatively large necrotic areas were surrounded by a layer of parallel neoplastic cells arranged into palisades (Fig. 5). In marginal portions of the tumor, occasional vascular glomeruli were observed.

Tumor of the left frontoparietal border composed of relatively dense but irregularly arranged gemistocytic cells (Fig. 6), displayed locally pronounced cellular atypia. In numerous fields signet-like cells and irregularly shaped cell

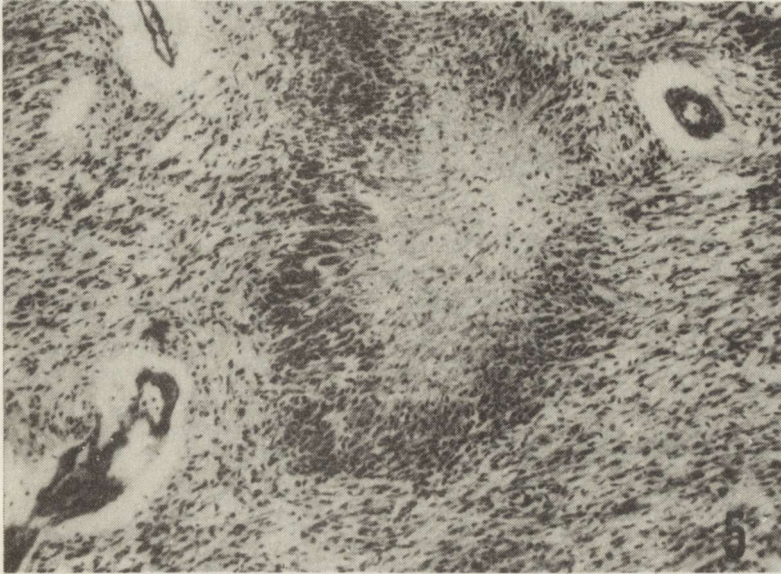


Fig. 5. Right frontal lobe. Necrotic area surrounded by elongated tumor cells arranged into palisade. H-E. $\times 140$

Ryc. 5. Płat czołowy prawy. Pole martwicy otoczone palisadowato ułożonymi, wydłużonymi komórkami nowotworowymi. H-E. Pow. $140\times$

nuclei were noted. Many cells were bi- or multinuclear; some of the nuclei revealed grotesque shapes. The tumor contained scanty vessels, only at the margins showing glomeruli-resembling vascular structures.

Tumor of the left cerebellar hemisphere like the previously described one, consisted of gemistocytic cells mainly (Fig. 7) of a looser structure, however. In this case a significant atypia was also observed. Small necrotic areas of irregular shape were present. In contrast to the tumor described above numerous vascular glomeruli, usually in the marginal parts of tumor were observed (Fig. 8). The small cortical neoplasm of the left frontal lobe was composed mainly of small, densely packed, elongated neoplastic cells similarly as the larger tumor in the right frontal lobe. In contrast to the larger tumor, the cortical neoplasm showed regions with cells which were round or of irregular shape, mostly atypical and irregularly arranged (Fig. 9). No necrotic areas or glia fibers were noted. The tumor was continuously passing into the pia matter, forming there thick neoplastic infiltrations (Fig. 10).

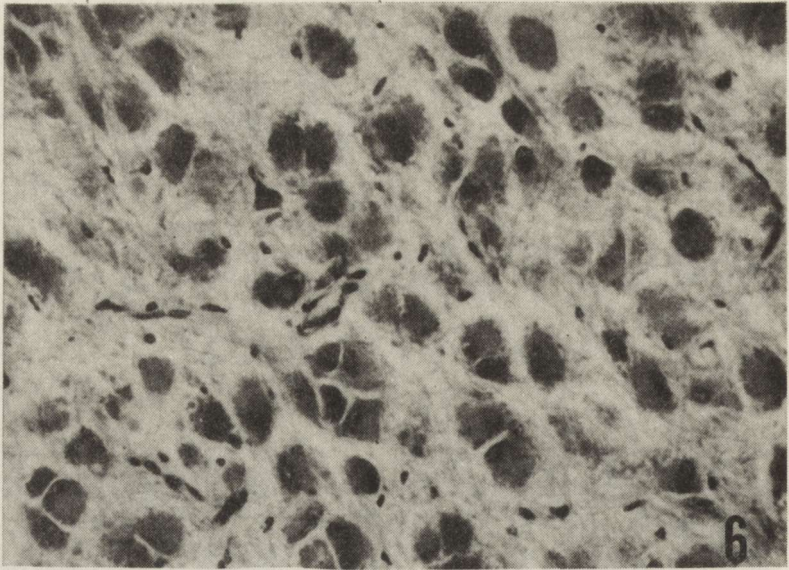


Fig. 6. Left frontoparietal region. Tumor consisting of dense, irregularly arranged gemistocytes with significant cellular atypia. H-E. $\times 540$

Ryc. 6. Pogranicze czołowo-ciemieniowe lewe. Guz zbudowany z gęsto, bezładnie ułożonych gemistocytów o znacznej atypii komórkowej. H-E. Pow. $540\times$

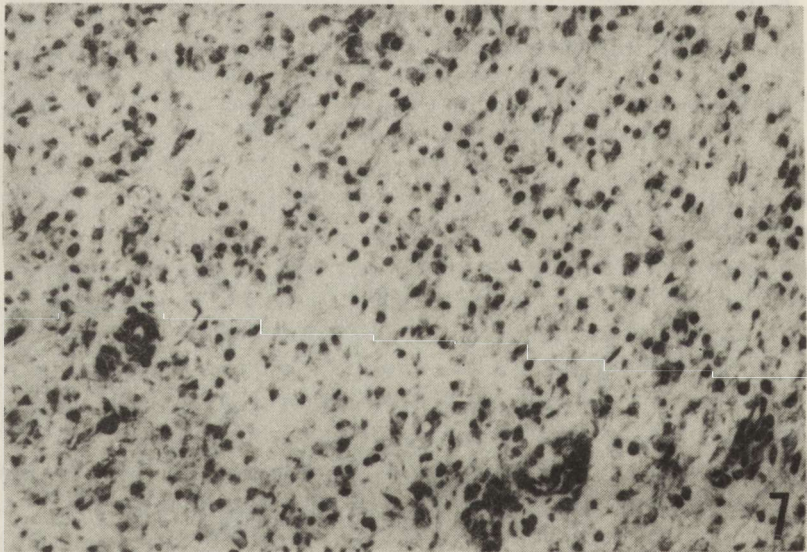


Fig. 7. Left cerebellar hemisphere. Tumor consisting of relatively loosely arranged cells with prevalence of gemistocytes. H-E. $\times 180$

Ryc. 7. Lewa półkula mózdzku. Guz zbudowany z dość luźno rozrzuconych komórek nowotworowych z przewagą gemistocytów. H-E. Pow. $180\times$

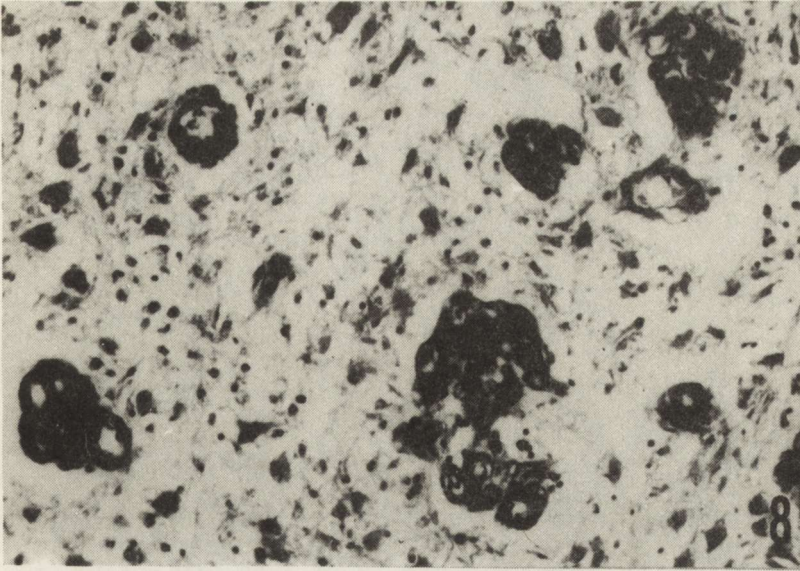


Fig. 8. Left cerebellar hemisphere. Vascular glomerules at tumor margins. H-E. $\times 320$
Ryc. 8. Lewa półkula mózdzku. Klębki naczyniowe na obrzeżu guza. H-E. Pow. $320\times$

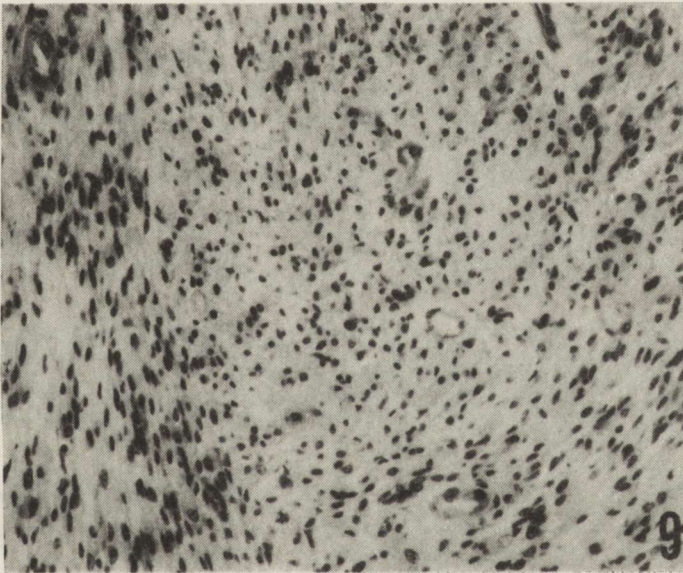


Fig. 9. Cortical tumor in left frontal lobe. Part of tumor consisting of small cells, spheric or irregular in shape, showing irregular, occasionally streaky arrangement with tendency to accumulate around blood vessels. H-E. $\times 240$

Ryc. 9. Guzek korowy — płat czołowy lewy. Część guza zbudowana z małych, okrągłych lub nieregularnych komórek układających się bezładnie, niekiedy pasmowato, niekiedy z tendencją do skupiania się wokół naczyń krwionośnych. H-E. Pow. $240\times$

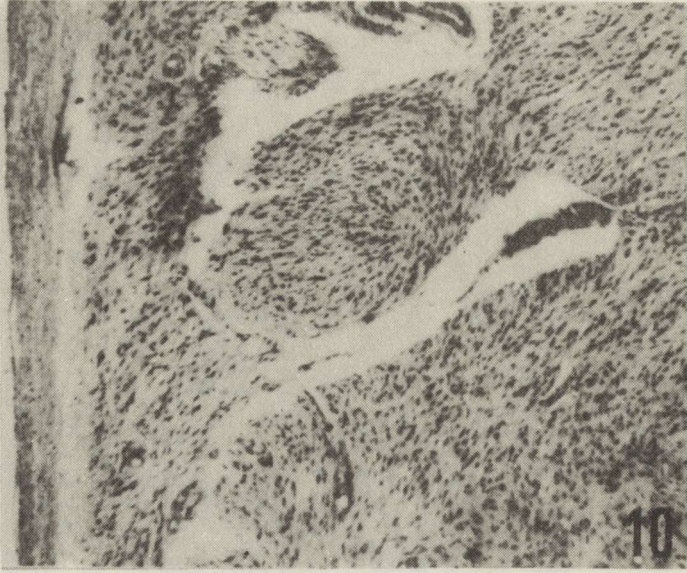


Fig. 10. Cortical tumor in left frontal lobe. Tumor infiltrates continuously meninges and involves all layers of cerebral cortex. H—E. $\times 100$

Ryc. 10. Guzek korowy — płat czołowy lewy. Naciek nowotworowy przechodzi przez ciągłość do opon miękkich oraz zajmuje wszystkie warstwy kory mózgu. H—E. Pow. $100\times$

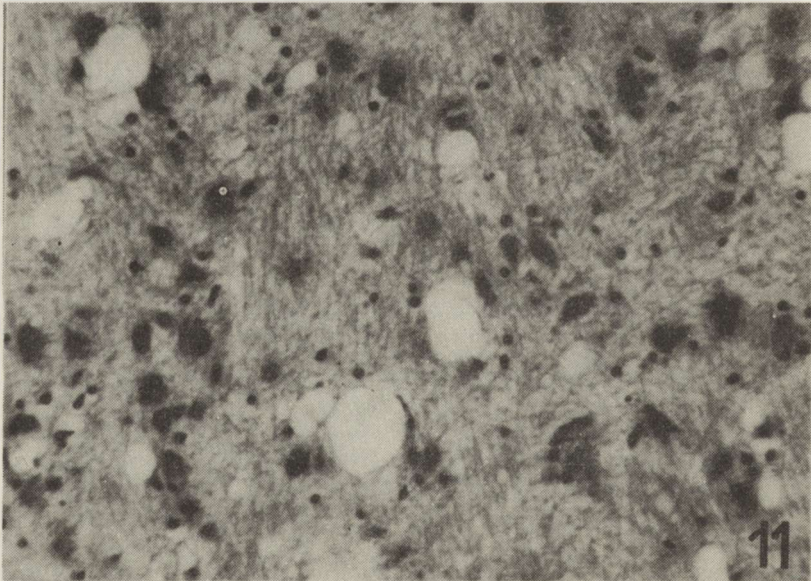


Fig. 11. White matter of right temporal lobe. Numerous hypertrophic glia cells of all kinds. H—E. $\times 320$

Ryc. 11. Istota biała płata skroniowego lewego. Liczne przerośnięte komórki glejowe wszystkich rodzajów. H—E. Pow. $320\times$

All the four tumor foci showed no distinct boundaries with the surrounding tissue. Each of the foci was surrounded by a wide band of hypertrophic glia cells of various types (Fig. 11). Even in brain cortex fragments distant from individual tumors, significant proliferation of glia cells and satellite-type arrangement of oligodendroglia cells around neurocytes were seen (Fig. 12).

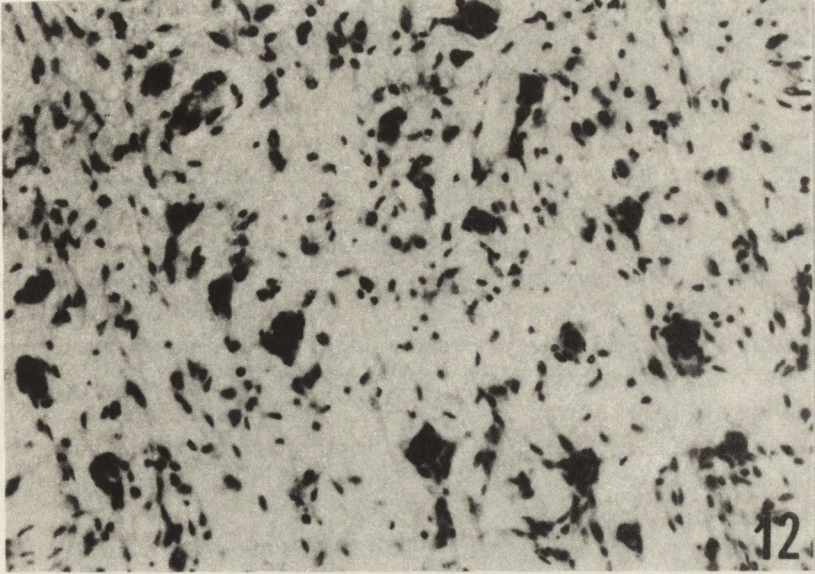


Fig. 12. Cerebral cortex of left perietal lobe. Proliferation of glia cells with significant satellite-arrangement around all nerve cells. H—E. $\times 200$

Ryc. 12. Kora mózgową płata ciemieniowego lewego. Rozplem komórek glejowych, znaczna satelitoza wokół wszystkich komórek nerwowych. H—E. Pow. $200 \times$

DISCUSSION

As mentioned earlier, several criteria have to be fulfilled before multiple brain tumors, developing simultaneously or at a quite distant time period, may be considered as primary multifocal ones (Solomon et al. 1969; Russell, Rubinstein 1971; Jänisch et al. 1976). Flanigan and German (1968) have described a case of two tumors of the central nervous system, the development of which was spaced by more than 25 years. Moreover, metastases with cerebrospinal fluid have to be excluded as well as those growing along nerve fibers and perivascular spaces (Scherer 1940). It seems that, in our case, at least some of the coexisting tumors qualify to the group of primarily multifocal gliomas since a significant number of tumor foci disclosed, have been distant from each other (both cerebral hemispheres, cerebellum) and showed different histological structure.

On the other hand, relations between the described case and gliomatoses, i.e. diffuse neoplastic glia outgrowth within the central nervous system, require attention. According to consistent literature data, typical gliomatosis (Seitz, Kalm 1957; Russell, Rubinstein 1971; Grant 1975; Jänisch et al. 1976) involves significantly large brain areas, transgressing the cerebral hemisphere, frequently involving brain trunk, cerebellum and even spinal cord. Areas of neoplastic growth are almost indistinguishable from unaltered nervous tissue, masses of neoplastic cells very seldom form sharply demarcated tumors, areas of necrosis and hemorrhagic foci are rare (Wünscher, Lehman 1960). Neoplastic infiltrates may penetrate to the pia matter, its cells may diffusely penetrate the involved brain regions and their cells are interspaced with, occasionally well preserved, nerve cells and axons. Penetration of the tumor cells can be noted particularly within fascicles of nervous fibers, along which the tumor cells penetrate the still uninvolved by the tumor portions of the nervous system.

The case we describe above does not correspond to typical gliomatoses owing to its multifocal character, involvement of various brain structures, a pronounced infiltrative type of growth, involvement of meninges, hypertrophy of glia elements in the white matter and in the cerebral cortex, frequently at a significant distance from the tumor foci. The case may be categorized as intermediate between individual or multiple gliomas of a more or less infiltrative type of growth, on the one hand and typical gliomatosis, on the other.

Cases like ours and diffuse brain gliomatoses may speak in favour of the brain tumor development theory, according to which, an undefined factor or a group of factors induces early stages of neoplastic transformation in vast areas or in the whole brain. Secondary intense proliferation of these cells takes place in some regions and leads to the growth of tumors (van der Horst 1955; Willis 1960). The factors which initiate the first stages of tumor transformation (preoncogenic?) remain mostly hypothetical. Their capacity to affect a significant portion of glia cells is indicated by the development of usually multiple brain tumors of various histological pattern as a result of action of chemical carcinogens, e.g. nitrosourea (Jänisch, Schreiber 1969) as well as by the multiplicity of brain tumors associated with tuberous sclerosis (Russell, Rubinstein 1971; Jänisch et al. 1976). Cases of multiple gliomas in multiple sclerosis may be of similar significance (Reagan, Freiman 1973).

MNOGI PIERWOTNIE WIELOOGNISKOWY GWIAŹDZIAK MÓZGU, OPIS PRZYPADKU

Streszczenie

Opisano przypadek 53-letniego chorego, z czterema ogniskami gwiaździaka w obu półkulach mózgu i w mózdzku o różnej budowie histologicznej. Biorąc pod uwagę wieloogniskowość zmian z zajęciem różnych struktur OUN, silnie wyrażony naciekający typ wzrostu, zajęcie opon

miękkich, rozrost elementów glejowych w korze mózgowej i istocie białej nawet w odległych od ognisk nowotworowych częściach mózgowia, przypadek zakwalifikowano jako pośredni pomiędzy mnogimi pierwotnie wieloogniskowymi glejakami mózgu a rozlaną gliomatozą.

МНОЖЕСТВЕННАЯ ПЕРВИЧНО МНОГООЧАГОВАЯ АСТРОЦИТОМА МОЗГА — ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ

Резюме

Описан случай 53-летнего больного с четырьмя очагами астроцитомы в обеих полушариях мозга и мозжечка, с разным гистологическим строением. Многоочаговые изменения с захватом различных структур центральной нервной системы, сильно выраженный инфильтрирующий тип роста, захват мягких оболочек, пролиферация глиозных элементов в мозговой коре и белом веществе, даже в отделенных от неоплазматических очагов частях мозга, квалифицируют случай как промежуточный между множественными первично многоочаговыми глиомами мозга а диффузным глиоматозом.

REFERENCES

1. Batzdorf U., Malamud N.: The problem of multicentric gliomas. *J. Neurosurg.*, 1963, 20, 122—136.
2. Bowerska-Lehman J., Imieliński J., Jeliński M.: Z zagadnień pierwotnie wieloogniskowych glejaków mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 79—85.
3. Flanigan S., German W. J.: Fibrillary astrocytomas, cerebellar (1940) and spinal medullary (1966). *J. Neurosurg.*, 1968, 28, 70—73.
4. Godlewski A., Szczech J.: Przypadek pierwotnie wieloogniskowego glejaka wielopostaciowego mózgu. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1986, 20, 271—274.
5. Grant N.: Diffuse glioblastosis. In: *Handbook of clinical neurology*. Eds.: P. J. Vinken, G. W. Bruyn, V. 18. North Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, 1975, 73—79.
6. Henschen F.: Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Hüllen. In: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, V. 13/3. Eds.: O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955, 413—1040.
7. Hołyst J.: Wieloogniskowy guz mózgu. *Wiad. Lek.*, 1977, 30, 1379—1381.
8. Imieliński B., Jaworska I., Wrzołkowa T.: Przypadek wieloogniskowego glejaka mózgu. *Neurol. Neurochir. Psychiat. Pol.*, 1957, 7, 395—402.
9. Jänisch W., Güthert H., Schreiber D.: *Pathologie der Tumoren des Zentralnervensystems*. VEB Gustav Fischer, Jena, 1976.
10. Jänisch W., Schreiber D.: *Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems*. VEB Gustav Fischer, Jena, 1969.
11. Kroh H.: Pierwotne mnogie nowotwory śródczaszkowe. *Neurol. Neurochir. Psychiat. Pol.*, 1959, 9, 493—499.
12. Mierzejewska E.: Obraz kliniczny guzów nowotworowych mózgu u ludzi po 50-tym roku życia. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1976, 10, 737—742.
13. Moertel C. G., Dockerty M. B., Baggenstoss A. H.: Multiple primary malignant neoplasms. III. Tumors of multicentric origin. *Cancer*, 1961, 14, 238—248.
14. Reagan T. J., Freiman I. S.: Multiple cerebral glioma in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1973, 36, 523—528.
15. Russell D. S., Rubinstein L. J.: *Pathology of tumors of the nervous system*. Arnold, London, 1971.
16. Scherer H. J.: The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain.*, 1940, 63, 1—112.

17. Seitz D., Kalm H.: Die diffuse Glioblastose. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1957, 175, 528–546.
18. Solomon A., Perret G. E., McCormick W. F.: Multicentric gliomas of the cerebral and cerebellar hemispheres. *J. Neurosurg.*, 1969, 31, 87–93.
19. van der Horst L.: Application of the field theory to gliomata. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1955, 14, 369–378.
20. Willis R. A.: *Pathology of tumours*. Butterworth, London, 1960.
21. Wünscher W., Lehmann W.: Zur diffusen Glioblastose. *Psychiat. Neurol. med. Psychol.*, 1960, 12, 244–248.

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



ALEKSANDER ARENDT
1921 – 1986

5 października 1986 r. zmarł nieoczekiwanie prof. dr hab. Aleksander Arendt, emerytowany Kierownik Zakładu Neuropatologii w Instytucie Anatomii Patologicznej Uniwersytetu im. Karola Marksa w Lipsku, współorganizator i wieloletni prezes Towarzystwa Neuropatologów Niemieckiej Republiki Demokratycznej, inicjator i propagator współpracy neuropatologów polskich i niemieckich.

Aleksander Arendt urodził się w 1921 r. w Oetzsch koło Lipska. W Lipsku ukończył szkołę podstawową i średnią, tu również w 1939 r. rozpoczął studia na wydziale lekarskim tamtejszego Uniwersytetu. Po roku został z niego relegowany na podstawie przepisu Ustaw Norymberskich, a w 1944 r. osadzony w obozie koncentracyjnym, w którym zastał go koniec II wojny światowej. Po jej zakończeniu powrócił do Lipska, gdzie kontynuował przerwane studia medyczne. Ukończył je w 1949 r. zdaniem egzaminów państwowych i uzyskaniem stopnia doktora medycyny.

Po odbyciu stażów podyplomowych podjął pracę w Klinice Neurologiczno-Psychiatrycznej, a następnie w Instytucie Badania Mózgu Uniwersytetu

Lipskiego. Już jako specjalista w zakresie neurologii i psychiatrii przeniósł się do pracy w Instytucie Anatomii Patologicznej. Tu odbył specjalizację w patomorfologii i habilitował się. Tu również stawiał pierwsze kroki w zakresie diagnostycznej neuropatologii. W 1963 r. został docentem, a w 1968 r. profesorem zwyczajnym anatomii patologicznej. W 1963 r. został kierownikiem Zakładu Neuropatologii zorganizowanego przez siebie w macierzystym Instytucie Anatomii Patologicznej. Zakład ten prowadził do przejścia na emeryturę, na kilka dosłownie tygodni przed śmiercią.

Profesor A. Arendt był autorem ponad 100 oryginalnych publikacji naukowych i blisko tyluż komunikatów zjazdowych przedstawianych na krajowych i międzynarodowych kongresach, sympozjach i konferencjach. Jego głęboko motywowane i realizowane przez całe życie zawodowe zainteresowania naukami neurologicznymi dotyczyły licznych dziedzin neurologii i neuropatologii diagnostycznej, jakkolwiek niemałą część swego dorobku poświęcił również badaniom doświadczalnym. Wiodącym nurtem jego dociekań badawczych były zagadnienia neuroonkologii, chorób naczyniowych ośrodkowego układu nerwowego, jego zapaleń oraz procesów starzenia się mózgu. Prowadzone w ostatnich latach intensywne badania patomechanizmów choroby Alzheimerera sprawiały mu szczególną satysfakcję, gdyż realizowane były wspólnie z synem — młodym adeptem neurochemii.

Na odrębne podkreślenie zasługuje obfity podręcznikowy i monograficzny dorobek publikacyjny profesora Arendta, odzwierciedlający z jednej strony kierunki Jego zainteresowań naukowych, z drugiej zaś jego upodobania i umiejętności dydaktyczne. Mieści się w nim, znany czytelnikowi polskiemu, dwukrotnie wznawiany „Atlas diagnostycznej histopatologii nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i struktur z nim związanych” („Histologisch-diagnostischer Atlas der Geschwülste des Zentralnervensystems und seiner Anhangsgebilde”) oraz „Kieszonkowy podręcznik klinicznej neuropatologii” („Taschenbuch der Klinischen Neuropathologie”), stanowiący, z niezwykłym talentem dydaktycznym opracowane, kompendium wiedzy o patologii układu nerwowego. Był ponadto współautorem „Handbuch der allgemeinen Pathologie” (1972), w którym opracował rozdział poświęcony procesom starzenia się mózgu, oraz międzynarodowego „Handbook of Clinical Neurology” (1976), w którym jego autorstwa są rozdziały poświęcone wyściółczakom mózgu oraz glejakom rdzenia kręgowego. W druku jeszcze znajduje się obszerne wydawnictwo „Allgemeine Pathologie”, do którego przygotował duży rozdział „Allgemeine Pathologie der nervösen Regulation”. Brał również żywy udział w działalności wydawniczej czasopism anatomopatologicznych i neuropatologicznych, jako członek zespołów redakcyjnych „Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie” i “Clinical Neuropathology”. Był aktywnym współpracownikiem, działającego pod egidą Światowej Organizacji Zdrowia, Ośrodka dla Histopatologicznej Klasyfikacji Guzów Ośrodkowego Układu Nerwowego, który opracował obowiązującą w krajach członkowskich WHO — klasyfikację nowotworów mózgu.

Znaczną część swojego zawodowego życia poświęcił dydaktyce, zarówno przed- jak i podyplomowej. Czynił to z pasją i zaangażowaniem. Cieszył się powszechną opinią znakomitego nauczyciela.

Profesor A. Arendt niezwykle aktywnie uczestniczył w krajowym i międzynarodowym życiu społeczno-naukowym. Był członkiem Towarzystwa Neurologicznego i Psychiatrycznego, Towarzystwa Patologicznego oraz Towarzystwa Nauk Neurologicznych Niemieckiej Republiki Demokratycznej, wchodząc z wyboru w skład ich gremiów kierowniczych. Był członkiem założycielem Towarzystwa Neuropatologów NRD i przez 14 lat kierował jego działalnością, przyczyniając się w sposób zasadniczy do rozwoju naukowego i instytucjonalnego tej specjalności medycznej w swoim kraju. Reprezentował neuropatologów NRD na licznych imprezach naukowych organizowanych na całym świecie i w szeregu międzynarodowych gremiów organizacyjnych między innymi w zarządzie Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego oraz jako wiceprezes szeregu kolejnych międzynarodowych Kongresów Neuropatologicznych. Był członkiem założycielem Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologów. Uczestniczył w pracach Międzynarodowej Organizacji Badań Mózgu (IBRO) oraz Problemowej Komisji Neuroonkologicznej Światowej Federacji Neurologii.

W tej krótkiej notatce poświęconej pamięci prof. A. Arendta nie sposób pominąć Jego związków z polską neuropatologią. Jako prezes Towarzystwa Neuropatologów NRD zainicjował współpracę ze Stowarzyszeniem Neuropatologów Polskich. Był inspiratorem pierwszych, zacieśniających się z latami kontaktów między obydwojema towarzystwami i w sposób niepodważalny przyczynił się do organizowania w odstępach czteroletnich NRD-owsko-polskich sympozjów neuropatologicznych. Chętnie uczestniczył w organizowanych przez nas imprezach naukowych. Nierzadko szczerze i niezdawkowo podkreślał, że czuł się dobrze w naszym kraju wśród nas. Rozumieliśmy się nawzajem.

Profesor Aleksander Arendt był wybitnym uczonym, znakomitym nauczycielem i świetnym organizatorem życia naukowego. Był równocześnie człowiekiem niezwyklej skromności, pełnym rozwagi, życzliwością dla ludzi i mądrego dystansu do spraw i rzeczy. Miał bogate zainteresowania pozazawodowe. Znał świetnie literaturę piękną i muzykę. Miał wspaniałe, subtelne poczucie humoru.

Z jego odejściem neuropatologia straciła jednego ze swoich współtwórców, neuropatologia Niemieckiej Republiki Demokratycznej — jednego ze swoich najwybitniejszych przedstawicieli, a neuropatologia polska — oddanego przyjaciela.

Mirosław J. Mossakowski

Zakład Narodowy im. Ossolińskich – Wydawnictwo. Wrocław 1988.
Nakład: 590 egz. Objętość: ark. wyd. 8,90, ark. druk. 8, ark. A₁-11.
Papier offset. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania 1988.01.07.
Podpisano do druku 1988.07.06. Druk ukończono w sierpniu 1988.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3028/88. K-16. Cena zł 200,-

heart failures in the developmental age. I. Morphometric evaluation of cerebral and cerebellar vascularization in cyanotic and non-cyanotic congenital heart failures	49
Mirosław Beskid, Danuta Markiewicz: Morphological changes in the brain of rats after intracardiac and intraperitoneal administration of quinolinic acid	61
Teresa Bugera-Piecuch: Homovanilic acid (HVA) level and GABA-T activity in the rat brain after cobaltous acetate intoxication	69
Paweł P. Liberski: The occurrence of cytoplasmic lamellar bodies in scrapie infected and normal hamster brain	79
Ewa Matyja, Krystyna Renkawek: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in a patient with dominating dementia	87
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak, Janina Szulc-Kuberska, Jacek Roźniecki: Diagnostic difficulties in a case subacute sclerosing encephalitis. Light- and electron-microscopic study	97
Antoni Godlewski, Józef Szczech, Jolanta Florczak: Multiple, primary multifocal brain astrocytoma. Case report	111
Mirosław J. Mossakowski: Aleksander Arendt	123

СОДЕРЖАНИЕ

Мария Домбска: Эволюция взглядов на дегенеративные болезни и процессы нервной системы	1
Миечислав Вендер, Ханна Хейдук-Хантке, Анджей Гонцежевич, Халина Выглондальска-Ернас: Морфометрия миелина стареющегося человеческого мозга	9
Ирена Небруй-Добош, Веслава Висьневска, Мария Барциковска-Литвин: Влияние возраста на густоту миелиновых фракции изолированных из белого вещества мозга человека	19
Ирмина Зельман, Анна Тарашевска: Гистологическая оценка глии в миелинизации мутанта pt	27
Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонцежевич, Анджей Журавски, Эугениуш Срочински, Алина Гроховальска: Влияние слабой гипоксии на содержание и картину свободных жирных кислот в белом веществе мозга	39
Юзеф Калужа, Дариуш Ададек, Витолд Межински, Войцех Стольпа: Морфологические показатели изменений в центральной нервной системе в синюшных и несинюшных врожденных пороках сердца в возрасте развития. I Морфометрическая оценка ка васкуляризации мозга и мозжечка в синюшных и несинюшных врожденных пороках сердца	49
Мирослав Бескид, Данута Маркевич: Морфологические изменения в мозгу крыс после внутрисердечного и внутрибрюшинного введения хинолиновой кислоты	61
Тереса Бугера-Пецух: Уровень гомованилиновой кислоты (HVA) и активность GABA-T в мозгу крысы после интоксикации солями кобальта	69
Павел П. Либерски: Цитоплазматические ламеллярные тела в мозгах нормальных хомяков и хомяков зараженных сгаріе	79
Ева Матыя, Кристина Ренкавек: Боковой амиотрофический склероз (БАС) у больного с деменцией	87
Павел П. Либерски, Биелислав Папеж, Януш Альвасяк, Яанина Шульц-Куберска, Яцек Рожнецки: Диагностические трудности в случае encephalitis scleroticans subacuta. Исследования в световой и электронной микроскопии	97
Антони Годлевски, Юзеф Щех, Иоланта Флорчак: Множественная первично многоочаговая астроцитомы мозга. Описание случая	111
Мирослав Я. Моссаковский: Проф. Александер Арэндт	123

SPIS TREŚCI

Maria Dąbska: Ewolucja poglądów na choroby i procesy zwyrodnieniowe układu nerwowego	1
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Andrzej Goncerzewicz , Halina Wyglądalska-Jernas: Morfometria mieliny starzejącego się mózgu ludzkiego	9
Irena Niebrój-Dobosz, Wiesława Wiśniewska, Maria Barcikowska-Litwin: Wpływ wieku na gęstość frakcji mieliny izolowanej z istoty białej mózgu ludzkiego	19
Irmina B. Zelman, Anna Taraszewska: Histologiczna ocena gleju w procesie mielinizacji u królika pt	27
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski, Eugeniusz Sroczyński, Alina Grochowalska: Wpływ łagodnego niedotlenienia na zawartość i obraz wolnych kwasów tłuszczowych w istocie białej mózgu	39
Józef Kałuża, Dariusz Adamek, Witold Mierzyński, Wojciech Stolf: Morfologiczne wykładniki zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w sinicznych i niesinicznych wadach wrodzonych serca. I. Morfometryczna ocena unaczynienia mózgu i mózdzku we wrodzonych wadach sinicznych i niesinicznych serca	49
Mirosław Beskid, Danuta Markiewicz: Zmiany morfologiczne w mózgu szczurów po dosercowym i dootrzewnowym podaniu kwasu chinolinowego	61
Teresa Bugera-Piecuch: Poziom kwasu homowanilinowego (HVA) i aktywność aminotransferazy 4-aminomaślan:2-oksoglutaranu (GABA-T) w mózgu szczura po zatruciu octanem kobaltowym	69
Paweł P. Liberski: Występowanie cytoplazmatycznych ciał laminarnych w mózgach chomików normalnych i chomików zakażonych scrapie	79
Ewa Matyja, Krystyna Renkawek: Przypadek stwardnienia zanikowego bocznego u pacjenta z objawami otępienia	87
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak, Janina Szulc-Kuberska, Jacek Roźniecki: Trudności diagnostyczne w przypadku podostrego stwardniającego zapalenia mózgu. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym	97
Antoni Godlewski, Józef Szczech, Jolanta Florczak: Mnogi pierwotnie wieloogniskowy gwiazdziak mózgu. Opis przypadku	111
Mirosław J. Mossakowski: Aleksander Arendt	123

CONTENTS

Maria Dąbska: Evolution of views on the degenerative processes and diseases of the nervous system	1
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Andrzej Goncerzewicz, Halina Wyglądalska-Jernas: Morphometry of myelin in the aging human brain	9
Irena Niebrój-Dobosz, Wiesława Wiśniewska, Maria Barcikowska-Litwin: Influence of aging on density of myelin fractions isolated from human white matter	19
Irmina B. Zelman, Anna Taraszewska: Histological evaluation of glia in the process of myelination in pt rabbit	27
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski, Eugeniusz Sroczyński, Alina Grochowalska: Effect of moderate hypoxia on content and pattern of free fatty acids in cerebral white matter	39
Józef Kałuża, Dariusz Adamek, Witold Mierzyński, Wojciech Stolf: Morphological abnormalities of the central nervous system in cyanotic and non-cyanotic congenital	