

C16T

2 202



PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 26

1988

ZESZYT 2

---

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

<http://rcin.org.pl>

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

## KWARTALNIK

---

TOM 26

1988

ZESZYT 2

---

### 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 B. Zelman

### PRZY WSPÓŁPRACY

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

### REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Werner, Irmina B. Zelman

### REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski  
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina B. 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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Maszynopis niniejszego nru przekazano Wydawcy 10.02.1988

ANDRZEJ GONCERZEWICZ

THE ROLE OF ASTROGLIA IN PATHOLOGICAL PROCESSES  
CHARACTERIZED BY MYELIN DISINTEGRATION.  
II. ELECTRON ENZYME AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF THE  
ASTROGLIA IN EXPERIMENTAL INJURY TO WHITE MATTER

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

In the first part of this publication (Goncerzewicz 1987) the ultrastructure of reactive astroglia in several different models of experimental white matter injury was presented. These reactive changes usually appear much earlier than discernible signs of myelin sheath disintegration. Moreover, it was shown that the processes of hypertrophied astroglia entered into close contact with myelin about to be disrupted. This phenomenon was interpreted as evidence of formation of a novel type of structural (and possibly also functional) intercellular connections by astrocytes, which seem to be the main cellular component active within injured white matter.

For more precise characterization of astroglial reactive changes and for better visualization of the postulated novel intercellular connections within injured white matter, enzyme cytochemistry methods as well as immunocytochemistry techniques were employed in this study. Enzyme cytochemistry enables to reveal the subcellular structures which may play an important role in cellular reactive changes. On the other hand, the high specificity of immunocytochemical techniques would help in identification of astroglial processes which enter into close structural relationship with degenerating myelin.

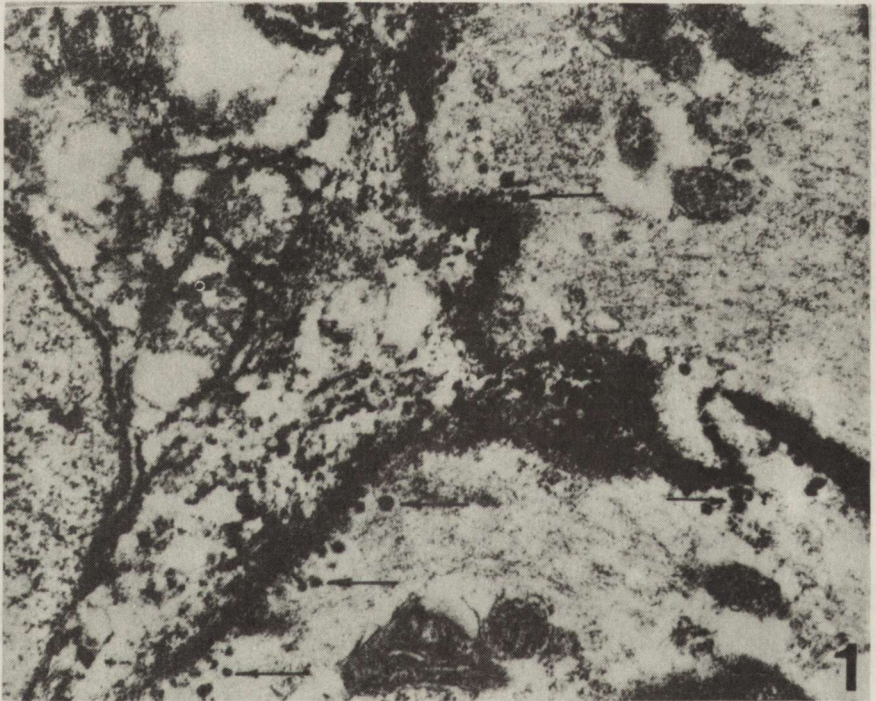
The models of experimental white matter injury employed in this study were: "postpumping" myelopathy after Bunge et al. (1960), central Wallerian degeneration in the rat optic nerve, as described by Goncerzewicz (1982), and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (Lassmann, Wiśniewski 1979).

## MATERIAL AND METHODS

The experimental procedures of "postpumping" myelopathy in adult cats spinal cord and central Wallerian degeneration (cWD) in adult rat optic nerve were described in the first part of this publication (Goncerzewicz 1988).

Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (crEAE) was induced after Lassmann and Wiśniewski (1979) in young Hartley guinea pigs. Briefly, 2–3-week-old animals were sensitized with 0.2 ml of encephalitogenic mixture injected into both hind legs. With the onset of clinical symptoms of the first relapse, pieces of white matter adjacent to plaques of demyelination in the spinal cord were taken.

In order to demonstrate the activities of acid phosphatase (AcP-ase: orthophosphoric monoester phosphohydrolase – 3.1.3.2), thiamine pyrophosphatase (TPP-ase: thiamine phosphate pyrophosphohydrolase – 3.5.1a) and adenosine triphosphatase (ATP-ase: ATP-phosphohydrolase – 3.6.1.3.), pieces of white matter were fixed by immersion for 60–90 minutes in a cold glutaraldehyde-paraformaldehyde mixture after Karnovsky 1965.



*Fig. 1.* "Postpumping" myelopathy. Late period. Abundant ATP-ase reaction product is confined not only to astrocyte plasma membranes but also to micropinocytotic vesicles (arrows).  $\times 9500$   
*Ryc. 1.* Mielopatia wywołana "pompowaniem" płynu mózgowo-rdzeniowego. Okres późny. Obfity produkt reakcji ATP-azy jest nie tylko powiązany z błonami cytoplazmatycznymi astrocytów, ale znajduje się również w pęcherzykach mikropinocytarnych (strzałki). Pow. 9500  $\times$

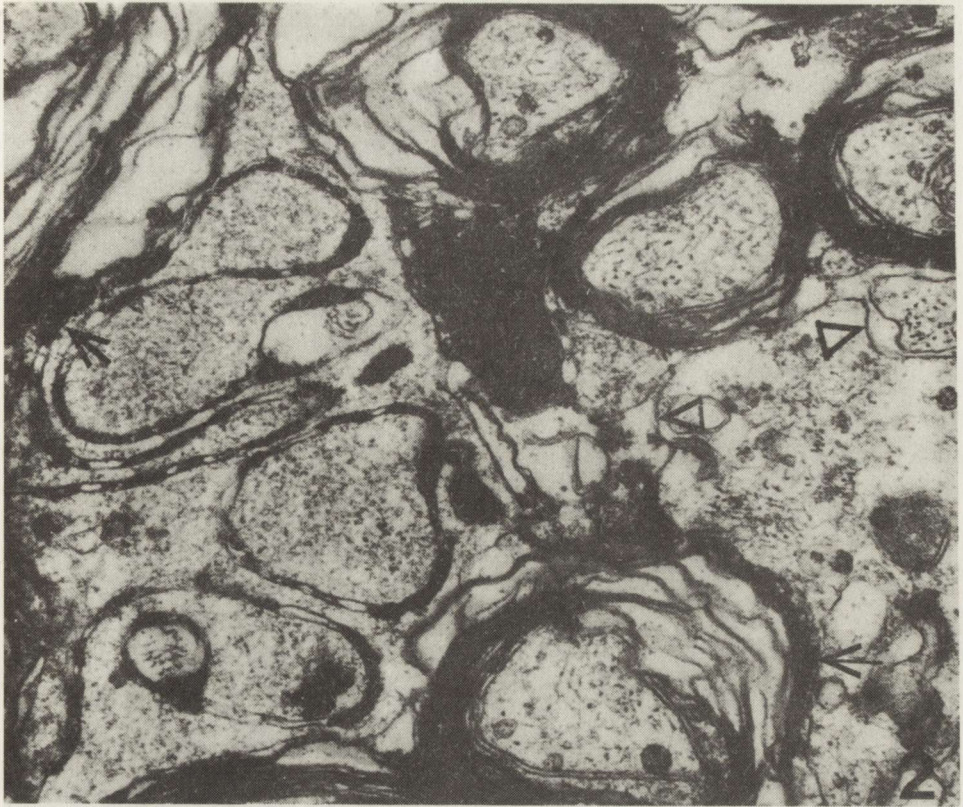


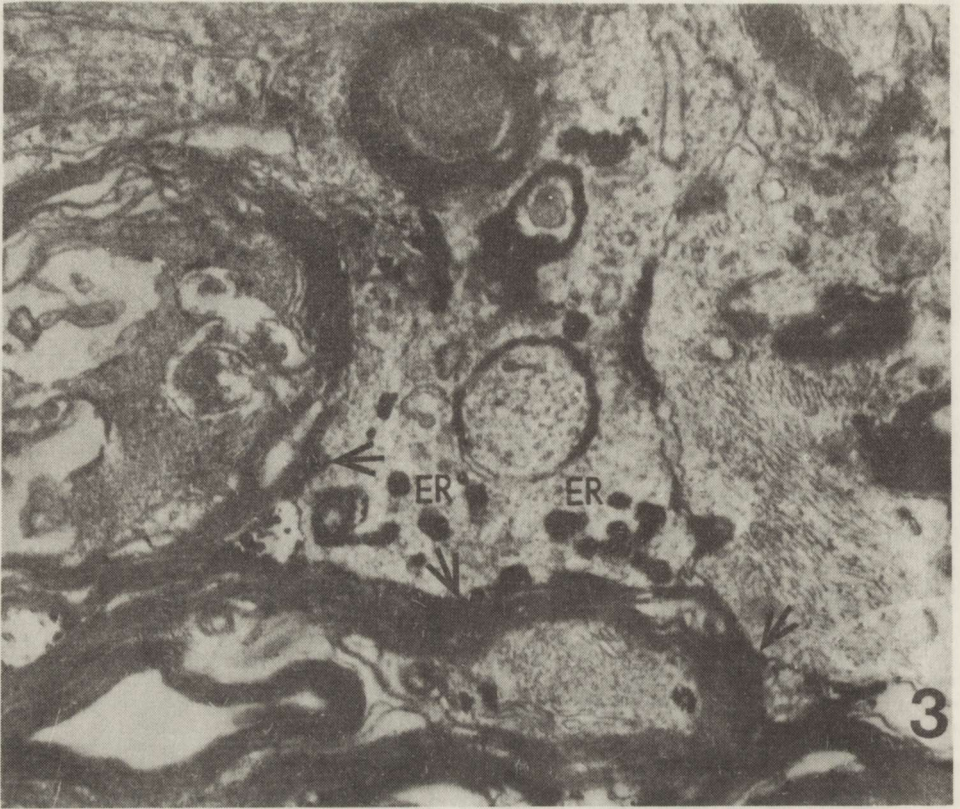
Fig. 2. Wallerian degeneration of the rat optic nerve, two days after surgery. 5'-NC activity. Complicated network of astrocytic processes approaching and, in some places closely apposed (arrows) to partially split myelin sheaths is clearly visible owing to presence of enzyme reaction product along plasma membranes.  $\times 14\ 500$

Ryc. 2. 5'-nukleotyduza w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego szczura w dwa dni po zabiegu. Skupienie wypustek astrocytarnych, leżących blisko lub niekiedy ściśle przylegających (strzałki) do częściowo rozszczepionych osłonek mielinowych jest wyraźnie widoczna dzięki obecności produktu reakcji enzymatycznej układającego się wzdłuż błon cytoplazmatycznych tych wypustek. Pow. 14 500  $\times$

The assays for 5'-nucleotidase (5'-NC: 5'-ribonucleoside phosphohydrolase – E.C. 3.1.3.5.) were performed after intracardiac gravity perfusion with buffered formaldehyde solution (Karlsson, Schultz 1965). For immunocytochemical studies, intracardiac perfusion with 2% paraformaldehyde in some instances supplemented with glutaraldehyde at final 0.2% concentration in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, was applied. After perfusion, the material was postfixed in the same fixative for 30 to 120 minutes.

#### Enzyme-cytochemical procedures:

The incubation for AcP-ase, TPP-ase and ATP-ase was performed on very small pieces of white matter, obtained by using a specially designed device (several razor blades attached to a handle). These sections were incubated for

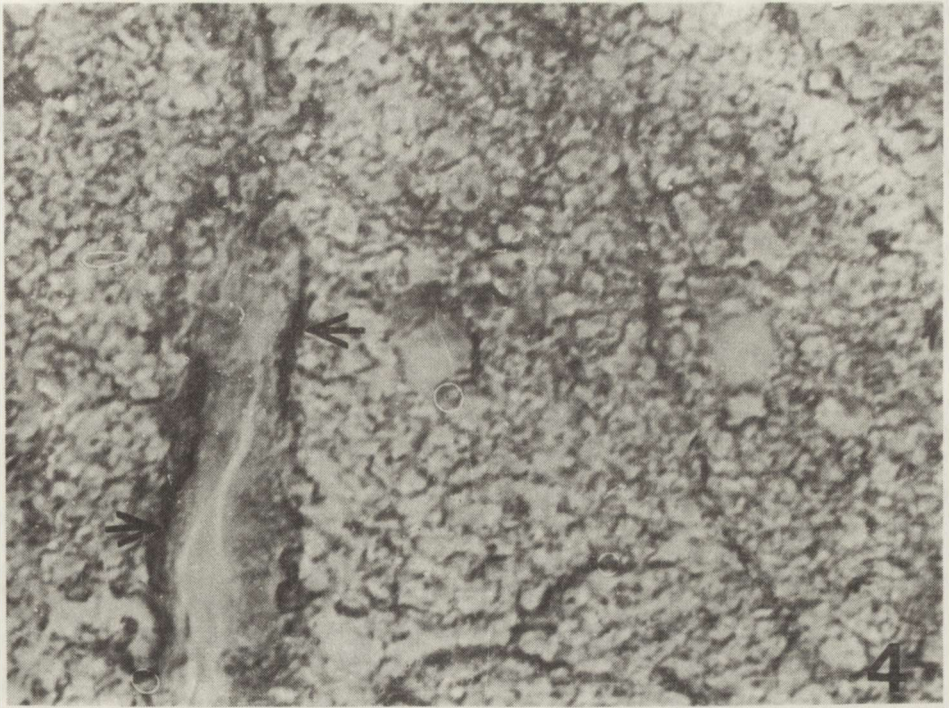


*Fig. 3.* 5'-NC activity in Wallerian degeneration of the rat optic nerve seven days after surgery. Enzyme reaction product is visible along astrocytic plasma membranes, especially in the regions where they are closely apposed to the outermost part of the myelin sheath (arrows). Within astrocyte cytoplasm multiple cisternae of endoplasmic reticulum filled with reaction product (ER).  $\times 9000$

*Ryc. 3.* Aktywność 5'-NC w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego szczura siedem dni po zabiegu. Produkt reakcji enzymatycznej układa się wzdłuż astrocytarnych błon cytoplazmatycznych, szczególnie w miejscach, gdzie przylegają one ściśle do najbardziej zewnętrznych części osłonek mielinowych (strzałki). Wewnątrz cytoplazmy astrocytu liczne zbiorniki siateczki śródplazmatycznej wypełnione produktem reakcji (ER). Pow. 9100  $\times$

AcP-ase in Gomori's medium (Gomori 1952), modified according to Miller and Palade (1964), for 25-30 minutes; for TPP-ase in the medium after Novikoff and Goldfischer (1961) for 40 minutes; and for ATP-ase in the medium after Wachstein and Meisel (1957) for 15-30 minutes. Control sections were incubated in media devoid of appropriate enzymic substrates.

For 5'-NC activity demonstration, 40  $\mu\text{m}$  Vibratome sections of optic nerves were incubated for 30 minutes in the medium described by Kreutzberg and Hussain (1982). Control sections were processed in medium, where the substrate 5'-AMP was omitted. After incubation, the sections were carefully washed in 0.1 M cold cacodylate buffer. Then, developed shortly (1 min) with



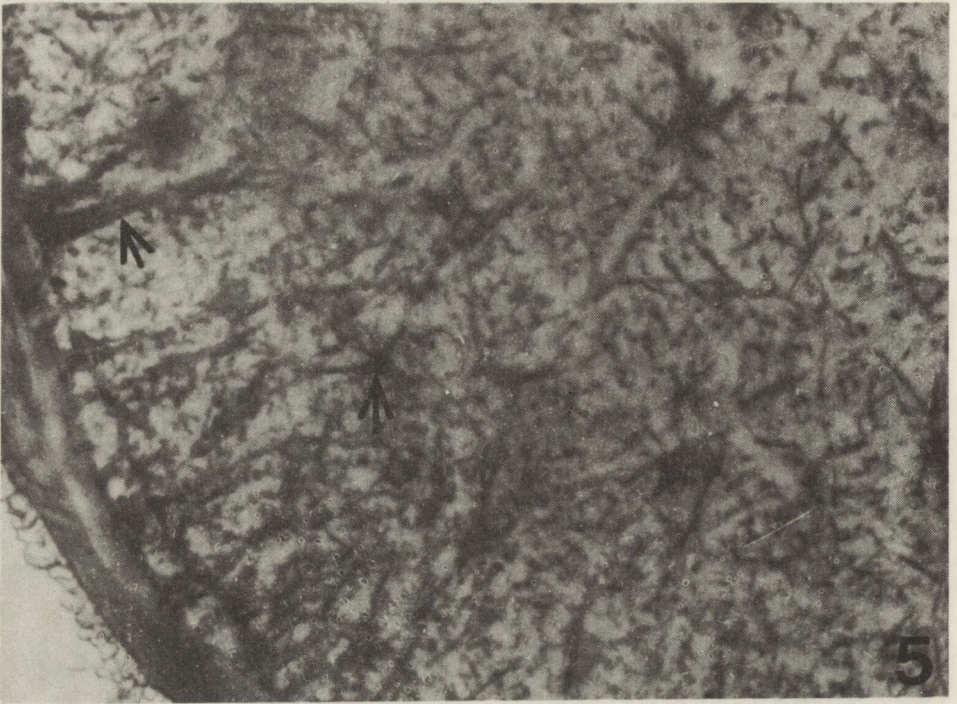
*Fig. 4.* Chronic relapsing EAE. First relapse. Spinal cord of guinea pig. GFAP in white matter adjacent to the lesion. Immunostaining reveals long astroglial processes winding amongst myelinated fibers. Highly reactive vascular end-feet indicated by arrows. Paraffin section.  $\times 250$

*Ryc. 4.* GFAP w rdzeniu kręgowym świnki morskiej w crEAE. Pierwszy nawrót. Istota biała w pobliżu strefy zmian. Produkt immunoreakcji uwidacznia długie wypustki astrogleju penetrujące przestrzenie pomiędzy poszczególnymi zmielinizowanymi włóknami osiowymi. Strzałki wskazują na znaczne nagromadzenie produktu reakcji w okołonaczyniowych nóżkach ssących. Skrawek parafinowy. Pow. 250  $\times$

6% ammonium sulphide, buffered at pH 6.5, and subsequently rinsed again in cold cacodylate buffer.

#### Immunocytochemical procedures:

The experiments in crEAE were exclusively performed on the material routinely embedded in paraffin. Seven-micrometer paraffin sections were immunostained after deparaffinization in a moist chamber according to the unlabeled antibody PAP method after Sternberger (1979). The sections were sequentially treated with: 1) 3% normal goat serum in 0.5 M phosphate saline buffer PBS, pH 7.6 for 30 min; 2) rabbit antiserum to human glial fibrillary acidic protein (GFAP — this primary antibody was kindly donated by Dr. K. Yen, Albert Einstein College of Medicine, New York) diluted 1:200 and 1:500 in PBS containing 1% normal goat serum for 60 min; 3) goat-antirabbit IgG diluted 1:20 in 0.5 M Tris-saline for 30 min; 4) rabbit PAP diluted 1:100 in PBS containing 1% normal goat serum for 30 min; 5) 0.01% hydrogen peroxide and



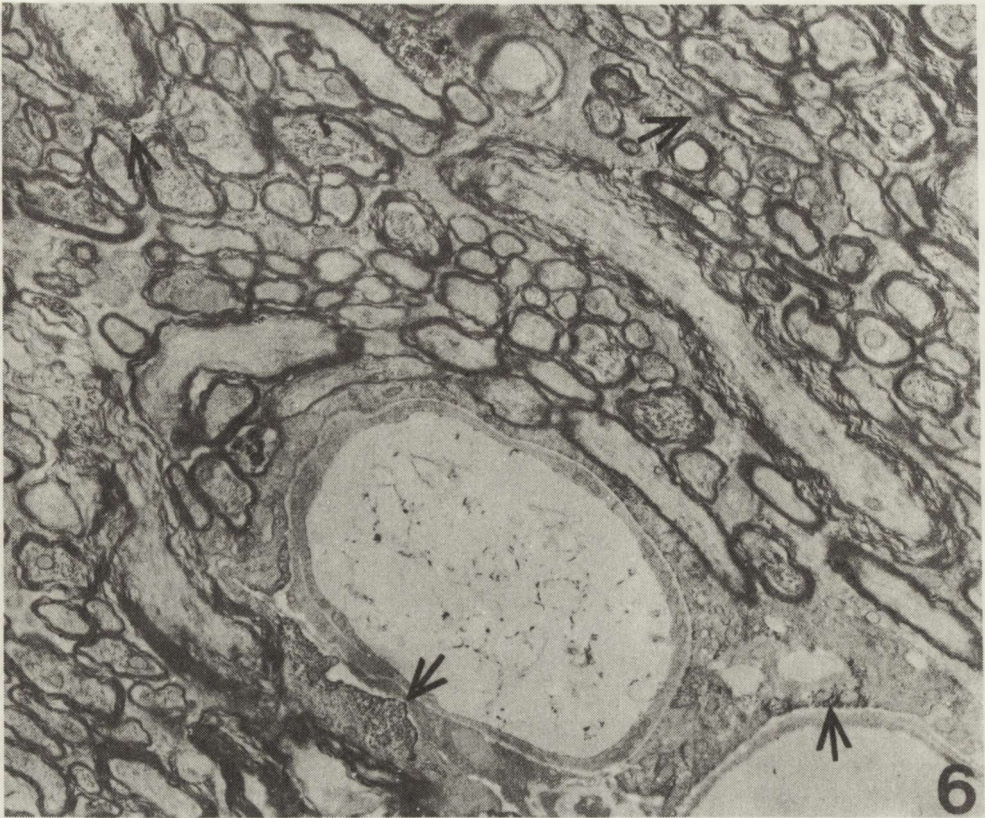
*Fig. 5.* GFAP in Wallerian degeneration of the rat optic nerve. Seven days after surgery. Immunoreaction product has appeared within fairly long, numerous astroglial processes throughout the entire section. In some places (arrows) its appreciable accumulation visualizes astroglial perikarya and wide processes. Vibratome section.  $\times 400$

*Ryc. 5.* GFAP w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego szczura 7 dni po zabiegu. Produkt reakcji widoczny w dość długich i bardzo licznych wypustkach astrocytarnych rozrzuconych w obrębie całego przekroju. Miejscami (strzałki) jego większe skupienia wyznaczają perykariony i pogrubiałe wypustki astrocytów. Skrawek krojony na Vibratomie. Pow.  $400 \times$

0.05% 3,3-diaminobenzidine hydrochloride (DAB) in 0.1 M Tris-saline buffer, pH 7.6, for 6 to 8 minutes. Careful washing with PBS was performed, when necessary, between individual steps.

The immunocytochemical studies of cWD in the rat optic nerve were exclusively performed on free-floating,  $50\mu\text{m}$  thick Vibratome sections, collected into PBS and kept overnight in 3% sheep nonimmune serum at  $4^{\circ}\text{C}$ . For immunostaining, the indirect antibody method was employed following the protocol described by Langley et al. (1980). Step 1 consists of 60-min incubation of sections at room temperature with primary antibodies polyclonal rabbit-anti GFAP primary antibody produced by DAKO, and polyclonal rabbit-anti NCAM (neuronal cell adhesion molecule) antibody (generous gift of Dr. O.K. Langley, Centre de Neurochimie, Strasbourg, France), diluted 1:100 and 1:400, respectively, with 1% nonimmune sheep serum in PBS. It was followed by 2 hours incubation with sheep anti-rabbit Fab conjugated with horse radish peroxidase (HRP) diluted 1:100 in PBS. In step 3, 0.01% hydrogen





*Fig. 6.* GFAP in normal optic nerve. Unstained ultrathin section. Faint immunoreactivity visible in astroglial end-feet as well as in slender processes separating groups of myelinated axons (arrows).  $\times 4200$

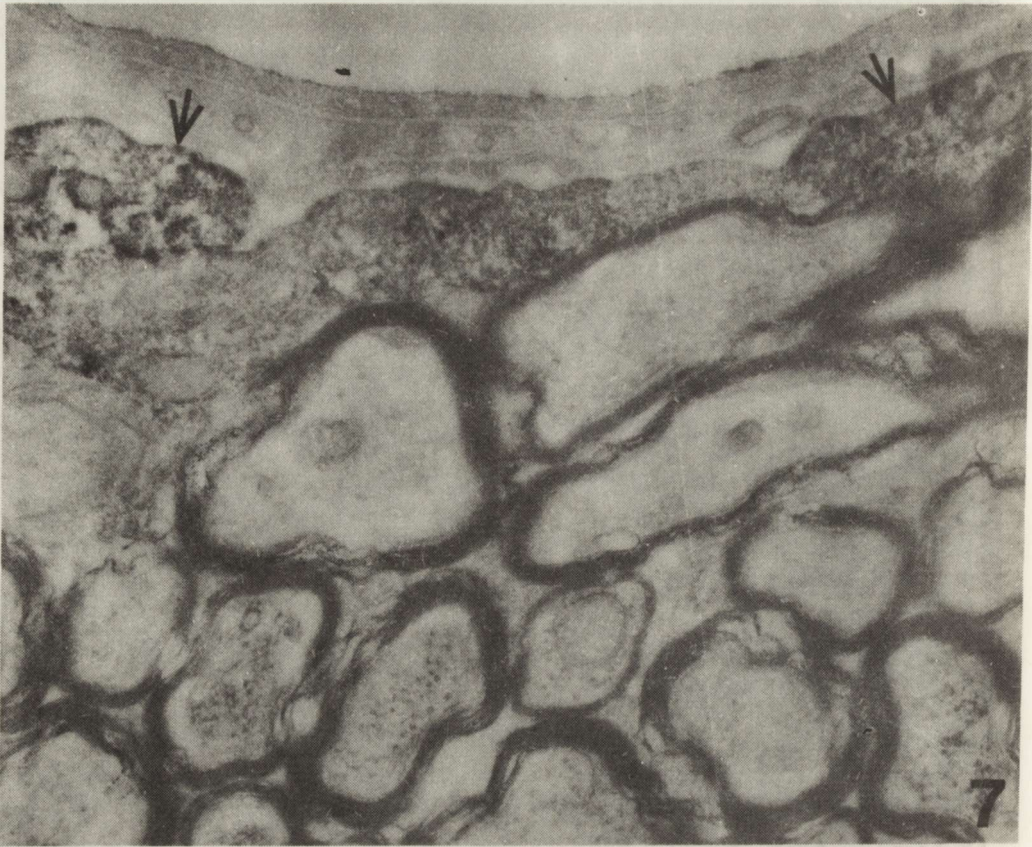
*Ryc. 6.* GFAP w kontrolnym nerwie wzrokowym. Skrawek ultracienki, nie dobarwiany. Niewielkie ilości produktu immunoreakcji widoczne są jedynie w nóżkach ssących astrocytów oraz w ich cienkich wypustkach rozdzielających pęczki zmielinizowanych włókien osiowych (strzałki)  
Pow. 4200  $\times$

peroxide and 0.05% DAB diluted in PBS were applied in darkness for 6-8 minutes. Every step was separated by excessive washing with PBS. Then, alternate sections were selected for light microscopic examination and electron microscopy procedures.

For controls, the specific primary antisera were replaced by normal (pre-immune) rabbit sera. In the case of crEAE studies, primary antiserum absorbed with an excess of antigen was also employed for control purposes.

#### Preparation of specimens for light microscopy:

Paraffin immunostained sections were immediately treated for 5 min with 2% buffered  $\text{OsO}_4$  and mounted in glycerol. Vibratome sections were mounted in Permount on glass slides without osmification. Both were viewed and photographed in a Zeiss microscope at primary magnifications of 40 to 600  $\times$ .

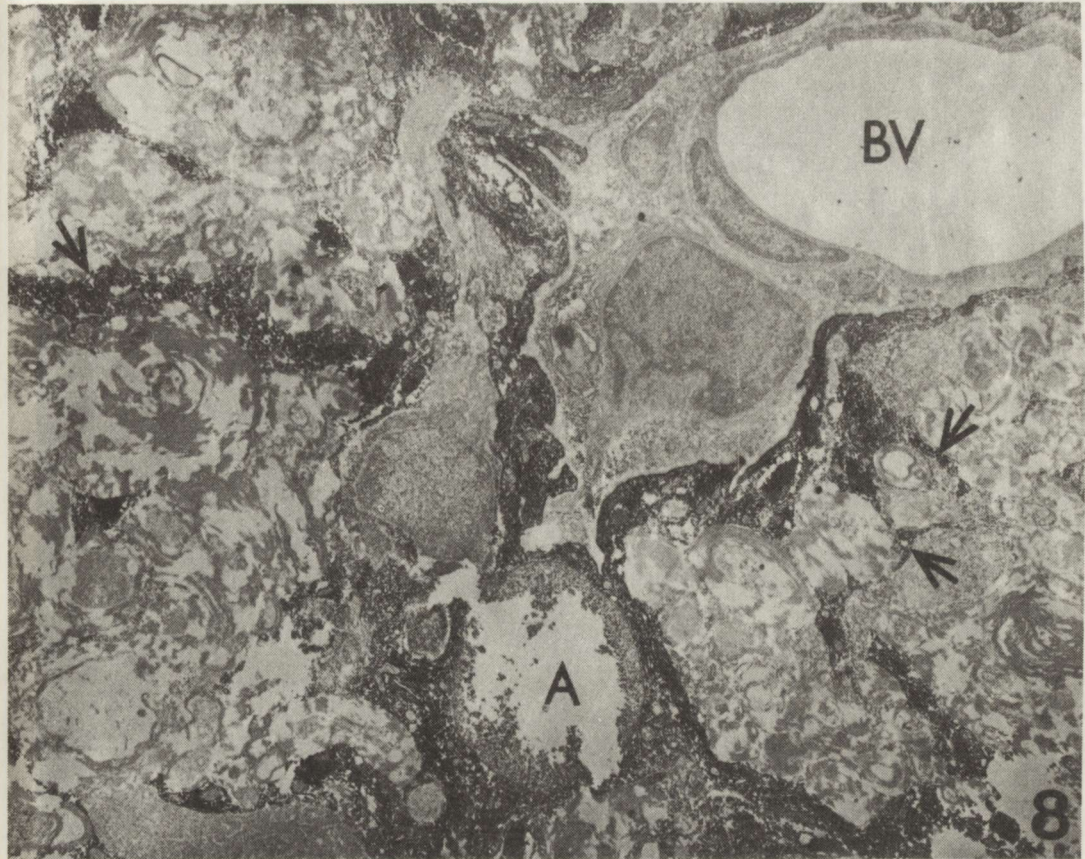


*Fig. 7.* Normal optic nerve, GFAP. Immunoreaction product is present only in astroglial end-feet (arrows) but is absent in cellular processes between myelinated axons, neither is unspecific staining of neurotubules seen.  $\times 14000$

*Ryc. 7.* Kontrolny nerw wzrokowy. Produkt immunoreakcji widoczny jedynie w okołonaczyniowych nóżkach ssących astrogleju (strzałki), nie występuje natomiast pomiędzy zmielinizowanymi włóknami, ani wewnątrz aksonu. Pow. 14000  $\times$

#### Preparation of material for electron microscopy:

All the sections subjected to enzymocytochemical as well as immunocytochemical procedures and designed for electron microscopic studies were postfixed for 1 hour in 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated routinely and embedded in resins (Epon, Araldite or Spurr). Ultrathin sections were cut in a Reichert ultramicrotome and photographed in a JEM 7A electron microscope. In the case of electron immunocytochemistry experiments, the counterstaining with lead and uranium salts was entirely omitted to avoid any interference with the immunoreaction product.



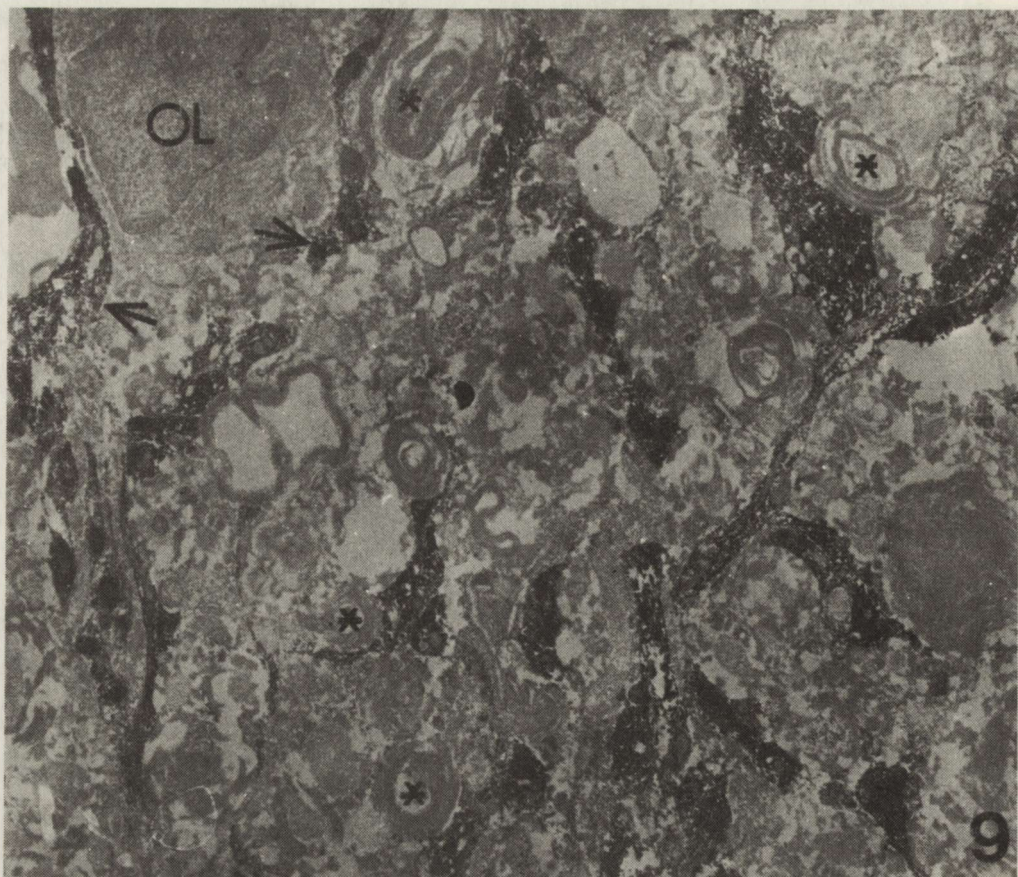
*Fig. 8.* GFAP in Wallerian degeneration of the rat optic nerve seven days after surgery. Immunoreaction product is confined to multiple astrocytic processes of different size and shape. Around blood vessels (BV) only astroglial end-feet are immunopositive. The other structures, as basement membrane, pericytes and endothelial cells reveal no immunoreactivity. Within white matter, GFAP-positive processes display tendency to separate and surround individual axons at various stages of disintegration (arrows). Astrocyte pericarium (A) filled with granular immunoreaction product.  $\times 4000$

*Ryc. 8.* GFAP w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego szczura 7 dni po zabiegu. Produkt immunoreakcji występuje w licznych wypustkach astrocytarnych różnego kształtu i wielkości. Wokół naczyń (BV) jego obecność wykazują tylko nóżki ssące astrocytów, natomiast inne struktury jak błona podstawna, perycyty i komórki śródbłonna nie wykazują immunoreaktywności. W istocie białej immunoreaktywne wypustki wydają się oddzielać i otaczać poszczególne włókna osiowe znajdujące się w różnych stadiach uszkodzenia (strzałki). Perykarion astrocytu (A) jest wypełniony ziarnistym produktem immunoreakcji. Pow. 4000  $\times$

## RESULTS

### Enzyme electron cytochemistry:

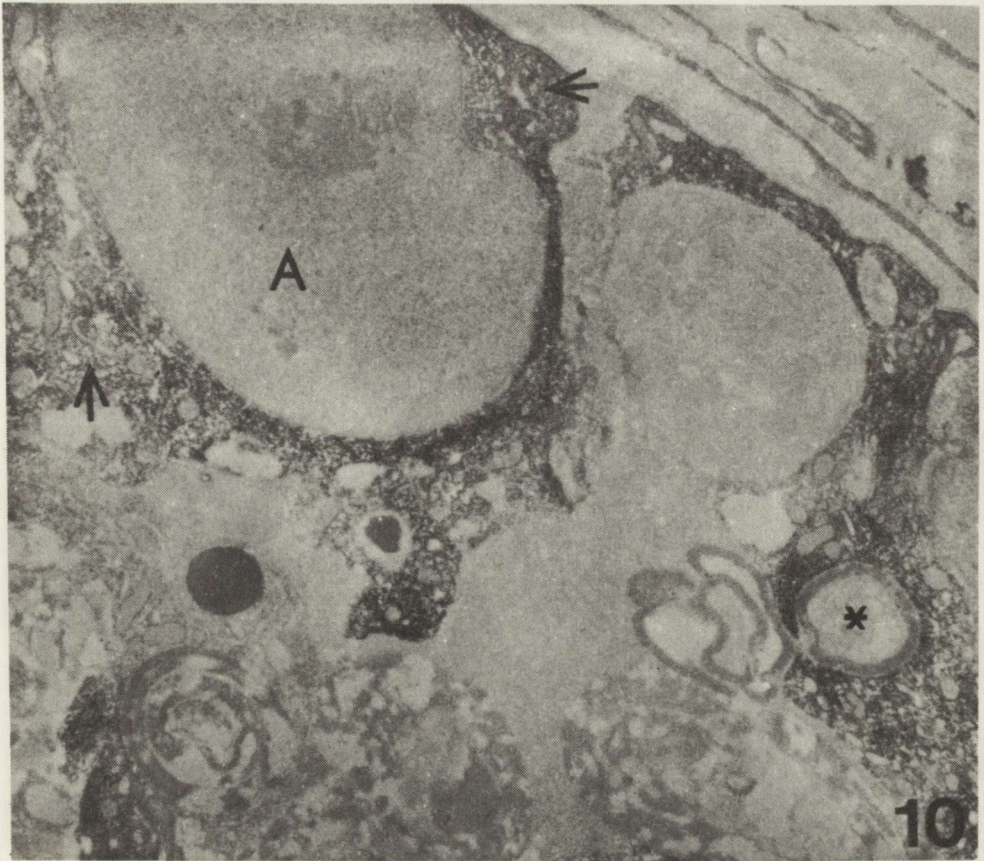
The localization of activities of several hydrolytic enzymes, namely TPP-ase, ATP-ase and AcP-ase was studied in astrocytes in early preparalytic and paralytic periods of "postpumping" myelopathy.



*Fig. 9.* Wallerian degeneration of the rat optic nerve. Eleven days after surgery. Numerous GFAP-positive processes separate individual axons and surround them (asterisks). Note two such processes (arrows) interposed between oligodendrocyte (OL) and degenerated myelinated axon.  $\times 3200$

*Ryc. 9.* Zwyródnienie Wallera w nerwie wzrokowym szczura. GFAP 11 dni po zabiegu. Liczne wypustki zawierające produkt immunoreakcji rozdzielają poszczególne włókna osiowe i otaczają je (gwiazdki). Dwie z takich wypustek (strzałki) oddziałają komórkę oligodendrogleju (OL) od uszkodzonych włókien osiowych. Pow. 3200  $\times$

In the early period of the experimental process, enhancement of TPP-ase activity within structures of the Golgi system was noted. The enzyme reaction product was seen not only within large flattened Golgi cisternae, but also within vacuolar and tubular structures connected with them. The structures were mostly localized within cells with abundant, dense cytoplasm, where scattered bundles of intermediate filaments were also observed. In this period only scarce amounts of ATP-ase reaction product were closely associated with perivascular astrocyte plasma membranes. However, in the late (paralytic) period abundant enzyme reaction product was not confined only to plasma membranes, but also to associated numerous micropinocytic vesicles (Fig. 1).



*Fig. 10.* GFAP in Wallerian degeneration of the rat optic nerve. Seven days after surgery. Subpially located astrocyte (A) with perikaryon completely filled with immunoreaction product. However, cytoplasmic organelles are clearly visible (arrows). The other astrocytic process completely engulf myelinated axon (asterisk).  $\times 4500$

*Ryc. 10.* GFAP w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego, 7 dni po zabiegu. Podoponowy astrocyt (A) z perykarionem wypełnionym produktem immunoreakcji, jednak zarysy organelli cytoplazmatycznych są wyraźnie widoczne (strzałki). W innej wypustce astrocytarnej całkowicie wpukłone zmielinizowane włókno osiowe (gwiazdka). Pow. 4500  $\times$

As far as AcP-ase activity was concerned, larger accumulations of enzyme reaction product were noted only in the late period within large lysosomal structures. These lysosomes appeared usually within reactive astroglial processes, characteristic by their dense cytoplasm, closely approaching myelin sheaths in earliest stages of disintegration. No extralysosomal localization of AcP-ase reaction product was noted.

Localization of 5'-nucleotidase activity was studied in the model of cWD of the rat optic nerve. In this part of the rat central nervous system (CNS) enzyme activity is known to be negligible. Therefore, in control tissue the enzyme reaction product was absent even from glial plasma membranes. However, as



*Fig. 11.* Normal optic nerve. NCAM. Immunoreaction product is dispersed within larger astrocytic processes, usually along their plasma membranes (arrows). Locally, some accumulations of electron-dense deposits are visible in the outer part of myelinated axons (arrowheads).  $\times 8000$   
*Ryc. 11.* Kontrolny nerw wzrokowy. NCAM. Produkt immunoreakcji jest rozproszony wewnątrz większych wypustek astrogleju, zazwyczaj wzdłuż błony komórkowej (strzałki). Niewielkie skupienia elektronooptycznie gęstego produktu reakcji widoczne również przy najbardziej zewnętrznych częściach osłonki mielinowej (główki strzałek). Pow. 8000  $\times$

early as the 2nd day of experiment black deposits of enzyme reaction product were accumulated along those fragments of astrocytic plasma membranes which came in close contact with not yet disrupted myelin sheaths (Fig. 2). The cell processes approaching myelin sheaths were clearly visible contrary to the other ones, distant from myelin, where only scarce plasmalemmal activity was seen (Fig. 2). The peak of astrocytes enzymatic activity seemed to appear on the 7th day of experiment, when the enzyme reaction product was heavily accumulated in almost every region of contact between astroglial processes and the degenerating myelin (Fig. 3). Moreover, the reaction product of this ectoenzyme was visible in this period within round and flattened cisternae of endoplasmic reticulum (Fig. 3) in astroglial cells. This enhancement of activity turned out to be temporary, as on the 14th day of experiment none of the

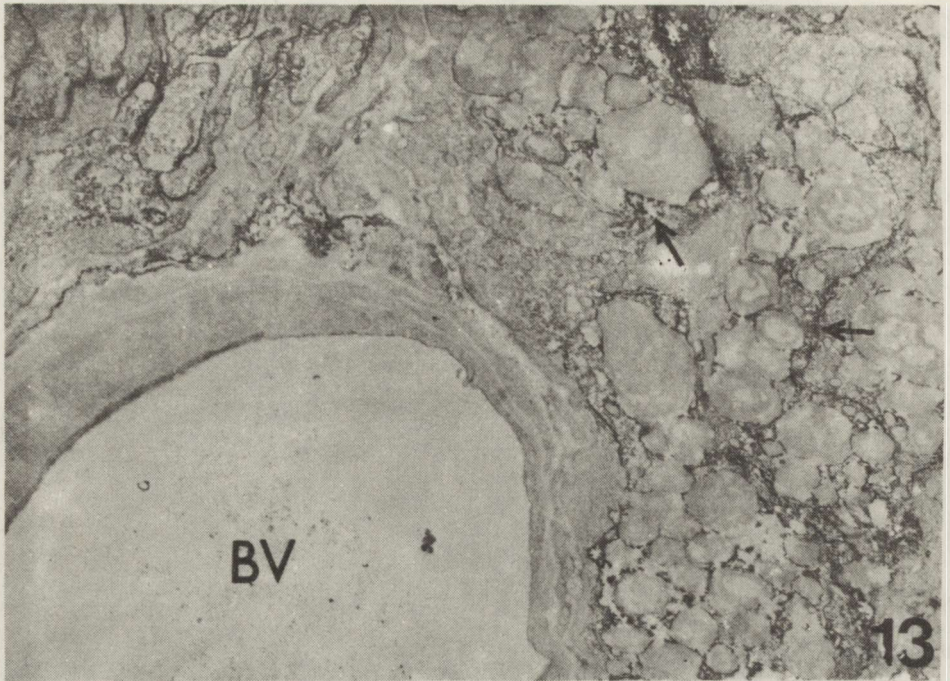


*Fig. 12.* NCAM in normal optic nerve. Linear deposits of immunoreaction product along plasma membranes of subpially located astrocytic processes (arrows). Only in a few places of contact between myelinated fibers (Ax) and astroglial processes the immunoreaction product is visible on the side of astroglial plasma membranes.  $\times 8000$

*Ryc. 12.* Kontrolny nerw wzrokowy. NCAM. Elektronooptycznie gęsty produkt immunoreakcji obrysowuje błony komórkowe wypustek astrocytów podoponowych (strzałki). Tylko w nielicznych strefach kontaktu zmielinizowanych włókien osiowych (Ax) i wypustek astrogleju produkt immunoreakcji widoczny jest po stronie astroglejowej błony cytoplazmatycznej. Pow. 8000  $\times$

neuroglial cells, even those with reactive features, displayed 5'-NC activity associated with any of their structures.

The initial GFAP immunocytochemical study was performed on apparently normal white matter adjacent to the crEAE lesion. With the employed method, only very faint immunostaining was observed in normal control white matter, and it was connected with relatively short astrocytic processes dispersed throughout the groups of axons. The immunostaining pattern within white matter taken close or immediately adjacent to the lesion was, however, entirely different. Fairly thick immunopositive processes extended from cell bodies, which in some instances also displayed the immunoreaction product in the perinuclear cytoplasm. In some places the processes tended to surround



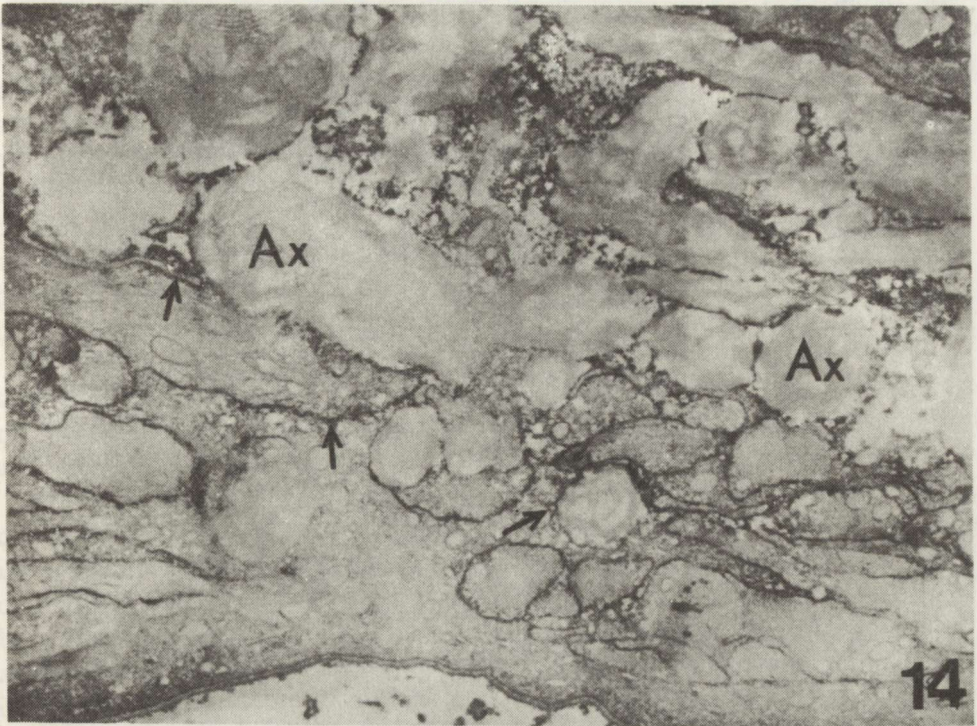
*Fig. 13.* NCAM in Wallerian degeneration of the rat optic nerve. Seven days after surgery. Considerable concentrations of immunoreaction product in astroglial processes penetrating between degenerated axons, especially in points of contact between their plasma membranes and outermost part of myelin (arrows). No such deposits within structures of blood vessel (BV).  $\times 7000$

*Ryc. 13.* NCAM w zwyrodnieniu Wallera nerwu wzrokowego w 7 dni po zabiegu. Znaczne nagromadzenie produktu immunoreakcji widoczne w wypustkach astrogleju przebiegających między wyrodniającymi włóknami osiowymi. Jest ono szczególnie widoczne w miejscach kontaktu ich błon plazmatycznych z najbardziej zewnętrzną częścią osłonek mielinowych (strzałki). Struktury naczynia krwionośnego (BV) wolne od produktu immunoreakcji. Pow. 7000  $\times$

individual axons. Some of them were fairly long and terminated as vascular end-feet, displaying a great amount of accumulated immunoreaction product (Fig. 4).

Further GFAP immunocytochemical studies were performed on the rat optic nerve and optic chiasm, where Wallerian degeneration was inflicted by unilateral removal of the eye bulb. As early as 7 days after surgery considerable changes in the immunostaining pattern were noted. In normal control white matter astrocytic processes were revealed by this technique as thin, short structures of preferentially subpial location. In injured white matter, on the contrary, astroglial processes formed a dense network of long curvilinear, fairly thick structures (Fig. 5). Very often local accumulations of immunoreaction product could be observed. The structures of irregular shape might be interpreted as immunopositive end-feet, perikarya or hypertrophied processes. The structures were dispersed throughout all the lesioned tissue with no preference to its marginal part (Fig. 5).





*Fig. 14.* NCAM in Wallerian degeneration of the rat optic nerve. Seven days after operation. All the degenerating axons (Ax) display immunoreactivity along their entire circumference. Numerous astroglial processes penetrating between them display linear deposits of immunoreaction product especially along the plasma membranes contacting the outermost part of myelin sheaths (arrows).  
× 6000

*Ryc. 14.* NCAM. Zwyródnienie Wallera nerwu wzrokowego w 7 dni po zabiegu. Wszystkie wyrodniejące włókna osiowe (Ax) wykazują obecność produktu immunoreakcji wokół całego swego zewnętrznego obwodu. Liczne wypustki astrogleju rozdzielające poszczególne aksony wykazują obecność produktu immunoreakcji, głównie w błonach plazmatycznych, które kontaktują się z najbardziej zewnętrzną częścią osłonek mielinowych (strzałki). Pow. 6000 ×

Examination of the above presented material at the ultrastructural level enabled a more detailed description of the astroglial reaction at the early stage of cWD. Within normal control optic nerve, localization of the immunoreaction product was limited to some larger astrocytic processes, especially those which formed vascular end-feets (Figs 6, 7). Also, some processes which separated groups of axons displayed minute amounts of immunoreaction product. This was in striking contrast with the immunostaining pattern on the 7th day after enucleation, when large, irregular, highly immunopositive processes surrounded partially or completely myelin sheaths in initial stages of disintegration (Fig. 8). The immunoreaction product had generally a granular appearance and was mostly arranged in linear fashion not only in processes but sometimes also in astroglial perikarya (Fig. 8). It was, however, never observed within the cytoplasm of cells furnishing the vascular wall (Fig. 8) or cells with

oligodendroglial characteristics (Fig. 9). As far as nonspecific staining of neurofilaments is concerned, higher magnifications of control, uninjured white matter revealed no dark deposits within myelinated axons, which was also true of myelin ovoids in the injured white matter (Figs 7, 8 and 9).

A more detailed analysis of immunostaining pattern within cytoplasm of typically perivascularly or subpially located reactive astrocytes revealed that there was no diffusion of immunoreaction product into channels of endoplasmic reticulum as well as throughout the plasma or nuclear membranes (Figs 8, 10). Only very rarely could the electron dense agglomerations of immunoreaction product be seen within the cytoplasm.

The general pattern of immunoreaction in the injured optic nerve gave the impression that numerous immunopositive processes formed curvilinear profiles adjacent to degenerated myelinated axons (Figs 8, 9). Almost all of these processes displayed various modes of contact with myelin ovoids. The most common appeared to be partial surrounding of degenerated myelin by the processes, but sometimes slender digitiform processes stretched out from the main body of the larger process to form an irregular pattern of contact. In many cases degenerated myelin ovoids seemed to be completely engulfed in immunopositive processes (Figs 8, 9, 10).

In immunocytochemical experiments with NCAM, the immunoreaction product was not discernible in Vibratome sections of optic nerves at the light microscopic level. This was at least partially explained by the immunostaining pattern revealed by electron microscopy, where the immunoreaction product did not form large solid deposits but was mainly shown to delineate astroglial plasma membranes. In the normal, uninjured optic nerve only part of astroglial processes displayed its presence. Besides, some scattered minute accumulations of electron-dense deposits were visible in the outer part of myelin sheaths as well as within the cytoplasm of astroglial processes (Figs 11, 12). In contrast, in an injured optic nerve practically all astroglial processes were strongly delineated by the immunoreaction product along their plasma membranes. This pertains in particular to the places of junction between astroglial processes and the outer part of degenerating myelin sheaths. Owing to this, almost every myelin ovoid was circumscribed by a linear accumulation of the immunoreaction product. Moreover, the accumulation of fine granular immunoreaction product within the cytoplasm of astroglial processes seemed to be more marked as compared to normal conditions (Figs 13, 14). The immunoreaction product was never observed within myelin ovoids or in structures of the vessel wall (Fig. 13).

#### DISCUSSION

The ultrastructural morphology of reactive astrocytes, which appeared in the area of lesion in "postpumping" myelopathy as well as in cWD, is described in detail in the first part of this publication (Goncerzewicz 1987). Briefly, these

are cells with copious cytoplasm, abounding in polyribosomes, well developed structures of endoplasmic reticulum and Golgi system and also numerous dense bodies. The most characteristic phenomenon concerns the appearance of bundles of intermediate filaments, not only in broad processes, but also within perinuclear cytoplasm. This description matched also perfectly the astroglial morphology in the area around demyelination plaques (mainly in perivascular position) in crEAE, presented by Raine et al. (1974). In this experimental model, reactive gliosis is one of the essential features of the pathological process, besides chronic perivenous inflammation and selective demyelination (Lassmann et al. 1980).

The obtained cytochemical data on distribution of hydrolytic enzymes in astrocytes present within the injured white matter provided, in addition to morphological data, a more complete pattern of metabolic activation of astrocytes.

A similar pattern of increased activity of various hydrolases in astroglia was demonstrated previously by Goncerzewicz (1975) and by Wender et al. (1975) in "postpumping" myelopathy. The presence of large lysosomal structures containing membranous, myelin-like material, highly positive for AcP-ase has been demonstrated, as well as early, focal increase of TPP-ase within the astroglial cytoplasm. Ultrastructural and histoenzymatic studies on hydrolases in cWD (Wender et al. 1981) have also shown astroglia as the main cellular component of injured rabbit optic nerve, displaying increased activity of AcP-ase and TPP-ase. In particular, the presence of the enzyme reaction product has been revealed not only in lysosomes and Golgi cisternae, respectively, but also within channels of endoplasmic reticulum. The structures displaying enzymatic activity have frequently been observed within astroglial processes in close vicinity of degenerating myelin.

As far as enhancement of ATP-ase activity is concerned, we were able to gather only general histoenzymatical data from the studies of cWD in the optic nerve of adult (Wender et al. 1981) and developing (Wender et al. 1980) rabbits. Both studies have shown a relatively early rise of enzymatic activity in reactive cellular elements. Lantos (1974), demonstrating the simultaneous appearance of the ATP-ase reaction product in cell membranes and (micro)pinocytic vesicles, stated that the rise in activity of the enzyme indicates stimulation of membrane-bound cellular transport.

Although in pathological conditions the exact role of the individual enzymes under study has not yet been attempted, there is agreement that the augmentation of the amount of the enzyme reaction product as well as changes in its distribution are directly related to cellular reactive changes (Lantos 1974). Moreover, they give evidence of a progressive stage of the cell alterations (Schiffer 1973) and/or constitute a characteristic feature of cellular hypertrophy (Wender et al. 1979). The accumulation of hydrolases in reactive astroglia may influence the integrity of the neighbouring structures within the injured white matter. Hirsch (1976) expressed this straight forwardly:

"Hydrolytic enzymes associated with the lysosomes, whose function in the cell is the digestion of endocytosed macromolecules, must be involved in the myelin breakdown sooner or later". More recently, Allen (1983) affirmed that the early lysosomal response may be target-directed. It may account for the destruction of the specific antigen not only in the binding site, but also in the immediate vicinity and, finally, may constitute an important mechanism of myelin destruction in such conditions as EAE.

One of the hydrolases included in this study, 5'-NC deserves special attention. In the cWD model a very early, although transient, increase of enzyme activity is observed. The rise of astroglial activity matches exactly the time when the cells exhibit morphological signs of increased metabolic activity and their processes are approaching the myelin sheaths which do not yet begin to break down (Goncerzewicz 1982; 1987). In fact, the accumulation of the enzyme reaction product has been observed mostly in the region of close apposition between the outermost part of the myelin sheath and astroglial processes, penetrating between not yet disrupted myelinated axons. Simultaneously, the enzyme reaction product appears within the intracellular compartments of hypertrophied astrocytes. Such localization is quite unusual for the ectoenzyme and, therefore, must be interpreted carefully. Only recently, morphological proof for localization of 5'-NC in intracellular membraneous compartments has been supplied by Kreutzberg and Hussain (1984). It should be mentioned, however, that even earlier Widnell et al. (1982), by means of biochemical assays, detected "latent" activity of 5'-NC in cultured fibroblasts, which was present in cytoplasmic vesicles, vacuoles and in the Golgi complex. On the grounds of their study, the conception of membrane recycling between the cell surface and the cytoplasm, advanced by Steiman et al. (1976), seems to be confirmed.

Applying this view to the simultaneous expression of 5'-NC activity in plasma membranes as well as in intracytoplasmic membraneous compartments of reactive astroglia in the earliest stages of cWD demonstrated earlier, we may assume that this phenomenon is not only an unspecific exponent of the reactive state of these cells. It may be also interpreted as reflecting an increased need for membrane modification in hypertrophic astrocytes forming new intercellular connections within the injured white matter. It is known that the product of hydrolytic action of this ectoenzyme — adenosine, serves as an important intercellular communication molecule (Amano et al. 1983), and that expression of its activity may be related to the degree of cell-to-cell contact (Widnell et al. 1982). Therefore, it is proposed that close astroglial-myelin connections, as revealed by means of 5'-NC enzyme cytochemistry in early stages of the cWD, may reflect active participation of astrocytes in the process of myelin disintegration.

Formation of these astroglial-myelin structural connection within injured white matter has turned out to be most clearly revealed by means of immunocytochemistry of two glial antigens, GFAP and NCAM. The former is

generally recognised as the major protein of glial filaments, immunologically distinct from those of other intermediate filaments and neurotubules (Eng, DeArmond 1983). The other subclass of macroglia – oligodendrocytes – do not possess intermediate filaments arranged in bundles and do not contain GFAP (Eng, 1980; Eng, DeArmond 1983). Much less is known about NCAM, which is employed in immunocytochemical studies since the early eighties, and is mostly applied in studies on organotypic cultures. According to Gennarini et al. (1986), NCAM's are, in fact, a group of cell surface glycoproteins, involved in formation of cell-to-cell bonds, particularly those between neural cells. As they exist in several molecular forms, some may be expressed by cells of astroglial type.

Immunocytochemical staining has become a powerful tool in pathological research, as it exhibits a remarkable specificity of immune reactions associated with high topographical resolution of light or electron microscopy (Pietrusz et al. 1980). However, immunoperoxidase techniques employed in electron microscopy may suffer from diffusion artifacts – a dense precipitation of DAB reaction product may obscure subcellular structures (Eng, DeArmond 1983). This has not been the case in this study, as most of the cytoplasmic organelles of reactive astrocytes have been clearly visible. Immunostaining has been confined only to this type of cells both in GFAP and NCAM assays. No appearance of immune reaction product has been noted within other elements of nervous tissue. Some doubts may arise because of the presence of nonlinear homogeneous staining for GFAP in some astrocytes. However, using the technique employed in this study (two-step, preembedding immunoperoxidase method) some authors (Schachner et al. 1977; Eng, Bigbee 1978) have obtained an identical appearance of gliofilaments. Moreover, Eng (1980) reported that positive immunostaining for GFAP in astroglia is both filamentous and amorphous at the ultrastructural level.

Immunocytochemistry of GFAP, as revealed by the electron micrograph presented here, has clearly shown a vivid astroglial reaction of hypertrophic type. Indeed, both perikarya of the cells as well as broad processes emerging into the parenchyma display considerable amounts of immunoreaction product. It is known that the distinct increase in immunostaining for GFAP is indicative of the reactive state of astrocytes in various pathological conditions (Eng 1980; Ulrich et al. 1983; Munoz-Garcia, Ludwin 1985). In this study of the early period of cWD, low-power electron micrographs have enabled to visualise yet another important aspect of astroglial reactive changes, i.e. the presence of multiple immunopositive processes, which become apposed over the not yet disrupted axons, embrace them and even engulf them completely. The normal histological pattern of white matter, where oligodendroglial processes are apposed to the myelin sheath and astroglial ones separate groups of axons, is completely altered in this pathological condition. Instead, processes of hypertrophied astrocytes separate individual axons and seem to form close structural connections with the outermost part of myelin sheaths. A similar

phenomenon has been described by Ulrich et al. (1983) in jimpy mutant mice where GFAP staining disclosed astrocytic gliosis in excess over that observed in normal littermates. This is in agreement with earlier electron microscopy studies of Meier and Bischoff (1974), which revealed astrocytic processes surrounding axons in this model of demyelination.

Some additional support for observations of the early formation of astroglial-myelin connections may be also obtained from immunocytochemical patterns of NCAM within the injured white matter. It has been demonstrated that in the early period of cWD the regions of close apposition between digitiform astroglial processes and the outermost part of myelin sheaths become strongly accentuated by the accumulation of the immunoreaction product. Although no report is available on NCAM distribution in the pathology of the central nervous system *in vivo*, a study of altered expression of NCAM induced by peripheral nerve injury has recently been published by Daniloff et al. (1986). The authors found that alterations in morphology result in dramatic changes of NCAM expression in the injured region. In turn, Gennarini et al. (1986) conclude their developmental studies on NCAM expression by the statement: "Changes of NCAM expression have, in part, been correlated with adhesion properties of the cell". Therefore, it seems reasonable to assume that the observed accumulation of the immunoreaction product at the site of contact between astroglial processes and myelin sheaths is related to the formation of a novel type of cell-to-cell interactions within the injured white matter.

In the first part of this publication (Goncerzewicz 1987) dealing with astroglial morphological changes within injured white matter, the activation of these cells preceding discernible signs of myelin injury is shown and some evidence of formation of a close structural relationship between astroglia and not yet disintegrated myelin is established. In present study, these phenomena were directly visualized by means of highly specific and reliable techniques of enzyme cytochemistry and immunocytochemistry. The presence of subcellular structures displaying the activity of various hydrolases may be observed within reactive astrocytes, especially within their processes located in close vicinity to the not yet disintegrated myelin. The subcellular localization of one of these hydrolases (5'-NC) was highly suggestive as a morphological proof of the plasma membrane modification of astroglial processes which came into close contact with myelin sheaths. Moreover, immunocytochemistry of astroglial specific antigens has revealed accumulation of the immunoreaction product at the site of contact between reactive astroglial processes and the outermost part of myelin sheaths, what seems to be indicative of an acquired ability of these processes to form a novel type of intercellular connections within the injured white matter. It is, therefore, concluded that in the presented models of experimental white matter injury myelin disintegration is preceded by astroglial reactive changes, and that these macroglial cells, by formation of structural connections with not yet disintegrated myelin, actively participate in the sequence of events leading to myelin damage.

## ROLA ASTROGLEJU W PROCESACH CHOROBOWYCH PRZEBIEGAJĄCYCH Z RÓZPADEM MIELINY.

### II. CYTOCHEMIA ENZYMÓW I IMMUNOCYTOCHEMIA ASTROGLEJU W DOŚWIADCZALNYM USZKODZENIU ISTOTY BIAŁEJ

#### Streszczenie

Metodami cytochemii enzymów oraz immunocytochemii badano morfologię komórek astrogleju w doświadczalnym uszkodzeniu istoty białej, wywołanym różnorodnymi procesami. Szczególną uwagę zwrócono na zmiany rozmieszczenia enzymów hydrolitycznych oraz swoistych antygenów w komórkach reaktywnych astrocytów występujących w strefie zmian podczas wczesnych stadiów rozpadu mieliny. Wykazano wzrost aktywności wszystkich badanych hydrolaz w obrębie cytoplazmy astrocytów, a ich uwidocznienie w licznych strukturach podkomórkowych uznano za znamienne dla wzrostu ich aktywności metabolicznej. Analiza rozmieszczenia produktu reakcji 5'-nukleotydu (5'-NC) w strukturach błoniastych odczynowych astrocytów pozwoliła wysunąć przypuszczenie, że jedną z cech charakterystycznych odczynu astrocytarnego w uszkodzonej tkance jest modyfikacja błony cytoplazmatycznej, pozwalająca wypustkom astrocytarnym na penetrację przestrzeni między zmielinizowanymi włóknami osiowymi i tworzenie powiązań strukturalnych z zaczynającą się rozpadać osłonką mielinową. Uwidocznienie tych powiązań, jak również dowody na modyfikację ekspresji antygenowej komórek reaktywnego astrogleju uzyskano, dzięki badaniom immunocytochemicznym kwaśnego białka włókienek glejowych (GFAP) oraz cząsteczki warunkującej przyleganie (adhezję) komórek neuronalnych (NCAM), na poziomie ultrastrukturalnym.

Na podstawie przytoczonych danych wyciągnięto wniosek, że wczesna, wyprzedzająca dostrzegalne oznaki rozpadu mieliny, aktywacja metaboliczna astrogleju oraz tworzenie przez te komórki strukturalnych powiązań z zaczynającymi się rozpadać osłonkami mielinowymi, może przemawiać za aktywnym udziałem astrocytów w łańcuchu procesów doprowadzających do uszkodzenia mieliny w stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego.

## РОЛЬ АСТОГЛИИ В БОЛЕЗНЕННЫХ ПРОЦЕССАХ, ПРОТЕКАЮЩИХ С РАСПАДОМ МИЕЛИНЫ

### II. ЦИТОХИМИЯ ЭНЗИМОВ И ИММУНОЦИТОХИМИЯ АСТРОГЛИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА

#### Резюме

Морфология астроцитов в экспериментальном повреждении белого вещества, вызванном различными процессами, исследовалась методом цитохимии энзимов и иммуноцитохимически. Особое внимание было обращено на изменения в размещении гидролитических энзимов и специфических антигенов в реактивных астроцитах, находящихся в очаге изменений в ранних стадиях распада миелины. Констатировано увеличение активности всех исследованных гидролаз в цитоплазме астроцитов. Обнаружение гидролаз во множественных субклеточных структурах признано характерной чертой увеличения их метаболической активности. Анализ размещения продукта реакции 5'-нуклеотидазы (5'-NC) в мембранных структурах реактивных астроцитов допустил предположение, что одной из характерных черт астроцитарной реакции в поврежденной ткани является модификация цитоплазматической мембраны, позволяющая астроцитарным отросткам пенетрировать пространство между миелинизированными нервными волокнами и образовать структурные соединения с распадающейся миелиновой оболочкой. Благодаря иммуноцитохимическим исследованиям кислого белка глянчатых фибрилл (GFAP) и частицы обуславливающей адгезию нервных

клеток (NCAM) обнаружено эти структурные сношения, а также доказано модификацию выражения антигена реактивных астроцитов.

На основе приведенных данных сделано вывод, что ранняя, опережающая видимые признаки распада миелины, метаболическая активация астроглии, создающей структурные соединения с распадающимися миелиновыми оболочками, может свидетельствовать об активном участии астроцитов в процессах, приводящих к повреждению миелины.

#### REFERENCES

1. Allen I. V.: Hydrolytic enzymes in multiple sclerosis. In: *Progress in Neuropathology*, vol. 5. Ed. H. M. Zimmerman, Raven Press, New York, 1983, pp. 1–17.
2. Amano S., Kreutzberg G. W., Reddington M.: 5'-nucleotidase activity in human astrocytomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983, 59, 145–149.
3. Bunge R. P., Bunge M. B., Ris H.: Electron microscopic study of an experimentally induced lesion in adult cat spinal cord. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 7, 685–696.
4. Daniloff J. K., Levi G., Grumet M., Rieger F., Edelman G. M.: Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J. Cell Biol.*, 1986, 103, 929–945.
5. Eng L. F.: The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In: *Proteins of the nervous system*, second edition. Eds R. A. Branshaw, D. M. Schneider, Raven Press, New York, 1980, pp. 85–117.
6. Eng L. F., Bigbee J. W.: Immunohistochemistry of nervous system-specific antigens. In: *Advances in Neurochemistry*, vol. 3. Eds B. W. Agranoff, M. H. Aprosion, Plenum Press, New York, 1978, pp. 43–98.
7. Eng L. F., DeArmond S. J.: Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein. In: *Progress in Neuropathology*, vol. 5. Ed. H. M. Zimmerman, Raven Press, New York, 1983, pp. 19–39.
8. Gennarini G., Hirsch M.-R., He H.-T., Hirn M., Finne J., Goridis C.: Differential expression of mouse neural cell-adhesion molecule (N-CAM) mRNA species during brain development and in neural cell lines. *J. Neurosci.*, 1986, 6, 1983–1990.
9. Gomori G.: *Microscopic histochemistry. Principles and practice*. Univ. Chicago Press, Chicago, 1952, pp. 182–184.
10. Goncerzewicz A.: Glial reaction in myelopathy induced by cerebrospinal fluid exchange. In: *Proc. VIIth Internat. Congress Neuropathol.* Eds St. Környey, St. Tariska, G. Gosztonyi, Excerpta Medica, Amsterdam, Akademiai Kiado, Budapest, 1975, pp. 651–654.
11. Goncerzewicz A.: Electron microscopic study of astrocytic reaction in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 47–60.
12. Goncerzewicz A.: The role of astroglia in the pathological processes characterized by myelin disintegration. I. Morphology of astroglia in experimental injury of white matter. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 369–388.
13. Hirsch H. E.: The role of acid hydrolases in demyelination. *Neurology*, 1976, 26, 25–27.
14. Karlsson U., Schultz R. L.: Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, 12, 160–185.
15. Karnovsky M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 137A–138A.
16. Kreutzberg G. W., Hussain S. T.: Cytochemical heterogeneity of the glial plasma membrane: 5'-nucleotidase in retinal Müller cells. *J. Neurocytol.*, 1982, 11, 53–64.
17. Kreutzberg G. W., Hussain S. T.: Cytochemical localisation of 5'-nucleotidase activity in retinal photoreceptor cells. *Neurosci.*, 1984, 11, 857–866.
18. Langley O. K., Ghandour M. S., Vincendon G., Gombos G.: Carbonic anhydrase: an ultrastructural study in rat cerebellum. *Histochem. J.*, 1980, 12, 473–483.
19. Lantos P. L.: The fine structural localisation of thiamine pyrophosphatase and adenosine triphosphatase in neural tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1974, 29, 199–209.



20. Lassmann H., Kitz K., Wiśniewski H. M.: Structural variability of demyelinating lesioning different models of subacute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* (Berl.), 1980, 51, 191–201.
21. Lassmann H., Wiśniewski H. M.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: Morphological sequence of myelin degradation. *Brain Res.*, 1979, 169, 357–368.
22. Meier C., Bischoff A.: Dysmyelination in the jimpy mouse. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1974, 33, 343–353.
23. Miller F., Palade G. E.: Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell. Biol.*, 1964, 23, 519–532.
24. Munoz-Garcia D., Ludwin S. K.: Intermediate glial cells and reactive astrocytes revisited. A study of organotypic tissue cultures. *J. Neuroimmunol.*, 1985, 8, 237–254.
25. Novikoff A. B., Goldfischer S.: Nucleoside-diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1961, 47, 802–810.
26. Pietrusz P., Ordonneau P., Finley J. C. W.: Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. J.*, 1980, 12, 333–348.
27. Raine C. S., Snyder D. H., Valsamis M. D., Stone S. H.: Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs – an ultrastructural study. *Lab. Invest.*, 1974, 31, 369–380.
28. Schachner M., Hedley-Whyte E. T., Hsu D. W., Schoonmaker G., Bignami A.: Ultrastructural localisation of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labelling. *J. Cell Biol.*, 1977, 75, 67–73.
29. Schiffer D.: Histochemical observations on NDPase and TPPase in cerebral tumours. *Acta Neuropathol.* (Berl.), 1973, 23, 112–117.
30. Steinman R. M., Brodie S. E., Cohn Z. A.: Membrane flow during pinocytosis. *J. Cell Biol.*, 1976, 68, 665–687.
31. Sternberger L. A.: The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: *Immunocytochemistry*. Eds. S. Cohen. R. T. McCluskey. Wiley, New York, 1979, pp. 104–169.
32. Ulrich J., Matthieu J-M., Herchkowitz N., Kohler R., Heitz Ph. U.: Immunocytochemical investigations of murine leukodystrophies. A study of the mutants “jimpy” (jp) and “myelin deficient” (mld). *Brain Res.*, 1983, 268, 267–274.
33. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1957, 27, 13–23.
34. Wender M., Kozik M., Goncerzewicz A.: Histochemical studies in myelinopathy provoked by the cerebrospinal fluid exchange. *Acta Histochem.*, 1977, 58, 17–30.
35. Wender M., Kozik M., Goncerzewicz A.: Neuroglia in central Wallerian degeneration ultrastructural and histochemical studies. *J. Hirnforsch.*, 1981, 22, 205–216.
36. Wender M., Kozik M., Goncerzewicz A., Mularek O.: Neuroglia of the developing optic nerve in the course of Wallerian degeneration. *J. Hirnforsch.*, 1980, 21, 417–428.
37. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Enzyme histochemistry of Wallerian degeneration in the immature optic nerve of rabbits. *Folia Histochem. Cytochem.* 1979, 17, 161–168.
38. Widnell C. C., Schneider Y-J., Pierre B., Baudhuin P., Trouet A.: Evidence for a continual exchange of 5'-nucleotidase between the cell surface and cytoplasmic membranes in cultured rat fibroblasts. *Cell.*, 1982, 28, 61–70.

Offprint requests to: Department of Neurology, School of Medicine, 60-355 Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

IRMINA B. ZELMAN, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

## REMOTE PATHOLOGICAL BRAIN CHANGES IN RATS FOLLOWING EXPERIMENTALLY INDUCED CLINICAL DEATH

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

Experimental studies on the consequences of global ischemia of the central nervous system due to cardiac arrest and their complex pathogenic mechanisms are of special importance for a better understanding of those clinical cases in which resuscitation procedure results are not limited simply to restoration of basic life functions but allow the preservation of normal brain structure and function.

The experimental model of clinical death in rats, induced without thoracotomy and, therefore, allowing animal survival for the required periods of time after the experimental procedure, introduced by Korpaczew et al. (1982) creates particularly advantageous conditions for studying the evolution of postischemic encephalopathy. Morphological evaluation of cerebral abnormalities in this experimental model, performed by Mossakowski et al. (1986) concerned animals with 10 min cardiac arrest and subsequent survival for periods ranging from 24 h to 28 days. This period of time covers the appearance of neuropathological changes resulting both directly from the ischemic incident itself and from circulatory and metabolic disorders accompanying and following restoration of cerebral blood flow.

The present studies aimed at establishing whether the neuropathological picture observed in remote postresuscitation stages differs from that seen in the early phases of the pathological process. These differences may be indicative of further development and evolution of postischemic encephalopathy. In addition, tissue abnormalities were evaluated in the brains of rats, which survived 15 min long clinical death of their mother during pregnancy.

### MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on adult female albino rats, weighing 160–170g in which global cerebral ischemia due to cardiac arrest was evoked according to the method of Korpaczew et al. (1982). Under light ether

anesthesia of animals, a specially constructed metal hook was inserted intrathoracically, which compressed the heart vascular bundle against the sternum. The procedure led in the course of 1.5–2 min to cardiac arrest followed by cessation of respiration. The cardiac arrest resulted in the course of 10–15 sec. in disappearance of the cerebral bioelectric activity, confirmed by its isoelectric electrocorticographic record (Mossakowski et al. 1986). Following 15 min of cardiac arrest resuscitation procedure was introduced. This consisted in external heart massage carried out till full recovery of spontaneous heart action, and controlled respiration with air of normal composition inhaled through a polyethylene tube inserted intratracheally and connected with a respirator for small laboratory animals. In the above presented experimental conditions spontaneous heart action was restored in 2–4 min (average 3 min), and the respiratory function within 10 to 17 min (average 14 min). The pain reflexes reappeared at the time from 38 to 45 min (average 42 min) and corneal reflexes between 55 and 75 min (average 65 min). Directly after resuscitation the animals were lying with maximally straightened extremities. Increased muscle tone and tautness of extremities were commonly observed. Gradually the condition of the animals improved, and 24 h following the ischemic incident it did not differ from that of animals not subjected to any experimental procedure. Six months after experimentally induced clinical death the animals were sacrificed by transcardiac perfusion with 10% neutral formalin solution. The brains removed from the skull were postfixed in the same formalin solution and then cut frontally into blocks. Tissue blocks from 3 levels of the cerebral hemispheres, midbrain, pons, cerebellum and medulla were processed routinely and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin, cresyl violet and according to Klüver-Barrera's method.

Brains of 10-week-old progeny of the female rat subjected on the 10th day of pregnancy to 15-min clinical death (pregnancy was not noticed during selection of animals for the experiment) were also examined. The material for histological studies was taken from the same brain areas as in adult animals. The same histological techniques were applied.

## RESULTS

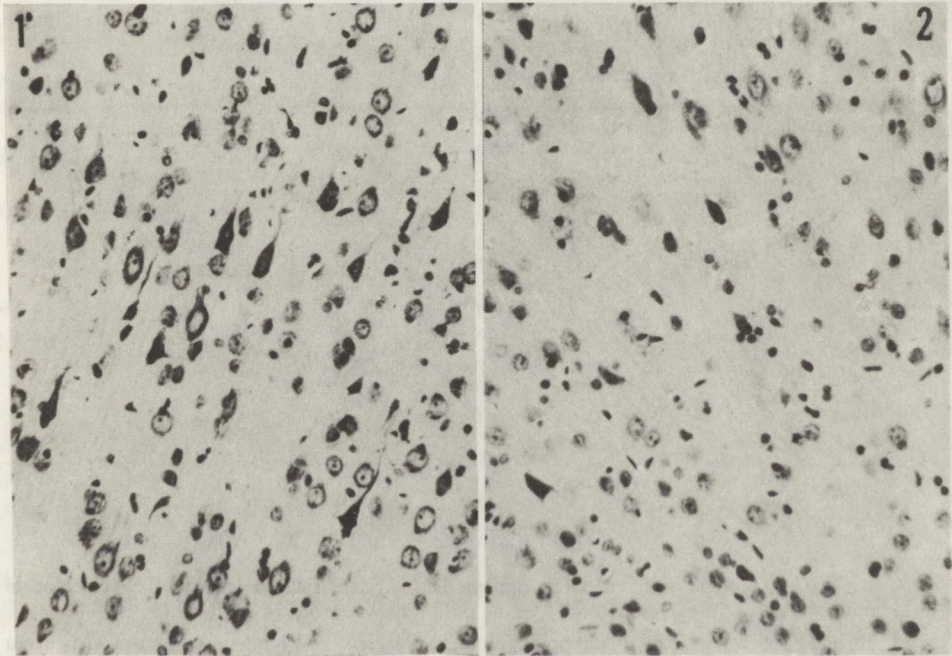
The animals, which survived 6 months following reanimation did not exhibit any neurological and somatic deficits during the whole period of observation, except two rats in which body weight was 10 percent lower as compared with the average for the whole group.

The progeny of the female rat subjected during pregnancy to experimental clinical death developed normally and showed no differences as compared with their age mates not subjected to any experimental procedure.

Brains in both experimental groups showed no macroscopic alterations. Microscopic examination of brains from animals, which survived 6 months

following clinical death in all cases revealed tissue abnormalities. These varied considerably in their intensity and extension in individual animals. They appeared in grey matter structures and took the form of neuronal degeneration and/or loss, either accompanied by glial reaction or showing no glial response. In none of the examined animals were present foci of full tissue necrosis. Macrophage appearance was not a feature. Tissue abnormalities were not noted in the white matter, except some focal glial proliferation in the direct vicinity of more extensive areas of neuronal loss in the neighbouring grey matter structures.

Grey matter alterations consisted in the appearance of shrunken neurons and cells with changes resembling those typical for what is called chronic Nissl degeneration or ghost cells. Small holes in places of broken-down neurons, neuronal rarefaction and widespread areas of neuronal loss were seen. Most commonly neuronal changes showed no accompanying glial reaction, however, in some cases a certain astrocytic or astrocytic-microglial reaction

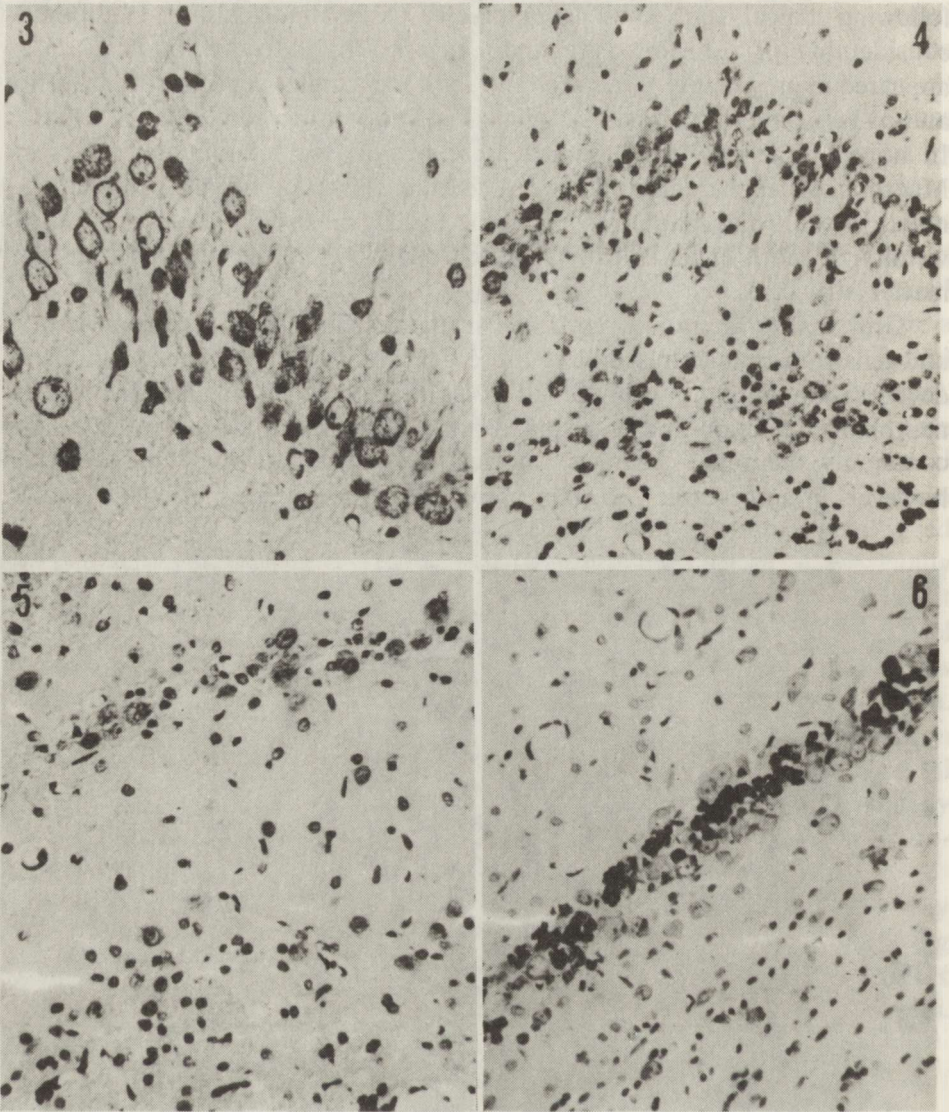


*Fig. 1.* Rat with 6 months survival after clinical death. Fronto-parietal cortex. Laminary rarefaction of nerve cells. Numerous neurons showing features of chronic degeneration. H-E.  $\times 200$

*Ryc. 1.* Szczur z 6 miesięcznym przeżyciem po reanimacji. Kora czołowo-ciemieniowa. Warstwowe przerzedzenie komórek nerwowych. Widoczne również dość liczne neurony o cechach schorzenia przewlekłego. H-E. Pow  $200 \times$

*Fig. 2.* Rat with 6 months survival after clinical death. Neuronal rarefaction in borderline zone between vascularization areas of anterior and middle cerebral arteries. Shrunken dark neurons. There is some glial proliferation. Cresyl violet.  $\times 200$

*Ryc. 2.* Zwierzę z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Przerzedzenie neuronów w obszarze pogranicza unaczynienia tętnicy mózgu przedniej i środkowej. Widoczne obkurczone, ciemne neurony. Zaznaczone pomnożenie komórek glejowych. Fiolet krezyłu. Pow.  $200 \times$



*Fig. 3.* Rat with 6 months survival after clinical death. Paramedial segment of CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn. Impairment and loss of pyramidal neurons. Cresyl violet.  $\times 400$

*Ryc. 3.* Zwierzę z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Przyśrodkowy odcinek sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona. Widoczne zaniki i uszkodzenia neuronów piramidowych. Fiolet krezyłu. Pow. 400  $\times$

*Fig. 4.* Rat with 6 months survival after clinical death. Paramedial segment of CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn. Severe damage of pyramidal cell layer taking the form of extensive neuronal loss and degeneration with profuse glial reaction (astrocytic-microglial proliferation and hypertrophy). H-E.  $\times 200$

*Ryc. 4.* Zwierzę z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Przyśrodkowy odcinek sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona. Widoczne uszkodzenie warstwy komórek piramidowych w postaci rozległych ubytków i zmian neuronalnych z nasilonym odczynem glejowym (astrocytarno-mikroglejowym). H-E. Pow. 200  $\times$

*Fig. 5.* Rat with 6 months survival after clinical death. Sector CA<sub>1</sub> of Ammon's horn with profuse neuronal loss. Strong astrocytic-microglial reaction in the vicinity of dentate gyrus. H-E.  $\times 100$

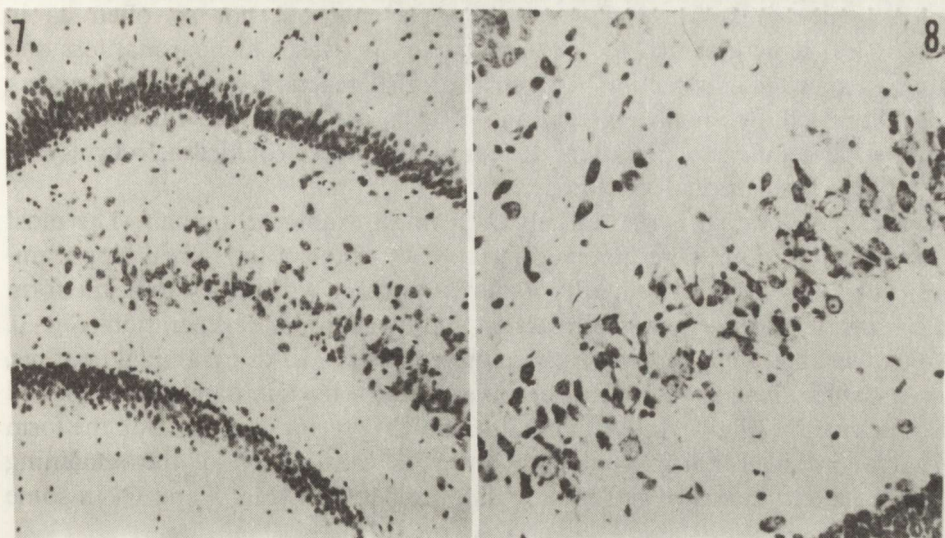


Fig. 7. Rat with 6 months survival after clinical death. Rarefaction of nerve cells and numerous degenerated neurons in sector CA<sub>4</sub> of Ammon's horn. Increased population of glial cells. H-E.  $\times 100$

Ryc. 7. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Widoczne przerzedzenie komórek nerwowych oraz uszkodzone neurony w sektorze CA<sub>4</sub> rogu Amona. Komórki glejowe pomnożone. H-E. Pow. 100  $\times$

Ryc. 8. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Ubytki i uszkodzenie neuronów w sektorze CA<sub>4</sub> Ammon's horn with presence of glial reaction. Cresyl violet.  $\times 200$

Ryc. 8. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Ubytki i uszkodzenie neuronów w sektorze CA<sub>4</sub> rogu Amona z zaznaczonym odczynem glejowym. Fiolet kryzylu. Pow. 200  $\times$

was present. Its nature and intensity varied, depending on the character and extensiveness of neuronal damage as well as on the brain structure involved.

In the fronto-parietal cortex, among the population of normal neurons more or less numerous nerve cells with features of chronic degeneration were dispersed (Fig. 1). These were concomitant with laminar neuronal rarefaction (Fig. 2), and perivascular neuronal loss. The latter were more common in the upper cortical layers (II-IV) and in borderline zones between vascularization areas of larger cerebral arteries. Sometimes, the periphery of those microfoci contained a greater number of altered neurons (Fig. 1). Impaired neurons, both shrunken and showing features of chronic degeneration, were seen also in the

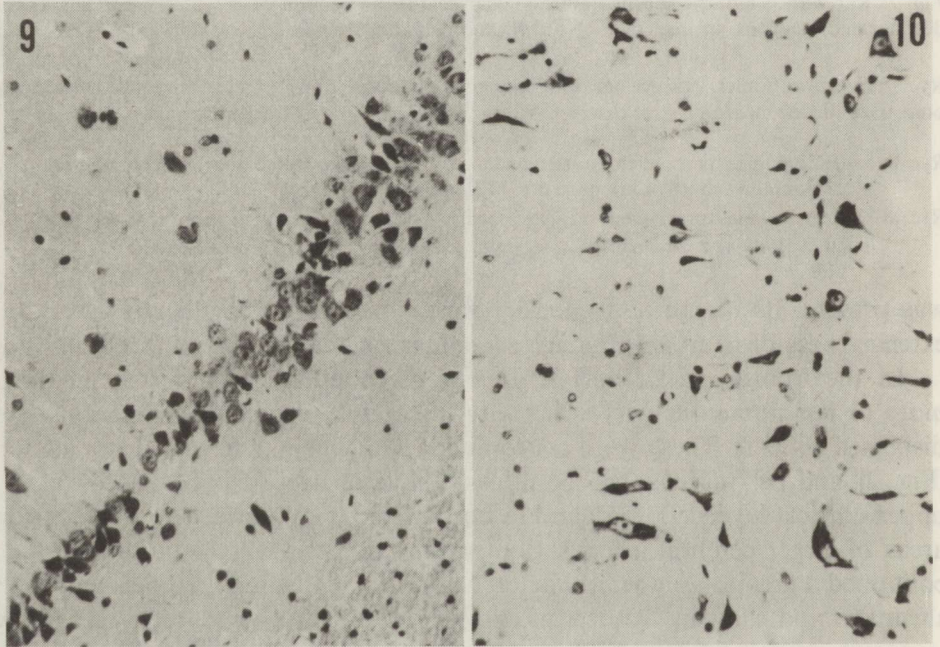
Ryc. 5. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Sektor CA<sub>1</sub> rogu Amona z rozległymi ubytkami neuronów piramidowych. Wyraźny odczyn astrocytarno-mikroglejowy na pograniczu zakrętu zębatego. H-E. Pow. 100  $\times$

Fig. 6. Rat with 6 months survival after clinical death. Sector CA<sub>1</sub> of Ammon's horn. Numerous calcified neurons in the pyramidal layer. Increased population of glial cells and abundant light astrocytes are seen. H-E.  $\times 200$

Ryc. 6. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Sektor CA<sub>1</sub> rogu Amona. Liczne zwapniałe neurony w warstwie komórek piramidowych. Widoczne pomnożenie komórek glejowych i liczne jasne komórki gwiaździste. H-E. Pow. 200  $\times$

entorrhinal cortex, however, they were present here not so often as in neocortical structures and did not accompany perivascular neuronal loss and laminar neuronal rarefaction. The cortical glial reaction was generally weak and expressed by small aggregations of cells around degenerated neurons, slight focal cellular proliferation, appearance of hypertrophied astrocytes and intensified perineuronal satellitosis.

The hippocampal gyrus was involved in all examined animals. The most common alterations were observed in the CA<sub>1</sub> sector of the dorsal hippocampus. They were usually limited to its initial portion, where they took the form of cell rarefaction with no glial reaction and/or neuronal degeneration (Fig. 3). Sometimes they were expressed as a more extensive loss of pyramidal neurons, accompanied by astro-microglial response present both in damaged areas and in their vicinity (Fig. 4). In one animal severe CA<sub>1</sub> sector damage took the form of advanced neuronal loss concomitant with calcification of the remaining nerve cells and intensive astro-microglial proliferation (Fig. 5 and 6). In some



*Fig. 9.* Rat with 6 months survival after clinical death. Neuronal loss and chronic degeneration of nerve cells in sector CA<sub>3</sub> of Ammon's horn. H-E.  $\times 200$

*Ryc. 9.* Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Ubytki i przewlekłe zmiany neuronalne w sektorze CA<sub>3</sub> rogu Amona. H-E. Pow. 200  $\times$

*Fig. 10.* Rat with 6 months survival after clinical death. Sclerotic neurons in raphe structures. Increased glial population. Large "empty" astrocytic nuclei resembling naked nuclei. Cresyl violet.  $\times 200$

*Ryc. 10.* Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Sklerotyczne neurony w strukturach szwu. Komórki glejowe pomnożone, widoczne również komórki astrocytarne o pustych jądrach, przypominające nagie jądra. Fiolet krezyłu. Pow. 200  $\times$

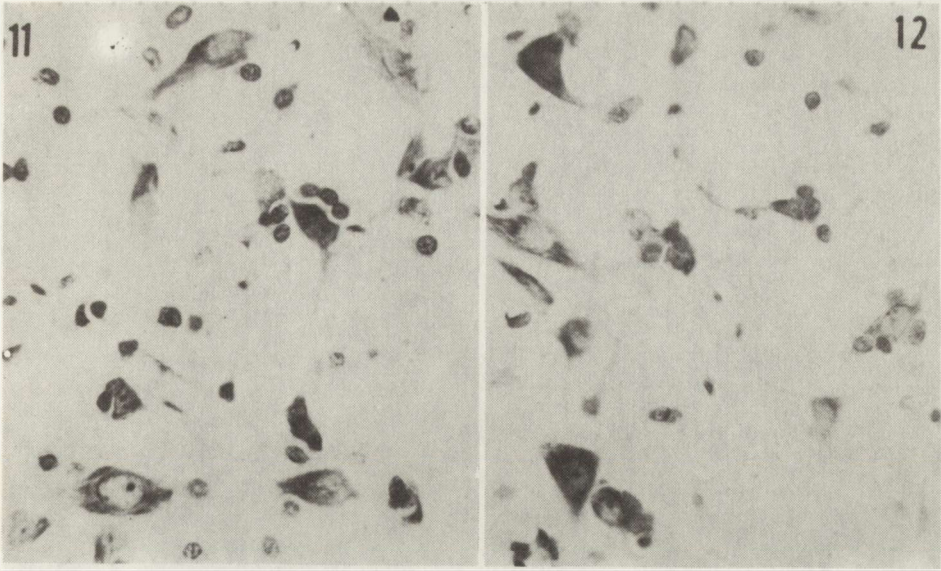


Fig. 11. Rat with 6 months survival after clinical death. Brain stem. Degenerating nerve cells are visible, one of them surrounded by glial nuclei. Cresyl violet.  $\times 400$

Ryc. 11. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Pień mózgu. Widoczne wyrodniałe komórki nerwowe. Jedna z nich otoczona komórkami glejowymi. Fiolet krezyłu. Pow.  $400 \times$

Fig. 12. Rat with 6 months survival after clinical death. Degenerating nerve cells in the brain stem with glial proliferation surrounding damaged neurons. Cresyl violet.  $\times 400$

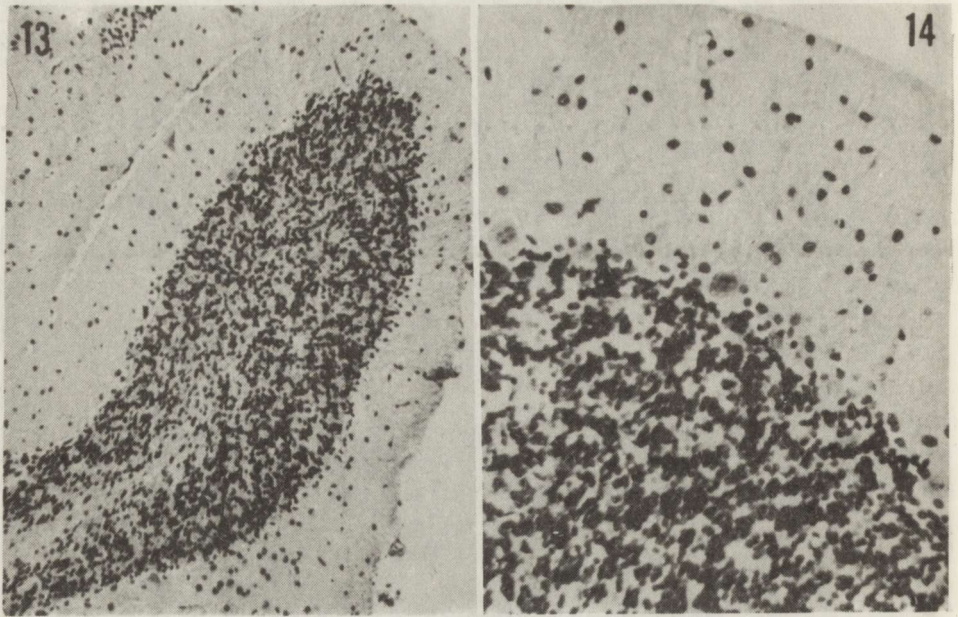
Ryc. 12. Szczur z 6 mies. przeżyciem po reanimacji. Wyrodniałe neurony w pniu mózgu z widocznym zagęszczeniem gleju wokół uszkodzonych komórek nerwowych. Fiolet krezyłu. Pow.  $400 \times$

cases changes were strictly confined to the CA<sub>1</sub> sector while in others they occurred additionally in sector CA<sub>4</sub> (Figs 7 and 8) and sectors CA<sub>2</sub> and CA<sub>3</sub> (Fig. 9) or in the borderline between sectors CA<sub>2</sub> and CA<sub>3</sub>. Usually they were expressed as disseminated or focal degeneration of pyramidal cells.

The striatum, as a rule, was devoid of larger nerve cells; the remaining ones showed features of chronic or "severe" degeneration. In some cases the pathological process involved also small striatal neurons, which were degenerated and their population seemed to be reduced. Similar changes were noted in the thalami.

In the midbrain, pons and medulla neuronal abnormalities were more pronounced than in the cerebral cortex and subcortical structures. Damaged neurons were seen practically in all structures of the brain stem. As a rule medium-size and small neurons were more often impaired than the large ones. The most advanced changes concerned raphe and pontine nuclei, substantia nigra and inferior olives. In structures of raphe, shrunken, sclerotic neurons prevailed (Fig. 10). In other nuclear formations there was preponderance of degeneration of nerve cells accompanied by proliferating glia (Fig. 11), gemistocytes and cells resembling Alzheimer's naked nuclei (Fig. 12). Glial cells were aggregated mostly around disintegrating and/or disintegrated neurons.





*Fig. 13.* Rat with 6 months survival after clinical death. Extensive loss of Purkinje cells in cerebellar lobulus with accompanying proliferation of Bergmann's glia. H-E.  $\times 100$

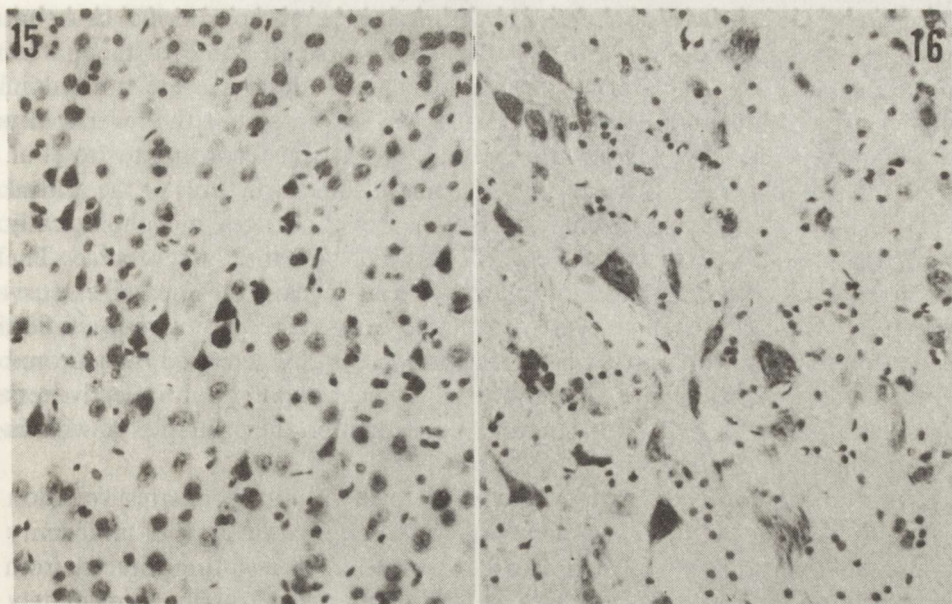
*Ryc. 13.* Szczur z 6. mies. przeżyciem po reanimacji. Rozległe ubytki komórek Purkiniego w obrębie płacika mózdzku z towarzyszącym rozplemem gleju Bergmanna. H-E. Pow.  $100 \times$

*Fig. 14.* Rat with 6 months survival after clinical death. Widespread loss of Purkinje cells, remaining show features of severe impairment. Increased glial proliferation in the molecular layer of cerebellar cortex. Cresyl violet.  $\times 200$

*Ryc. 14.* Szczur z 6. mies. przeżyciem po reanimacji. Rozsiane ubytki komórek Purkiniego, zachowane – wykazują cechy uszkodzenia. W warstwie drobinowej kory mózdzku pomnożenie komórek glajowych. Fiolet kryzylu. Pow.  $200 \times$

The cerebellar cortex revealed widespread or focal loss of Purkinje cells (Fig. 13), occurring more commonly on the convexite of gyri than in the sulci depths. Cerebellar hemispheres seemed more involved than the vermis. Purkinje cell loss was accompanied by proliferation of Bergmann's glia or increased glial population in the molecular layer (Fig. 14). Less often no glial reaction was observed. Degenerated Purkinje cells were widespread over the cerebellar cortex, they were more common in the vicinity of their extensive loss. Cerebellar deep nuclei, mostly the dentate nucleus, showed neuronal and glial changes similar to those described in brain stem structures.

Tissue abnormalities in brains of animals, which survived the ischemic incident during intrauterine life, were much less advanced. In the neocortex single or grouped degenerated neurons were relatively seldom seen (Fig. 15). The same concerned the hippocampal gyrus and subcortical structures. The most advanced abnormalities concerned brain stem structures. Most common was degeneration of neurons accompanied by some glia reaction (Fig. 16). Widespread degeneration and loss of Purkinje cells in the cerebellar cortex were relatively infrequent findings.



*Fig. 15.* Rat which survived 15-min clinical death of mother during intrauterine life. Hyperchromatic neurons with obliterated structure widespread single and in groups in fronto-parietal cortex. Cresyl violet.  $\times 200$

*Ryc. 15.* Szczur, który przeżył śmierć kliniczną matki w okresie płodowym. Nadbarwliwe neurony o zatartym obrazie strukturalnym, rozsiane pojedynczo oraz w niewielkich skupieniach w korze czołowo-ciemieniowej. Fiolet krezyłu. Pow. 200  $\times$

*Fig. 16.* Rat which survived during intrauterine life 15-min clinical death of mother. Damaged neurons, proliferation of glial cells and their aggregation around impaired nerve cells. Cresyl violet.  $\times 400$

*Ryc. 16.* Szczur urodzony przez samicę, która w okresie ciąży przeżyła 15 min śmierć kliniczną. Widoczne uszkodzone neurony, pomnożenie gleju komórkowego i skupienie się komórek glejowych wokół uszkodzonych neuronów. Fiolet krezyłu. Pow. 400  $\times$

#### DISCUSSION

The above presented results indicate that rats which survived 6 months following experimentally induced clinical death, developed cerebral abnormalities which can be named postresuscitation encephalopathy. Despite of long duration of global brain ischemia, applied in our study, the intensity of cerebral lesions was relatively slight, for instance foci of full tissue necrosis were not a feature in any of the animals examined. This phenomenon can probably be connected with a relatively high resistance of the central nervous system in rats to the damaging influence of hypoxia and ischemia, this being known from numerous other experimental studies. This fact finds its confirmation in the relatively slight advancement of brain pathology in our material as compared with other animal models of global brain ischemia (Zaren et al. 1970; Snyder et al. 1975; Safar et al. 1976; Nemoto et al. 1977).

Evolution of cerebral structural lesions in the postresuscitation syndrome was biphasic in early stages of pathological process (Mossakowski et al. 1986).

The first phase was characterized by appearance of nonspecific neuronal changes spread throughout the central nervous system. Some of them were reversible with all probability. Reversible neuronal lesions were noticed in numerous experimental conditions. Klatzo (1985) pointed out the reversibility of ischemic neuronal changes in the „penumbra” areas. According to Ito et al. (1975) and Bubis et al. (1976) during ischemia in some structures of the central nervous system there appear characteristic neuronal changes, morphologically similar to axonal nerve cell degeneration, which are totally reversible. The occurrence of reversible neuronal alteration can explain the greater extensiveness of nerve cell changes observed in the early stage of postresuscitation encephalopathy as compared with its further phases characterized by neuronal loss and degeneration; the latter showing typical topographic selectiveness (Mossakowski et al. 1986) and dynamics dependent on the principles of what is called maturation phenomenon (Klatzo 1975).

In our material concerning brains of rats with long postresuscitation survival, tissue structural abnormalities showed an obvious lack of uniformity and simultaneity. Some of them can be considered as resulting directly from ischemia and both vascular and metabolic disturbances occurring immediately after restoration of the cerebral blood flow. This group of changes is represented by focal selective necroses in the neocortex and hippocampal gyrus, both lacking glial reaction and accompanied by astrocytic or astro-microglial response of varying intensity, perivascular neuronal loss in the cerebral cortex, rarefaction and neuronal loss in the borderline zones between vascularization areas of larger cerebral arteries, disintegration of larger striatal neurons and presence of atrophic nerve cells. Focal loss of Purkinje cells is also probably connected with this stage of the pathological process.

The second feature of the neuropathological picture consists in the presence of degenerating nerve cells widespread in the brain stem structures, cerebellar and cerebral cortex and in subcortical formations of brain hemispheres. The appearance of these changes concomitant with glial reaction is indicative of an active, slowly progressing pathological process. The mechanism of this phenomenon is unknown. Safar (1986) suggests that development of postresuscitation brain pathology is connected with functional insufficiency of internal body organs, with secondary additional damage to the central nervous system. The damaging influence may be exerted by toxic substances liberated from the abnormally functioning liver and/or kidneys as well as by endotoxins or aminoacids absorbed from ischemically altered intestinal walls. This hypothesis may find support in observations indicating that damage to the central nervous system in the case of experimentally induced cardiac arrest is more severe than that occurring under conditions of isolated brain global ischemia. Participation of immunopathological mechanisms in the development of postresuscitation brain pathology should also be taken into consideration. In the same experimental model, Mossakowski and Krajewski (1988) showed progressive accumulation of antineuronal antibodies

in the blood sera of resuscitated animals. These antibodies may be involved in the appearance of late degeneration of nerve cells in the central nervous system. Data concerning the immunopathological mechanism of neuronal loss in the ageing brain support this concept (Nandy 1982).

The brain abnormalities in rats, which survived during intrauterine life, clinical death of their mother, were very slight. The most advanced changes concerned brain stem formations. These observations confirm a well known fact concerning the relatively low sensitivity of the immature central nervous system to hypoxia. On the other hand, they are in agreement with data indicating the greatest intensity of hypoxic lesions in those structures of the central nervous system which at the time of action of the damaging factor(s) show the most advanced degree of development, and thus, the greatest sensitivity to the noxious influence (Myers 1977).

### POŹNE ZMIANY PATOMORFOLOGICZNE W MÓZGACH SZCZURÓW PO PRZEBYTEJ ŚMIERCI KLINICZNEJ

#### Streszczenie

W badaniach patomorfologicznych mózgow zwierząt, które przeżyły okres 6 miesięcy po wywołanej doświadczalnie 15 min śmierci klinicznej stwierdzono, iż obok zmian, które można traktować jako bezpośrednie następstwo epizodu niedokrwiennego mimo ich ujawniania się ze zróżnicowaną latencją czasową, występują nieprawidłowości tkankowe świadczące o aktywnie postępującym procesie zwyrodnieniowym. Uzyskane wyniki wskazują, że encefalopatia poreanimacyjna ma charakter procesu, w którym na uszkodzenia związane z incydem niedokrwiennym nakładają się zmiany wtórne, rozwijające się na podłożu zaburzeń zapoczątkowanych przez niedokrwienie, być może o charakterze immunopatologicznym.

Zmiany u zwierząt, które przeżyły incydent niedokrwienny w życiu płodowym były mniej nasilone i dotyczyły przede wszystkim struktur pnia mózgu. Potwierdza to mniejszą wrażliwość niedojrzałego układu nerwowego na niedotlenienie i lokalizację uszkodzeń w strukturach o najbardziej zaawansowanym dojrzewaniu w momencie zadziałania czynnika patogennego.

### ПОЗДНИЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГАХ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ 15-МИНУТНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ

#### Резюме

В патоморфологических исследованиях мозгов животных, которые прожили 6 месячный период после 15-минутной клинической смерти обнаружено, что кроме изменений, которые можно обсуждать как непосредственное последствие ишемического эпизода, несмотря на их появление в разном периоде, выступают также тканевые напушения, свидетельствующие об активно прогрессирующем дегенерационном процессе. Полученные результаты показывают, что послереанимационная энцефалопатия является процессом, в котором на, связанные с инцидентом ишемии, повреждения накладываются вторичные изменения. Эти вторичные изменения, развиваются на основе нарушений, начатых ишемией и являются, вероятно, проявлением иммунопатологического процесса.

У животных, которые прожили эпизод ишемии внутриутробно, изменения были менее интенсивны и касались прежде всего структур мозгового ствола. Это подтверждает меньшую чувствительность незрелой нервной системы и локализацию повреждений в структурах, наиболее продвинутых в созревании во время действия повреждающего фактора.

## REFERENCES

1. Bubis J. J., Fujimoto T., Ito U., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Ultrastructural changes in H<sub>3</sub> sector of the hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1976, 36, 285–294.
2. Ito U., Spatz M., Walker J. T., Jr., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 32, 209–223.
3. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. In: *Nervous system. Vol. 1. The basic neuroscience*. Ed. D. B. Tower, Raven Press, New York, 1975, pp. 313–322.
4. Klatzo I.: Brain oedema following brain ischemia and the influence of therapy. *Br. J. Anaesth.*, 1985, 57, 18–22.
5. Korpaczew W. G., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie klinicznej smierci i postreanimacyjnej choroby u krysa. *Patol. Fizjol. Exp. Tier.*, 1982, 3, 78–80.
6. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
7. Mossakowski M. J., Krajewski S.: Antineuronal antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia. *Neuropat. Pol.*, 1988, 26, 37–48.
8. Myers R. E.: Experimental models of perinatal brain damage: relevance to human pathology. In: *Intrauterine asphyxia and the developing fetal brain*. Ed. L. Gluck, Year Book Medical, Chicago, 1977, pp. 37–97.
9. Nandy K.: Neuroimmunology and the ageing brain. *Exp. Brain Res.*, 1982, suppl. 5, 123–127.
10. Nemoto E. M., Bleyaert A. L., Stezowski S. W., Moosy J., Rao G. R., Safar P.: Global brain ischemia: a reproducible monkey model. *Stroke*, 1977, 8, 558–564.
11. Safar P.: Cerebral resuscitation after cardiac arrest: a review. *Circulation*, 1986, 74, suppl. 4, 138–153.
12. Safar P., Stezowski W., Nemoto E. M.: Amelioration of brain damage after 12 minutes of cardiac arrest in dogs. *Arch. Neurol.* 1976, 33, 91–95.
13. Snyder J. W., Nemoto E. M., Carroll R. G., Safar P.: Global ischemia in dogs: Intracranial pressure, brain blood flow and metabolism. *Stroke*, 1975, 6, 425–431.
14. Zaren H. A., Weinstein J. D., Langfitt T. W.: Experimental brain swelling. *J. Surg. Res.*, 1970, 32, 227–235.

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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, STANISLAW KRAJEWSKI

ANTINEURAL ANTIBODIES IN BLOOD SERA OF RATS SUBJECTED  
TO GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIADepartment of Neuropathology, Medical Research Centre of Polish Academy of Sciences,  
Warszawa

Appearance of antibrain antibodies or autoantibodies directed against specific cerebral antigens in the blood sera were described in quite a number of neurological diseases. The richest information concerns immunopathological processes accompanying brain ageing both in human subjects and in experimental animals (Ingram et al. 1974; Nandy 1975; Nandy et al. 1975; Makindan 1976; Redie et al. 1979; Cohen, Eisdorfer 1980; Goodwin et al. 1982). The increasing with age content of blood antineuronal antibodies underlies Nandy's concept on the immunopathological mechanism of brain ageing (Nandy 1982). In recent years a number of data have appeared concerning accumulation in blood of antineurofilament antibodies in those neurological diseases in which abundant neuronal breakdown in the central nervous system taken place (Bahmanyar et al. 1984, 1985; Stefansson et al. 1985; Toh et al. 1985). Karcher et al. (1986) in their rich clinical material found an enhanced level of antineurofilament antibodies in 24 percent of cases with cerebrovascular accidents. The same phenomenon was observed in cerebral trauma. Recently Ganushkina and Lebedieva (1987) described immunological abnormalities, accompanying chronic hypertonic encephalopathy.

This inclined us to perform some experimental studies on the immunopathological reaction resulting from severe cerebral ischemia. It seemed even more justified as there exist some suggestions concerning the possible participation of immunological mechanisms in the pathogenesis of post-ischemic encephalopathy. The prerequisite for these studies was an appropriate experimental model ensuring severe enough cerebral ischemia and sufficiently long subsequent survival of animals.

## MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on adult, male albino rats weighing ca 180 g, in which clinical death was induced according to the method described by Korpaczew et al. (1982). Compression of the heart vascular bundle by a special

hook, inserted into the thorax, led in the course of 1.5 to 2 min to complete cardiac arrest and cessation of respiratory function, lasting till resuscitatory management was undertaken. In the case of our experiments this was done after either 10 or 15 min of complete cessation of brain bioelectric activity. Following resuscitation, which included external heart massage and controlled respiration, the experimental animals survived for 6 and 24 hrs, 3, 7, 14 and 28 days as well as 6 months. Their age mates, not subjected to any experimental procedures formed the control group.

The brains of control and experimental animals were examined histologically and immunomorphologically. Histology was done on paraffin sections stained with hematoxiline-eosine and according to the Klüver–Barrera's method. Immunomorphology included immunoreactions for host blood proteins, albumins and IgG performed by the peroxidase-antiperoxidase technique as indicators of the blood-brain-barrier state and immunostaining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) – to reveal the astrocytic response.

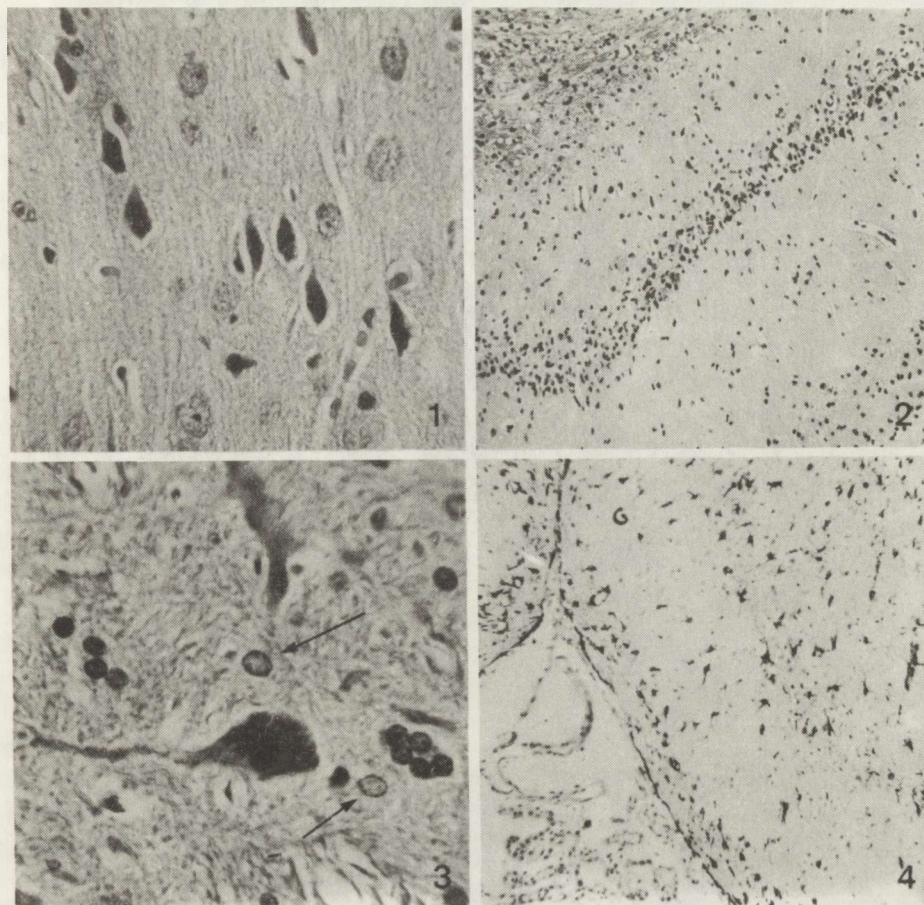
The blood sera of control and experimental animals, sacrificed at the end of the previously mentioned survival periods were collected and characterized by the immunofluorescent technique. Cryostat sections of normal rat brains, liver and kidney after 1 hour of PBS elution were fixed in cold acetone and then preincubated with goat antibodies against rat immunoglobulins in order to block the remaining host immunoglobulin reactivity. Then sera of experimental and control rats diluted within the range 1:4 to 1:40, and occasionally 1:80, were put on the appropriate organ section. The immune reactions were visualized by subsequent incubation first with rabbit anti-rat IgG and then sheep antirabbit-immunoglobulins-FITC. Absorption of the examined sera with lyophilised brain and powdered liver tissues were run in order to check the organ-specificity of the reaction. Immunohistochemistry with mouse and gerbil brain cryostat sections controlled its species-specificity.

## RESULTS

Histological examination\* revealed in the early postischemic period widespread moderate neuronal degeneration, appearing in various structures of the central nervous system prevailing especially in the cerebral and cerebellar cortex and basal ganglia. However, degeneration was also present in areas relatively resistant to ischemic damage, such for instance as substantia nigra, some nuclei of reticular formation and cranial nerves. Degeneration appeared either in the form of tigrolysis, leading to the pictures described in classical neuropathology as acute neuronal swelling or as typical ischemic neuronal changes (Fig. 1). Purkinje cells showed characteristic homogeneous degeneration. Features of neuronal loss appeared starting from the third postischemic

---

\*Detailed histopathological data have been previously described in papers by Mossakowski et al. (1986) and Zelman and Mossakowski (1988).



*Fig. 1.* Experimental animal. 10-min clinical death with 24-h survival. Ischemic dark neurons in the cerebral cortex. H-E.  $\times 400$

*Ryc. 1.* Zwierzę doświadczalne. 24 godz. przeżycia po 10 min śmierci klinicznej. Typowe zmiany niedokrwienne neuronów kory mózgu. H-E. Pow. 400  $\times$

*Fig. 2.* Experimental animal with 10-min clinical death and 7-day survival. Neuronal loss with accompanying glial proliferation in dorsal hippocampus (Ammon's horn sector CA<sub>1</sub>). H-E.  $\times 60$

*Ryc. 2.* Zwierzę doświadczalne. 7 dni przeżycia po 10-min śmierci klinicznej. Rozległy ubytek neuronów z towarzyszącą proliferacją gleju w grzbiekowej części zakrętu hipokampa (sektor CA<sub>1</sub> rogu Amona). H-E. Pow. 60  $\times$

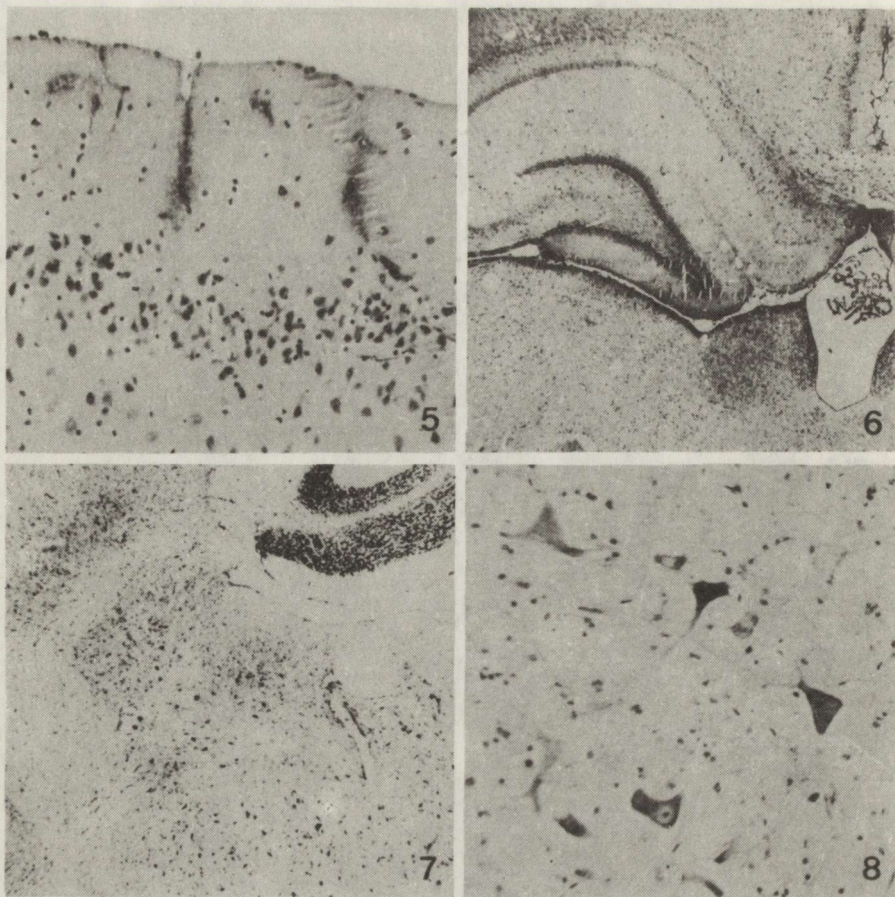
*Fig. 3.* Experimental animal with 15-min clinical death followed by 6-month survival. Enlarged astrocytic nuclei (arrows) resembling Alzheimer cells type II and small groups of glial nuclei, probably replacing neuronal perikarya. H-E.  $\times 900$

*Ryc. 3.* Zwierzę doświadczalne. 6 miesięcy po przeżyciu 15 min śmierci klinicznej. Pojedyncze powiększone jądra astrocytarne (strzałki) przypominające komórki Alzheimer'a typu II oraz drobne skupienia jąder glejowych prawdopodobnie w miejscach zanikłych komórek nerwowych. H-E. Pow. 900  $\times$

*Fig. 4.* Experimental animal with 10-min clinical death followed by 28-day survival. Astrocytic proliferation and hypertrophy localized subependymally and in the area of breakdown pyramidal neurons of Ammon's horn. GFAP.  $\times 100$

*Ryc. 4.* Zwierzę doświadczalne. 28 dni przeżycia po 10-min śmierci klinicznej. Rozplem i przerost astrocytów w warstwie podwysięciłkowej oraz w warstwie rozpadłych komórek piramidowych rogu Amona. GFAP. Pow. 100  $\times$





*Fig. 5.* Experimental animal with 10-min clinical death followed by 24-h survival. Perivascular accumulation of blood albumin in the molecular layer of hippocampal gyrus. PAP reaction.  $\times 100$   
*Ryc. 5.* Zwierzę doświadczalne. 24 godz. przeżycia po 10-min śmierci klinicznej. Okołonaczyniowe nagromadzenie albumin surowicy krwi w warstwie drobinowej zakrętu hipokampa. PAP. Pow. 100  $\times$

*Fig. 6.* Experimental animal with 10-min clinical death followed by 24-h survival. Diffuse inhibition of periventricular structures, most pronounced in hippocampal formation, with blood serum albumin. PAP. Magnif. glass

*Ryc. 6.* Zwierzę doświadczalne. 24 godz. przeżycia po 10-min śmierci klinicznej. Rozlana inibicja struktur okołokomorowych, najsilniejsza w rogu Amona, albuminami surowicy krwi. PAP. Pow. lupowe

*Fig. 7.* Experimental animal with 10-min clinical death followed by 3-day survival. Diffuse infiltration of the brain stem grey structures with blood serum proteins. PAP.  $\times 10$

*Ryc. 7.* Zwierzę doświadczalne. 3 dni przeżycia po 10-minutowej śmierci klinicznej. Rozlana inibicja szarych formacji pnia mózgu białkami surowicy krwi. PAP. Pow. 10  $\times$

*Fig. 8.* Experimental animal with 10-min clinical death followed by 24-h survival. Large neurons of reticular formation revealing positive immunochemical reaction for blood serum proteins. PAP.  $\times 200$

*Ryc. 8.* Zwierzę doświadczalne. 24 godz. przeżycia po 10-min śmierci klinicznej. Duże neurony formacji siatkowatej pnia mózgu wykazujące dodatni odczyn na białka surowicy krwi. PAP. Pow. 200  $\times$

day and were localized first of all in typical selectively vulnerable areas such as the hippocampus (Fig. 2), ganglion cell layer of cerebellar cortex, 3rd neocortical layer and striatum. Borderline zones of the cerebral cortex were also the sites of severe changes. The intensity of neuronal loss increased remarkably with time in the whole postischemic period. It was much more severe in animals sacrificed 6 months after clinical death than in those killed 4 weeks afterwards. It involved also much greater areas than those of neuronal degeneration observed in early postischemic stages. Early postischemic stages were also characterized by severe rarefaction of the cerebral white matter; this was accompanied by features of acute swelling of oligodendrocytes.

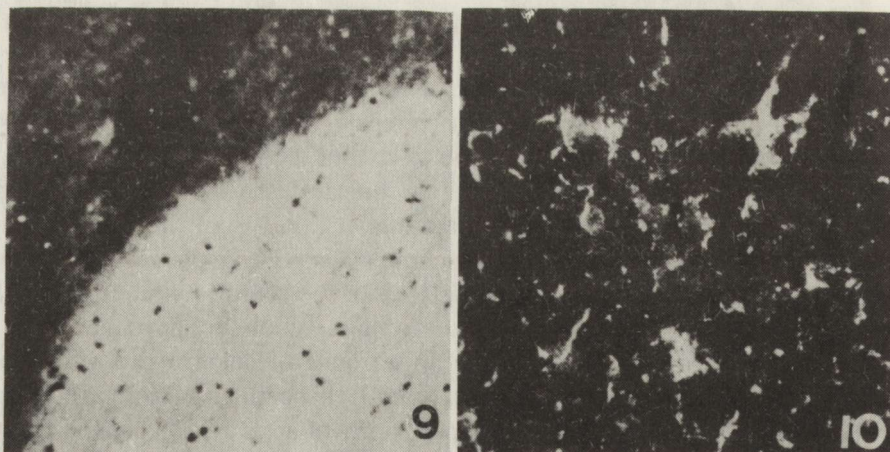
The glial reaction consisted in the appearance of naked astrocytic nuclei, resembling those of the Alzheimer cells, type II; this being a rather early feature (Fig. 3). Intensive proliferation and hypertrophy of astrocytes localized mostly, but not exclusively, in areas of severe neuronal loss (Fig. 3 and 4) appeared later. In some cases mixed astrocytic-microglial nodules were present. Hematogenous cellular reaction was not a feature at any period of postischemic pathology.

Immunohistochemical reactions, for characterising brain barrier systems revealed perivascular tissue infiltration with serum proteins. This was particularly significant in the hippocampal gyrus (Fig. 5), molecular layer of cerebellar cortex and in extensive areas of the brain stem structures. Here, and particularly in the direct vicinity of the ventricular walls, the brain parenchyma was diffusely infiltrated with substances giving a positive reaction for whole serum proteins as well as for albumin and IgG (Figs 6 and 7). The above changes were present exclusively in the early postischemic period, that is they occurred in animals sacrificed 6 and 24 hrs 3 days following clinical death. They disappeared thereafter. In addition pyramidal cells of Ammon's horn, some of Purkinje cells and numerous neurons of the brain stem accumulated blood proteins in their cytoplasm (Fig. 8).

Table 1. Immunofluorescent test: affinity of sera to different organs (in brackets number of animals examined)

Tabela 1. Test immunofluorescencyjny: powinowactwo surowic do różnych narządów (w nawiasach liczba badanych zwierząt)

Organ Narząd	Control animals Zwierzęta kontrolne	Experimental animals – Survival groups Zwierzęta doświadczalne – Czas przeżycia						
		6h godz	24h godz	3 days dni	7 days dni	14 days dni	28 days dni	6 months miesiące
Brain Mózg	0 (4)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	3 (3)	2 (3)	2 (4)	4 (6)
Liver Wątroba	2 (4)	1 (3)	2 (3)	1 (3)	3 (3)	2 (3)	1 (3)	2 (6)
Kidney Nerki	1 (4)	0 (3)	1 (3)	1 (3)	2 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (6)



*Fig. 9.* Strong immunofluorescence of myelin sheaths in normal rat white matter with blood serum of experimental animal, which survived for 6 months clinical death of 15 min duration. Serum dilution 1:40.  $\times$  150

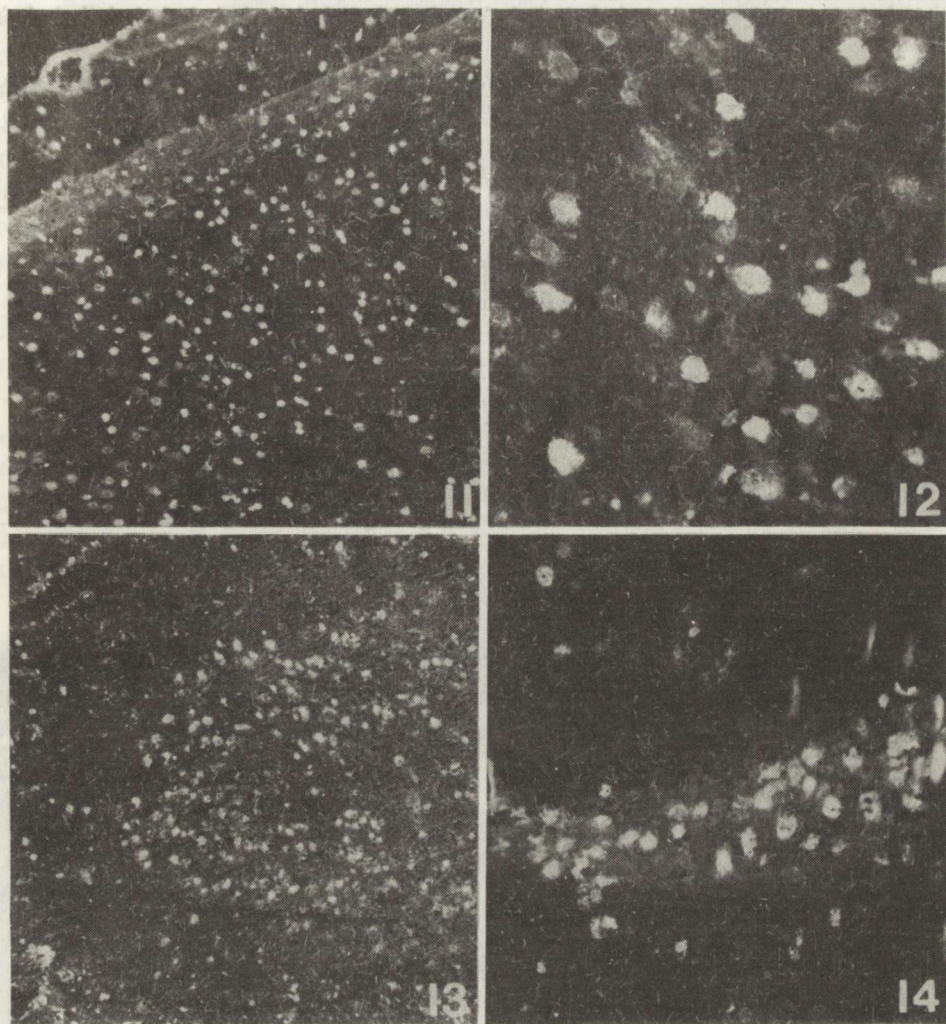
*Ryc. 9.* Silna immunofluorescencja osłonek mielinowych istoty białej szczura w reakcji z surowicą zwierzęcia doświadczalnego, które przeżyło 6 miesięcy po 15 min śmierci klinicznej. Miano surowicy 1:40. Pow. 150  $\times$

*Fig. 10.* Strong immunofluorescence of glial cells of Ammon's horn in rat with blood serum of experimental animal which survived for 28 days clinical death of 10 min duration. Serum dilution 1:40.  $\times$  500

*Ryc. 10.* Silna immunofluorescencja komórek glejowych w rogu Amona szczura z surowicą zwierzęcia doświadczalnego, które przeżyło 28 dni po 10 min śmierci klinicznej. Miano surowicy 1:40. Pow. 500  $\times$

Sera of control animals and those of experimental ones up to the 7th postischemic day were negative as far as the immunofluorescent reaction with brain tissue was concerned, although there their reaction was positive with liver and/or kidney (Tab. 1). The earliest immunological reaction with brain was observed in the case of sera, obtained from animals sacrificed on the 7th postischemic day. Positive immunofluorescence concerned different components of brain tissue. Alongside with neuronal reaction, immunofluorescence involved myelin and glial cells, mostly astrocytes (Figs 9, 10). In some, rare cases the diffuse immunofluorescence reaction concerned the brain tissue as a whole, without possibility to distinguish its particular structural elements. It is worth mentioning that this reaction was usually accompanied by strong positive immunofluorescence in hepatocytes and in epithelium or basement membrane of renal canaliculi.

The intensity of immunological reaction with structural components of the brain tissue, in particular that with neurons increased steadily in subsequent postischemic time intervals, reaching its highest degree in sera of animals sacrificed 6 months following clinical death (Tab. 2). In that group in 4 of 6 animals strong neuronal immunofluorescence, indicating the presence of antineuronal antibodies, was observed when serum dilution was 1:80 and higher.



*Fig. 11.* Immunofluorescence of rat cerebral cortex with blood serum of the experimental animal which survived for 6 months clinical death of 15 min duration. Serum dilution 1:80.  $\times 100$

*Ryc. 11.* Dodatni odczyn immunofluorescencyjny komórek kory mózgu szczura z surowicą zwierzęcia doświadczalnego, które przeżyło 6 miesięcy po 15 min śmierci klinicznej. Miano surowicy 1:80. Pow. 100  $\times$

*Fig. 12.* Higher magnification of picture shown in Fig. 11. Immunofluorescence restricted to neuronal cytoplasm.  $\times 400$

*Ryc. 12.* Większe powiększenie fragmentu ryc. 11. Zwraca uwagę ograniczenie odczynu immunofluorescencyjnego do cytoplazmy komórek nerwowych. Pow. 400  $\times$

*Fig. 13.* Immunofluorescence reaction in hippocampal structures with blood serum of experimental animal which survived for 6 months clinical death of 15 min duration.  $\times 60$

*Ryc. 13.* Dodatni odczyn immunofluorescencyjnej formacji hipokampa z surowicą zwierzęcia doświadczalnego, które przeżyło 6 miesięcy po 15-min śmierci klinicznej. Pow. 60  $\times$

*Fig. 14.* Higher magnification of a fragment from Fig. 13. revealing strong immunofluorescence of Ammon's horn pyramidal neurons. Serum dilution 1:80.  $\times 400$

*Ryc. 14.* Większe powiększenie fragmentu ryciny 13. Widoczny żywy odczyn immunofluorescencyjny w neuronach piramidowych rogu Amona. Miano surowicy 1:80. Pow. 400  $\times$

Table 2. Immunofluorescent test: reaction with different structural elements of the central nervous system (in brackets — number of animals)

Tabela 2. Test immunofluorescencyjny: odczyn z różnymi elementami strukturalnymi ośrodkowego układu nerwowego (w nawiasach — liczba zwierząt)

Tissue element Struktura tkankowa	Control animals Zwierzęta kontrolne (4)	Experimental animals — Survival groups Zwierzęta doświadczalne — Czas przeżycia						
		6 h godz (3)	24 h godz (3)	3 days dni (3)	7 days dni (3)	14 days dni (3)	28 days dni (4)	6 months miesiące (6)
Myelin Mielina	—	—	—	—	++ (1)	+	—	++ (2)
Astrocytes Astrocyty	—	—	—	—	++ (1)	—	++ (1)	—
Neurons Neurony	—	—	—	—	+	++ (1)	++ (1)	+++ (4)



Fig. 15. Immunofluorescence reaction in the cerebellar cortex with blood serum of an experimental animal, which survived 15-min clinical death for 6 months. Note positive reaction in a narrow rim of granular neurons cytoplasm and in Purkinje cells. Serum dilution 1:80.  $\times 200$

Ryc. 15. Dodatni odczyn immunofluorescencyjny w strukturach kory mózdzku z surowicą zwierząt doświadczalnych, które przeżyły 6 miesięcy po 15-min śmierci klinicznej. Fluorescencja występuje w cytoplazmie ziarnistych neuronów i komórek Purkiniego. Miano surowicy 1:80. Pow.  $200 \times$

Fig. 16. Immunofluorescence reaction in the cytoplasm of giant neurons from brain stem reticular formation. Experimental conditions as above.  $\times 800$

Ryc. 16. Dodatni odczyn immunofluorescencyjny olbrzymich neuronów tworzących siatkowatego pnia mózgu. Warunki doświadczalne jak wyżej. Pow.  $800 \times$

The topographic distribution of neuronal immunofluorescence was relatively constant in all experimental groups. The intensive specific IF was seen first of all in neocortical neurons (Fig. 11) mostly those of pyramidal type (Fig. 12). Basal ganglia, in particular striatum, were the permanent site of strong neuronal immunofluorescence. So were pyramidal cells of Ammon's horn (Fig. 13). Here, at higher magnification, one could easily see the glial cells remained totally negative (Fig. 14). In the cerebellum the strongest IF reaction was present in the granular cell layer, it was somewhat weaker in Purkinje cells (Fig. 15). In the brain stem the immunohistochemical reaction was less intense than in cortical structures, although it was present in large neurons of the reticular formation (Fig. 16).

The absorption test performed with lyophilized rat brain tissue abolished totally the neuronal IF reaction and partially reduced that of the whole brain, showing no noticeable influence on the immunoreaction of the examined internal body organs. Contrary to that, absorption with powdered rat liver left neuronal IF unchanged, slightly reducing only that of the whole brain and significantly or totally abolishing immunofluorescence of both liver and kidney.

The immunofluorescence reaction of the sera from experimental animals was also positive with neurons of mouse and gerbil brains.

#### DISCUSSION

The results presented above indicate that experimentally induced clinical death, accompanied by subsequent, progressive widespread breakdown of neurons of the central nervous system evokes an immunological reaction appearing in the postresuscitation period. This taken the form of production of antibodies directed against structural elements of the nerve tissue and those of the internal body organs.

With all probability the immunological response concerns different types of brain antigens, as indicated by the appearance of immunoreaction with a number of structural components of the central nervous system such as neurons, astrocytes and myelin. However, the frequency and intensity of the neuronal immunofluorescence reaction suggest prevalence of response to neuronal antigen or antigens, the nature of which remains to be elucidated. In the light of recent literature data (Bahmanyar et al. 1984; 1985; Stefansson et al. 1985; Karcher et al. 1986) confronted with the neuropathology of our material, concerning mostly neuronal damage, it seems justified to suppose that protein components of neurofilaments are the most probable antigens involved. The appearance of antibodies directed against other neural and/or glial components of the brain seems natural. However, it is worth mentioning that their presence was less common and constant than that of antineuronal ones, as less frequent were histologically detectable abnormalities of myelin or glial cells, mostly oligodendrocytes. Anticerebral autoantibody appearance was preceded

and accompanied by formation of antibodies directed against internal body organs such as liver and kidneys, what seems understandable in the case of generalized severe ischemia resulting from cardiac arrest. These antibodies might be common with some of the anticerebral ones, especially those expressed by generalized diffuse immunoreaction with brain tissue with no clear cellular connections. This type of reaction was reduced both by absorption with lyophilized brain tissue and acetone-powder of rat liver. However, the time sequence of antineuronal antibodies appearance and results of absorption tests speak strongly in favour of their full organ-specificity. On the other hand the positive immunoreaction of experimental sera with normal brain neurons of mice and Mongolian gerbils indicates their species non-specificity. This might be a supportive argument for neurofilaments or their components as being the main antigen evoking the observed immunological response (Stefansson et al. 1985; Toh et al. 1985).

There exist two factors making possible contact of brain tissue antigens with the immunological system, resulting in specific antibodies formation. The first is widespread neuronal damage in the central nervous system, although less severe than in other animals in analogous or similar circulatory abnormalities (Pluta 1982; Kapuściński, Mossakowski 1983). The tissue abnormalities observed in our material in the early postresuscitation period took the form of nerve cell degeneration, of various nature, while starting from the third postischemic day destruction of the cerebral neurons was obviously prevailing. One has to point out, however, the great individual variation in the intensity and extension of neuronal alterations (Mossakowski et al. 1986), this, among other things may be reflected in the differences in antibody production observed in the material under study. The second factor involved in the discussed phenomena was damage of the encephalic barrier systems, as indicated by the leakage of serum proteins, and their particular components such as albumins and IgG into the cerebral parenchyma. The pathological features observed suggested that in addition to the damaged permeability of the cerebral blood vessels, manifested by extravasation of proteins into their direct surroundings, we were dealing with alterations of other barrier systems such as the blood-cerebrospinal fluid barrier, the function of which is connected with the choroid plexus. Their impairment is suggested by diffuse tissue imbibition with serum proteins along the ventricular walls. The latter phenomenon indicates moreover an increased penetration of proteins from the cerebrospinal fluid through the ventricular walls. All the above presented features are rather early events, occurring within the range between 6 h and 7 days of the postischemic period. Despite their relatively short duration, they cover the time of nerve cell degeneration and the early stages breakdown. It is worth mentioning that at that time marked changes in the permeability of cell membranes of morphologically unchanged neurons appeared. This was documented by accumulation of serum proteins in their cytoplasm.

The other problem requires a short discussion. It is the progressive nature

of nerve cell damage occurring during the whole postresuscitation period (Mossakowski et al. 1986). The intensity of neuronal loss observed in animals sacrificed 6 months after clinical death was much more advanced, as compared with that in animals with shorter survival periods. So was extension and distribution of tissue alterations (Zelman, Mossakowski 1988). The question arises, what is the pathogenetic mechanism of those protracted and progressive pathological events. One of a number possibilities is that the immunopathological processes, connected with the appearance of circulating antineuronal antibodies may be involved in the development of postresuscitation encephalopathy. Such a mechanism has been suggested for neuronal loss connected with brain ageing (Makinodan 1976; Redei et al. 1979; Cohen, Eisdorfer 1980; Goodwin et al. 1982; Nandy 1982). Acceptance or rejection of such a pathogenic mechanism for the progressive in nature postischemic encephalopathy thy requires numerous further studies.

#### PRZECIWCIAŁA ANTYNEURONALNE W SUROWICY KRWI SZCZURÓW PODDANYCH CAŁKOWITEMU NIEDOKRWIENIU MÓZGOWIA

##### Streszczenie

Stwierdzono, że w surowicy krwi zwierząt, które przeżyły 10 lub 15 minutową doświadczalną śmierć kliniczną, pojawiają się przeciwciała dające dodatni odczyn immunologiczny z elementami strukturalnymi tkanki nerwowej takimi jak astrocyty, mielina oraz komórki nerwowe. Pojawiały się one od 7 dnia po niedokrwieniu, a ich miano, w szczególności przeciwciał antyneuronalnych, narastało do 6 miesięcy po niedokrwieniu. Obecność przeciwciał antyneuronalnych była zjawiskiem najbardziej stałym, a dodatnia reakcja immunologiczna dotyczyła neuronów kory mózgu, rogu Amona, kory mózdzku i jąder pnia mózgu. Odczyn miał charakter narządowo-swoisty przy braku swoistości gatunkowej. Kontaktowi antygenów tkanki nerwowej z układem immunologicznym sprzyjał rozpad komórek nerwowych OUN współprzebiegający z uszkodzeniami bariery krew—mózg, stwierdzonymi metodami immunochemicznymi.

#### ПРОТИВОНЕВРОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ОБЩЕЙ МОЗГОВОЙ ИШЕМИИ

##### Резюме

Обнаружено, что у животных, которые прожили 10-ти или 15-ти минутную экспериментальную клиническую смерть, появляются в сыворотке крови антитела, вызывающие положительную иммунологическую реакцию со структурными элементами нервной ткани — астроцитами, миелиной и нервными клетками. Они появлялись с 7 дня после ишемии, а их титр, особенно противоневрональных антител, увеличивался до 6 месяцев после ишемии. Присутствие противоневрональных антител было наиболее постоянным феноменом, а положительная иммунологическая реакция выступала в нейронах мозговой коры, аммониева рога, коры мозжечка и в ядрах мозгового ствола. Реакция была органо-специфическая, не было видовой специфичности. Контакты антигенов нервной ткани с



иммунологической системой способствовало разрушение нервных клеток центральной нервной системы, сопутствующее с повреждением барьеры кровь-мозг, обнаруженным иммунохимическими методами.

## REFERENCES

1. Bahmanyar S., Liem R. K. H., Griffin J. W., Gajdusek D. C.: Characterization of anti-neurofilament autoantibodies in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1984, 43, 369–375.
2. Bahmanyar S., Moreau-Dubois M. C., Brown P., Cathala F., Gajdusek D. C.: Serum antibodies to neurofilament antigens in patients with neurological and other diseases and in healthy controls. *J. Neuroimmunol.*, 1985, 5, 191–196.
3. Cohen D., Eisdorfer C.: Autonuclear antibodies in the cognitively impaired elderly. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 1980, 168, 179–180.
4. Ganushkina I. W., Lebedieva N. W.: Gipertoniceskaja encefalopatja. *Medicina*, Moskwa, 1987, pp. 165–171.
5. Goodwin J. S., Searles R. P., Tung K. S. K.: Immunological response of a healthy elderly population. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, 48, 403–410.
6. Ingram C. R., Phegan K. J., Blumenthal H. T.: Significance of an ageing-linked neuron binding gamma-globulin fraction of human sera. *J. Gerontol.*, 1974, 20, 20–27.
7. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observations after 30-min bilateral ligation of carotid arteries. In: *Advances in the Biosciences*. 43, Stroke: Animal Models. Ed.: V. Stefanovich. Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1983, pp. 63–82.
8. Karcher D., Soler Federspiel B. S., Lowenthal F. D., Frank F., Lowenthal A.: Antineurofilament antibodies in blood of patients with neurological diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1986, 72, 82–85.
9. Korpaczew V. G., Łysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelirovanije kliničeskoj smerti i post-reanimacionnoj bolezni u krys. *Patol. Fizjol. Eksp. Terapija*, 1982, 3, 78–80.
10. Makinodan T.: Immunobiology of ageing. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1976, 24, 249–252.
11. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
12. Nandy K.: Significance of brain reactive antibodies in serum of aged mice. *J. Gerontol.*, 1975, 30, 412–416.
13. Nandy K.: Neuroimmunology and the ageing brain. *Exp. Brain Res.*, 1982, Sup. 5, 123–127.
14. Nandy K., Fritz R. B., Threatt J.: Specificity of brain reactive antibodies in serum of old mice. *J. Gerontol.*, 1975, 30, 269–274.
15. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i ocena zmian jemu towarzyszących. *Doctors thesis. Med. Res., Centre., P.A.Sci* 1982.
16. Redei A., Biro J., Kun Z.: Alterations of two parameters of cellular immunity in the aged man. *Gerontology*, 1976, 9, 477–479.
17. Stefansson K., Morton L. S., Dieperink M. E., Molnar G. K., Schlaepfer W. W., Helgason C. M. D.: Circulating autoantibodies to 200 000 dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. *Science*, 1985, 228, 1117–1119.
18. Toh B. H., Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Goudsmit J., Dahl D.: The 200- and 150 KDa neurofilament proteins react with IgG antibodies from patients with Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and other neurologic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3485–3489.
19. Zelman I. B., Mossakowski M. J.: Remote pathological brain changes in rats following experimentally induced clinical death. *Neuropat. Pol.*, 1988 26, 25–36.

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

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

## BARIERA KREW—MÓZG W MODELU ŚMIERCI KLINICZNEJ U SZCZURÓW

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Wyniki badań doświadczalnych i obserwacji klinicznych dotyczących encefalopatii poischemicznej, a zwłaszcza obserwacje patofizjologiczne dotyczące rozwoju cytotoksycznego obrzęku mózgu, są nadal kontrowersyjne. Crone (1963) wykazał, że nawet ciężka hipoksja, prowadząca do rozwoju strukturalnych uszkodzeń mózgu, nie powoduje zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg dla inuliny i cukrozy. Bakay (1963) stwierdził, że samo niedotlenienie nie wywołuje zaburzeń w przepuszczalności bariery krew-mózg, pojawiają się one dopiero przy skojarzeniu niedotlenienia z hiperkapnią. Kapuściński i wsp. (1972) badając techniką izotopową wpływ niedokrwienia niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów wykazali, że przedłużone umiarkowane niedotlenienie, jak również krótkotrwałe głębokie niedotlenienie, nie powoduje zaburzeń przepuszczalności bariery krew-mózg, pomimo stwierdzanych zmian morfologicznych i histochemicznych w mózgu. Dopiero skojarzone działanie ischemii i hipoksji prowadziło do znacznego zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg, któremu towarzyszył narastający obrzęk i nasilające się uszkodzenia strukturalne ośrodkowego układu nerwowego. Łysenkov (1981a,b) obserwował zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg dla fosforanu i albuminy po 5 i 10 minutowej śmierci klinicznej u szczurów.

Szybki rozwój nauki w ostatnich latach powoduje głębsze zrozumienie mechanizmów patofizjologicznych i wprowadza potrzebę modyfikacji niektórych przyjętych poglądów i terminów. Nowsze badania *in vitro*, wyniki doświadczalne i obserwacje kliniczne wskazują na możliwość skutecznej reanimacji ludzi i zwierząt w normotermii po dłuższym okresie śmierci klinicznej niż dotychczas przyjmowano (Safar i wsp. 1982). Podział obrzęku mózgu na obrzęk naczyniopochodny i obrzęk cytotoksyczny (Klatzo 1967) wydaje się niepełny. Pappius (1983) uważa, że powyższą klasyfikację należy

zmodyfikować i wyróżnia obrzęk osmotyczny, ischemiczny i śródmiąższowy. Nowy termin – obrzęk jonowy – wprowadzony został przez Younga i wsp. (1987).

Możliwość dokładnego określenia czasu całkowitego niedokrwienia mózgu i stosunkowo nieskomplikowana metoda doświadczalna spowodowały, że model śmierci klinicznej u szczurów opisany przez Korpaczewa i wsp. (1982) jest coraz częściej stosowany w naszym Instytucie do wielokierunkowych badań encefalopatii poresuscytacyjnej, tym bardziej, że pozwala on na wielomiesięczne przeżycie zwierząt (Mossakowski i wsp. 1986; Majkowska 1986, 1987a, b; Kapuściński 1987; Mossakowski, Krajewski 1987; Szumańska i wsp. 1988; Zelman, Mossakowski 1988). Dlatego też wydawało się celowe określenie stanu przepuszczalności bariery krew–mózg w powyższym modelu przy użyciu  $^{99m}\text{TcO}_4$ , którego przydatność do tego typu badań została udowodniona w diagnostyce ośrodkowego układu nerwowego.

Celem pracy była ocena stanu przepuszczalności bariery krew–mózg w różnych czasach po reanimacji zwierząt, które przeżyły 10 i 15 minutową śmierć kliniczną.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 48 szczurach rasy Wistar z hodowli losowej, samicach o masie ciała około 180 g. W płytkiej narkozie eterowej wywoływano u nich śmierć kliniczną według metody Korpaczewa i wsp. (1982), a następnie zwierzęta reanimowano stosując zewnętrzny masaż serca i kontrolowaną wentylację płuc. Badania przeprowadzono u 8 zwierząt kontrolnych i w dwóch grupach doświadczalnych, wywołując śmierć kliniczną zwierząt na okres 10 i 15 minut, a następnie po reanimacji pozostawiając je przy życiu na okres 2 godzin oraz 2, 5 i 7 dni (po 5 szczurów w każdej podgrupie). Na 2 godziny przed uśmierceniem zwierząt wstrzykiwano im do żyły udowej  $40\mu\text{Ci}$  ( $1480\text{ KBq}$ )  $^{99m}\text{TcO}_4$  w objętości 0,2 ml. Nadtechnetan otrzymywano przez elucję 0,9% NaCl kolumny molibdenowej-99 produkcji Instytutu Energii Atomowej, Ośrodka Reaktorów i Produkcji Izotopów w Świerku. Przed uśmierceniem zwierząt, po otwarciu klatki piersiowej, pobierano 2 ml krwi z lewej komory serca. Szczury uśmiercano wykonując w narkozie eterowej przezsercową perfuzję fizjologicznym roztworem NaCl przez okres 3 minut. Następnie po otwarciu czaszki wyjmowano mózgowie wraz z krótkim odcinkiem rdzenia szyjnego i dzielono je wzdłuż spoidła wielkiego na dwie połowy określając ich masę. Radioaktywność obu części mózgu i 1 ml krwi mierzono w scyntylacyjnym liczniku studzienkowym SE-2 współpracującym z przelicznikiem Pt-76a firmy Polon i drukarką VAG w czasie, zapewniającym dokładność statystyczną 3%. Wyniki wyrażano w postaci współczynnika określającego stosunek aktywności właściwej mózgu do aktywności właściwej krwi. Znamienność statystyczną uzyskanych wyników w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej oceniono przy zastosowaniu testu *t* Studenta.

W badaniach izotopowych zwierzętom nie podawano nadchloranu potasu celem zablokowania wychwytu nadtechnetanu przez spłot naczyńiowy mózgu.

Dodatkową grupę doświadczalną stanowiły 3 zwierzęta, u których wywołano 15 minutową śmierć kliniczną i po reanimacji pozostawiono przy życiu przez okres 5, 7 i 12 dni. Zwierzętom tym na 2 godz. przed uśmierceniem wstrzykiwano dożylnie 2% roztwór błękitu Evansa w objętości 0,2 ml. Zwierzęta uśmiercano w narkozie eterowej wykonując krótkotrwałą przeszsercową perfuzję 0,9% NaCl (30 s) i 10% roztworem zbuforowanej formaliny. Mózgi utrwalone *in situ* po wyjęciu poddano w całości ocenie makroskopowej, a następnie krojono je w płaszczyźnie czołowej na 4 bloki, które oglądano pod lupą poszukując wynaczyńień błękitu Evansa.

## WYNIKI

Skuteczność reanimacji różniła się w zależności od czasu śmierci klinicznej zwierząt. W grupie z 10 min śmiercią kliniczną w około 40% przypadków

Tabela 1. Radioaktywność  $^{99m}\text{TcO}_4$  w mózgu szczurów w różnych czasach po przebytej śmierci klinicznej

Table 1.  $^{99m}\text{TcO}_4$  radioactivity in the rat brain in different survival time after clinical death

Czas przeżycia Time of survival	Czas śmierci klinicznej Time of clinical death		Grupa kontrolna Control group
	10 min	15 min	
2 godz. 2 hours	$0,38 \pm 0,04^*$ n = 5	$0,34 \pm 0,02^*$ n = 5	$0,50 \pm 0,04$ n = 8
2 dni 2 days	$0,46 \pm 0,03$ n = 5	$0,48 \pm 0,04$ n = 5	
5 dni 5 days	$0,56 \pm 0,04$ n = 5	$0,51 \pm 0,02$ n = 5	
7 dni 7 days	$0,50 \pm 0,03$ n = 5	$0,52 \pm 0,04$ n = 5	

Wyniki wyrażono jako stosunek aktywności właściwych mózgu do krwi  $\times 10^{-2}$

Results expressed as ratio of the brain to blood specific activities  $\times 10^{-2}$

Średnia arytmetyczna  $\pm$  odchylenie standardowe

Mean  $\pm$  SD

n = liczba zwierząt

n = number of animals

\*p < 0.005

reanimacja była nieskuteczna z powodu nieodwracalnego migotania komór serca lub wtórnego załamania się czynności serca po przywróceniu rytmu zatokowego. W grupie zwierząt z 15 min śmiercią kliniczną reanimacja była nieskuteczna z tych samych przyczyn w około 70% przypadków, a w okresie wiosennym odstąpiono od wykonywania doświadczeń z tak długim czasem śmierci klinicznej ze względu na nieskuteczność zabiegów reanimacyjnych.

Stan ogólny zwierząt w początkowym okresie po reanimacji charakteryzował się zmniejszoną ruchliwością i zaburzeniami statyki. Pomiędzy 2 i 5 dniem po zabiegu ich stan ulegał szybkiej poprawie, a w 5 i 7 dniu po reanimacji szczury obu grup doświadczalnych nie różniły się od zwierząt kontrolnych.

Wyniki badań izotopowych dla poszczególnych czasów obserwacji przedstawiono w tabeli 1. Jak wynika z tabeli 1, mózgi szczurów badane po 2 godz. od zakończenia reanimacji wykazują w obu grupach statystycznie znamienne obniżenie poziomu aktywności w porównaniu do poziomu grupy kontrolnej. W pozostałych przedziałach czasu stężenie nadtechnetanu w mózgach zwierząt doświadczalnych nie wykazuje różnic znamienych statystycznie zarówno w porównaniu z jego stężeniem w mózgach grupy kontrolnej, jak i w porównaniu międzygrupowym.

U zwierząt, którym wstrzyknięto błękit Evansa, nie stwierdzono niebieskiego zabarwienia tkanki na powierzchni mózgu ani na jego poprzecznych przekrojach.

#### OMÓWIENIE

Stan barier naczyniowo-tkankowych, jak również bariery krew – mózg w zastosowanym modelu doświadczalnym, badany był przez Łysenkova (1981a,b) z zastosowaniem  $^{32}\text{P}$  i  $^{131}\text{J}$ -albuminy. Stosując  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  w grupie zwierząt z 5 min śmiercią kliniczną i czasem przeżycia do 3 dni wykazał on zmniejszenie stężenia  $^{32}\text{P}$  w półkulach mózgu i strukturach podkorowych w 30 min po reanimacji ulegające normalizacji w późniejszych czasach. Autor ten stwierdził ponadto zwiększenie radioaktywności w mózdzku i rdzeniu przedłużonym pomiędzy 1 i 6 godz. po reanimacji, a w rdzeniu przedłużonym również po 24 godz. z normalizacją w późniejszych czasach. Zmniejszenie stężenia  $^{32}\text{P}$  w półkulach mózgu i strukturach podkorowych we wczesnym czasie po reanimacji jest zgodne z wynikami naszych badań z nadtechnetanem, pomimo różnych fizjologicznych dróg wychwytu i wydzielania obu związków ( $^{32}\text{P}$  – szpik kostny,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  – tarczyca, żołądek, nerki). Zmniejszenie stężenia w mózgu obu tych traserów w krótkich czasach po reanimacji przemawia przeciwko zwiększonej przepuszczalności bariery krew – mózg wtedy, kiedy występuje kompensacyjne zwiększenie mózgowego przepływu krwi (Kapuściński 1987) i należałoby się spodziewać okresowego “otwarcia” połączeń ścisłych komórek śródbłonna naczyniowego. Mechanizm tego zjawiska jest jednak nieswoisty i polega na zmniejszeniu przechodzenia znaczników do poszczególnych narzą-

dów w okresie poischemicznym, co powoduje, że klirens krwi jest wolniejszy i wykazuje ona wyższą aktywność niż w kontroli.

Przy zastosowaniu  $^{131}\text{J}$ -albuminy w grupie z 10 min śmiercią kliniczną i czasem przeżycia do 6 godzin Łysenkov (1981b) stwierdził u części zwierząt zmiany aktywności w korze mózgu, strukturach podkorowych, mózdzku i rdzeniu przedłużonym, które mogą świadczyć o zwiększonej przepuszczalności bariery krew–mózg. Wyniki tych badań różnią się od naszych obserwacji zapewne z powodu różnic w stosowanej metodycy badań. Łysenkov nie stosował perfuzji naczyń mózgowych przed pobraniem mózgow do pomiarów radioaktywności. Powoduje to, że w przypadku użycia znaczników barierowych około 80% radioaktywności pochodzi z krwi zawartej w naczyniach. Można sądzić, że wyniki badań Łysenkova (1981a,b) odzwierciedlają bardziej różnice w regionalnej objętości krwi niż stan bariery krew–mózg. Przemawiają za tym również obserwacje Mossakowskiego (1978), wykazujące, że w różnych postaciach hipoksji mózgu, w okresie pohipoksyjnym rozwija się uogólnione przekrwienie, zwłaszcza naczyń żylnych z rozsianymi ogniskami o zmniejszonej zawartości krwi w łożysku naczyniowym.

Dienel i Pulsinelli (1986) stosując 30 min niedokrwienie półkul mózgowych u szczurów i badając gromadzenie w mózgu 9 jonów znakowanych różnymi izotopami wykazali, że  $^{63}\text{Ni}$ ,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ,  $^{22}\text{Na}$  i  $^3\text{H}$ -tetracyklina wykazują wyższe stężenie w uszkodzonych obszarach, natomiast m.in.  $^{32}\text{PO}_4$  nie gromadzi się w nieodwracalnie uszkodzonej tkance mózgu. Dienel i Pulsinelli (1986) uważają, że wymienione powyżej związki mogą być użyteczne w diagnostyce ischemicznych uszkodzeń mózgu u ludzi przy użyciu techniki emisyjnej tomografii pozytronowej. Wyniki badań tych autorów wskazują, że  $^{32}\text{PO}_4$  nie jest dobrym traserem do badania stanu bariery krew–mózg w przeciwieństwie do nadtechnetanu.

Brak cech uszkodzenia bariery krew–mózg nawet przy 15 minutowym całkowitym niedokrwieniu mózgowia obserwowanym w naszych warunkach doświadczalnych wydaje się zaskakujący, tym bardziej, że tak długie niedokrwienie powoduje zmiany morfologiczne. Zostały one opisane przez Mossakowskiego i wsp. (1986) oraz Zelman i Mossakowskiego (1988), i ostatnio uzupełnione badaniami mikroskopowo-elektronowymi Majkowskiej (1987a,b). Obraz strukturalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego był jednakże ubogi w stosunku do 10 minutowego pełnego zatrzymania czynności serca i oddechu w warunkach normotermicznych. Morfologiczne wykładniki obrzęku mózgu występowały jedynie we wczesnym okresie obserwacji z lokalizacją ograniczoną do istoty białej. Nie stwierdzono natomiast cech obrzęku cytotoksycznego, stanowiącego typowe następstwo niedokrwienia mózgu (Klatzo 1975; Katzman i wsp. 1977). Wyniki badań mikroskopowo-elektronowych Majkowskiej (1987a,b) dotyczące zmian w korze mózgu i w sektorze  $\text{CA}_1$  hipokampa po takim samym czasie śmierci klinicznej są zgodne z wymienionymi uprzednio obserwacjami. W obu badanych strukturach Majkowska wykazała u zwierząt z 3 dniowym przeżyciem po

reanimacji nieznaczne zmiany dotyczące głównie komórek glejowych, w mniejszym stopniu neuronów. Największe nasilenie zmian obserwowano w późniejszym okresie (5 dni przeżycia) w postaci obrzmienia zakończeń presynaptycznych i zmniejszonej liczby pęcherzyków synaptycznych. U zwierząt z 14 dniowym przeżyciem obserwowane neurony, poza zwiększoną ilością ciał gęstych, nie wykazywały istotnych zmian.

Może się wydawać, że brak wzmożonej przepuszczalności bariery krew – mózg oraz stosunkowo ubogi obraz zmian morfologicznych obserwowane w tym modelu nie są zgodne z przyjętym poglądem o dużej wrażliwości ośrodkowego układu nerwowego na niedokrwienie. Jednakże nowe badania *in vivo* na modelach zwierzęcych i u pacjentów wykazały, że maksymalny okres odwracalnej śmierci klinicznej w normotermii nie wynosi 5 minut, ale może trwać do 20 minut (Safar i wsp. 1982). Nie oznacza to, że dłuższy okres niedokrwienia mózgu nie pozostawia trwałych zaburzeń behawioralnych (Hendrickx i wsp. 1984). Niezłina i wsp. (1987) wykazali w tym samym modelu doświadczalnym, że 5 minutowa śmierć kliniczna, przy 8 miesięcznej obserwacji zwierząt, powoduje długotrwałe zmiany niektórych odruchów warunkowych. Badania przeprowadzone w naszym Instytucie z zastosowaniem tego modelu ujawniły obecność przeciwciał antyneuronalnych w surowicy krwi szczurów od 7 dnia przeżycia (Mossakowski, Krajewski 1987), co może wskazywać na udział mechanizmu immunologicznego w rozwoju encefalopatii poresuscytacyjnej. Szumańska i wsp. (1988) badali przy użyciu metod cytochemicznych aktywność fosfatazy zasadowej i cyklazy adenylowej w naczyniach mózgu w tym samym modelu doświadczalnym. Wykazali oni zmniejszenie aktywności obu enzymów w 6 i 24 godzinie po reanimacji, aż do zaniku aktywności cyklazy adenylowej po 24 godzinach przeżycia. W 3 dni po reanimacji aktywność obu enzymów wzrastała, przy przemieszczaniu się już we wcześniejszych czasach lokalizacji fosfatazy zasadowej z powierzchni luminalnej śródbłonnów do ich części abluminalnej i błony podstawnej. Może to świadczyć o zwiększeniu czynnego transportu metabolitów i zmianie integralności złącza naczyniowo-tkankowego.

Brak zaburzeń bariery krew – mózg w obecnej serii badań jest zgodny z poglądem innych autorów, zdaniem których śródbłonek naczyń mózgowych jest mniej wrażliwy na niedokrwienie niż neurony (Olsson i wsp. 1971). Wprawdzie niektórzy autorzy posługując się metodą mikroskopii elektronowej wykazali przechodzenie trasaera białkowego przez śródbłonek naczyń mózgowych w pierwszych minutach od rozpoczęcia niedokrwienia mózgu (Loosinsky i wsp. 1979), wydaje się że jest to niewystarczające do wytworzenia ilościowo znaczących zmian w przechodzeniu takich traserów jak nadtechnetan czy błękit Evansa.

Morfologiczne obserwacje Mossakowskiego i wsp. (1986) przeprowadzone w tym samym modelu sugerują naczyniopochodny mechanizm obrzęku mózgu przy braku cech obrzęku cytotoksycznego, stanowiącego typowe następstwo niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (Klatzo 1975).

Występowanie obrzęku mózgu we wczesnym okresie po reanimacji przy braku zaburzeń przepuszczalności bariery krew—mózg wydaje się wskazywać, że mamy w tym wypadku do czynienia z obrzękiem jonowym. W związku z hipotezą czynności buforowej gleju Young i wsp. (1987) proponują zamianę terminu “obrzęk ischemiczny”, jako formy przejściowej, charakteryzującej się przyrostem wody w mózgu przed uszkodzeniem mechanizmów barierowych (Katzman i wsp. 1977), terminem “obrzęk jonowy”, w którego rozwoju istotną rolę odgrywają różne w czasie przesunięcia jonów sodu i potasu. Obrzęk jonowy łatwo odróżnić od obrzęku naczyniopochodnego, ponieważ nie występuje w nim penetracja dużych cząstek przez barierę naczyniowo-mózgową. Znaczna utrata potasu z tkanki przy przyroście sodu i wody (przesunięcie jonów netto) różnicuje ten obrzęk od obrzęku cytotoksycznego. Obrzęk jonowy powinien bezpośrednio odzwierciedlać nasilenie uszkodzenia elementów komórkowych.

#### BLOOD—BRAIN BARRIER IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF CLINICAL DEATH IN RATS

##### Summary

Clinical death was induced in adult rats for a period of 10 and 15 min by intrathoracic compression of the cardiac vessels bundle at the base of the heart. Resuscitation was performed by means of external cardiac massage with artificial ventilation and the animals were allowed to survive 2 hrs, 2, 5 and 7 days. In the postresuscitation period  $^{99m}\text{TcO}_4$  was i.v. injected for 2 hrs and after withdrawal of blood samples and transcardiac perfusion with the saline animals were sacrificed. Evans blue was i.v. injected to a separate group of animals with 15 min of clinical death and they were sacrificed 5, 7 and 12 days after resuscitation. Isotope studies showed decrease concentration of pertechnetate in the brains 2 hrs after resuscitation, however, in both experimental groups no abnormal increase of concentration was observed in follow-up measurements as compared with the control.

Macroscopic examination of surface and sections of brain did not show colouring of tissue characteristic for transfer of Evans blue through the vessel wall. The results revealed no increased permeability of the blood—brain barrier for the above mentioned tracers in this experimental model.

#### БАРЬЕР КРОВЬ—МОЗГ В МОДЕЛИ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ КРЫС

##### Резюме

Взрослые крысы подвергались 10 и 15—минутной клинической смерти после подавления сосудистого пучка сердца. Животные убивались в 2 часа, 2, 5 и 7 дней после реанимации, а на 2 часа перед умерщвлением вводилось внутривенно  $^{99m}\text{TcO}_4$ . Трём крысам убитым 5, 7 и 12 дней после 15-минутной клинической смерти, вводился интравенноз эвансблау. Изотопные исследования показали статистически знаменательное понижение мозговой концентрации  $^{99m}\text{TcO}_4$  в 2 часа после реанимации. В остальных исследуемых периодах прожития в обеих экспериментальных группах на обнаружено увеличения концентрации этого маркера по сравнению с контрольной группой. В макроскопическом исследовании поверхности и разрезов мозга не было окраски тканей, свидетельствующей о проникнове-



нии зьянсблау вне сосудистого ложа. Полученные результаты свидетельствуют о отсутствии увеличенной проницаемости барьера кровь—мозг для вышеупомянутых соединений в исследованных периодах времени употребленной экспериментальной модели.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L.: Central nervous system vulnerability in hypoxic states. Isotope uptake studies. W: Selective Vulnerability of the Central Nervous System in Hypoxia. Red. W. H. McMenemey and J. F. Schade. Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1963, 63—78.
2. Crone C.: The permeability of capillaries in various organs determined by use of the indicator diffusion method. *Acta Physiol. Scand.*, 1963, 58, 292—305.
3. Dienel G. A., Pulsinelli W. A.: Uptake of radiolabeled ions in normal and ischemia-damaged brain. *Ann. Neurol.* 1986, 19, 465—472.
4. Hendrickx H. H. L., Safar R., Miller A.: Asphyxia cardiac arrest and resuscitation in rats. II. Long term behavioral changes. *Resuscitation*, 1984, 12, 117—124.
5. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew—mózg u szczurów. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 45—64.
6. Kapuściński A.: Mózgowy przepływ krwi w doświadczalnym modelu śmierci klinicznej u szczurów. *Neuropat. Pol.*, 1987.
7. Katzman R., Clasen R., Klatzo I., Meyer J. S., Pappius H. M., Waltz A. G.: Report of the joint committee for stroke resources. 4. Brain edema in stroke. *Stroke*, 1977, 8, 512—540.
8. Klatzo I.: Brain Edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—3.
9. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *Nervous System. Vol. 1. The basic neuroscience.* Red. D. B. Tower. Raven Press, New York, 1975, 313—322.
10. Korpaczew V. G., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirovanije kliničeskoj smerti i postreanimatornoj bolezni u krysz. *Patoł. Fizjol. Eksp. Terapija*, 1982, 3, 78—80.
11. Lossinsky A. S., Garcia J. H., Iwanowski L., Lightfoote W. E.: New ultrastructural evidence for a protein transport system in endothelial cells of gerbil brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1979, 105—110.
12. Łysenkov S. P.: Pronicajemost gisto-gematiczeskich barierow dla radioaktywnogo P<sup>32</sup> w postreanimatornom periodie. W: *Naruszenia gomeostaza pri ekstriemalnych i terminalnych sostojanijach.* Min. Zdrovoochranienija SSSR. Novosybirskij Gosudarstviennyj Medicinskij Institut. Red. W. G. Korpaczew, Ł. Z. Tiel, 1981, 48—51.a.
13. Łysenkov S. P.: Pronicajemost gisto-gematiczeskich barierow dla <sup>131</sup>I-albumina w ranniem post-reanimatornom periodie. W: *Ekstriemalnyje i terminalnyje sostajanja.* Min. Zdrovoochranienia Kazachskoj SSR, Ałma-Atskij Gosudarstviennyj Medicinskij Institut. Red.: W. G. Korpaczew, Ł. Z. Tiel. 1981, 23—25.b.
14. Majkowska J.: Pathophysiological characteristics of clinical death model in rats. *Acta Neurol. Scand.*, 1986 (w druku).
15. Majkowska J.: Experimental global cerebral ischemia in rats. I. Ultrastructural changes in cerebral cortex in the postischemic period. *Neuropat. Pol.*, 1987a, (złożona do druku).
16. Majkowska J.: Experimental global cerebral ischemia in rats. II. Ultrastructural changes in CA1 sector of hippocampus in the post-ischemic period. *Neuropat. Pol.*, 1987b, (złożona do druku).
17. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*, Red. J. Cervós-Navarro, E. Betz, G. Ebhardt, R. Ferszt, R. Wüllenweber. Raven Press. New York 1978, 20, 161—171.
18. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Doniesienie wstępne. Neuropatol. Pol.*, 1986, 24, 471—489.
19. Mossakowski M. J., Krajewski S.: Antineural antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia. 20 Donau Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 8—10 Oct., 1987. *Streszczenia*, Red. F. Gerstenbrand, s. 44.

20. Niezlina H. I., Mutuskina E. A., Tołova S. V., Usłownoreflektornaja diejatielnost u kryś posle piatiminutnoj ostanovki krovoobraszczenija. Zh. Vyssh. Nerv. Dejat, 1987, 37, 741–749.
21. Olsson Y., Crowell R. M. and Klatzo I.: The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. Acta Neuropathol. (Berl.), 1971, 18, 89–102.
22. Pappius H. M.: Otiiek gołovnogo mozga. 5 Tbilisskij Simpozium po Mozgovomu Krovoobraszczeniju, 20–23.04.1983. Red. G. I. Mchedlishvili. Mecniereba, Tbilisi, 1986. Dyskusja na temat klasyfikacji obrzęku mózgu, s. 120–123.
23. Safar P., Gisvold S. E., Vaagens P., Hendrickx H. H. L., Bar-Joseph G., Bircher N., Stezoski W., Alexander H.: Long-term animal models for the study of global brain ischemia (GBI). W: Protection of tissues against hypoxia. Proc. of Intern. Symp. on Protection of Tissues against Hypoxia. Beerse, Belgium, 15–17.09.1982. Red. A. Wanguier, M. Borgers, W. K. Amery. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, N. Y., Oxford, 1982, 147–170.
24. Szumańska G., Mossakowski M. J., Januszewski S.: Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej i cykazy adenylowej w kapilarach mózgu szczura w następstwie niedokrwienia poreanimacyjnego. Neuropat. Pol., 1988, 26, w druku.
25. Young W., Rappaport Z. H., Chalif D. J., Flamm E. S.: Regional brain sodium, potassium and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. Stroke, 1987, 18, 751–759.
26. Zelman I. B., Mossakowski M. J.: Remote pathological brain changes in rats following experimentally induced clinical death. Neuropat. Pol., 1988, 26 (25–36).

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

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

## MORPHOMETRIC STUDIES OF THE NERVE FIBERS IN CORPUS CALLOSUM OF RATS EXPOSED TO MILD HYPOXIA

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Lesions of the oligodendroglia-myelin complex as well as of axons in hypoxia are known from several observations and studies. In rare cases of arteriosclerosis and hypoxia produced by various noxious agents, the syndrome of delayed hypoxic encephalopathy with diffuse demyelination was described (Raine 1984). Intoxication with cyanide produces also severe demyelination in the cerebral commissural system (Hirano et al. 1967; Foncin et al. 1986). The oligodendroglia also show great vulnerability to the action of this poison (Mossakowski, Gajkowska 1976; Mossakowski 1978). Results of our karyometric and cytophotometric studies on rats exposed to hypoxia confirmed the great sensitivity of oligodendroglia in the corpus callosum to oxygen deficiency (Wender et al. 1988b).

Mild hypoxia induces changes in the chemistry of myelin: marked increase in cholesterol esters and lysophosphatidylcholine content in the myelin fraction, without evident demyelination (Wender et al. 1987). The structure of myelin is apparently normal. However, the question if the myelin-axon interrelationship undergoes some deviations is up till now open. As a contribution to the problem we have studied the morphometry of myelin and axons in the corpus callosum of rat brain after moderate experimental hypoxia, of an intensity not leading to demyelination.

### MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed on Wistar rats. Mild hypoxia was induced by placing the animals for 30 minutes in a glass chamber, containing 7% of oxygen in appropriate gas mixture, the composition of which was secured by a

flowmeter and a rotometer. For more details of the experimental techniques see our previous work (Wender et al. 1988a).

At 4 h, 24 h, 14 days and 60 days after hypoxia the brains of four animals from each group were perfused through the aorta with a mixture of 2% glutaraldehyde and 3.4% paraformaldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate at pH 7.4. Narrow strips of corpus callosum were excised and kept in cold fixative for additional 3 hours and, then, postfixed for 1 hour in 1% osmium tetroxide, embedded in Epon, cut on Reichert's Ultratome, stained with uranium and lead salts and photographed in an Opton electron microscope. The measurements were performed on prints with Reichert's Multioperational Planimeter. The results were expressed in working units after conversion based on the value of the myelin unit — 12 nm. For more details of the used method, see our previous paper (Wender et al. 1986).

## RESULTS

Mean axon diameter and area, expressed in working units, were significantly greater in corpus callosum of rats 24 hours after hypoxia than the values found in normal animals. In contrast to the findings, the respective means were

Table 1. Nervous fibers of corpus callosum in rats exposed to the action of mild hypoxia  
Tabela. 1. Włókna nerwowe spoidła wielkiego szczurów wystawionych na działanie łagodnego niedotlenienia

	Control Norma	4 hours after hypoxia 4 godziny po niedotlenieniu	24 hours after hypoxia 24 godziny po niedotlenieniu	14 days after hypoxia 14 dni po niedotlenieniu	2 months after hypoxia 2 miesiące po niedotlenieniu
Thickness of myelin (in working units) Grubość mieliny (w jednostkach roboczych)	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.02*	0.11 ± 0.02*	0.10 ± 0.02*
Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny	8.0 ± 3.3	8.1 ± 2.7	8.7 ± 5.2	9.1 ± 3.2*	9.2 ± 3.0*
Axon diameter (in working units) Przekrój aksonu (w jednostkach roboczych)	0.83 ± 0.28	0.92 ± 0.31	1.02 ± 0.33*	0.71 ± 0.16*	0.74 ± 0.36**
Axon area (in working units) Pole aksonu (w jednostkach roboczych)	15.91 ± 6.21	17.16 ± 5.30	19.17 ± 7.12*	13.06 ± 5.74*	11.23 ± 4.62**

\* difference statistically significant in analysis of variance ( $p \leq 0.05$ )  
różnice statystycznie istotne przy analizie wariancji ( $p \leq 0.05$ )

\*\* difference highly statistically significant in analysis of variance ( $p \leq 0.01$ )  
różnice wysoce istotne statystycznie przy analizie wariancji ( $p \leq 0.01$ )

significantly lower in groups of rats studied 14 and 60 days after exposure to the action of mild hypoxia. Mean thickness of myelin (in working units based on the generally accepted value for myelin unit – 12 nm) was significantly greater in animals studied 24 hours, 14 days and 2 months after the hypoxia, when compared with the normal values. Mean number of myelin lamellae was also greater in animals studied 14 and 60 days after the experimental hypoxia (Tab. 1).

Table 2. The regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter (mean) in corpus callosum of rats exposed to the action of mild hypoxia. Axon diameter in working units

Tabela 2. Równanie regresji liczby blaszek mieliny do przekroju aksonu (średnia) w spoidle wielkim szczurów wystawionych na działanie łagodnego niedotlenienia. Przekrój aksonu w jednostkach roboczych

Control Norma		24 hours after hypoxia 24 godziny po niedotlenieniu		60 days after hypoxia 60 dni po niedotlenieniu	
Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny	Axon diameter (mean) Przekrój aksonu (średnia)	Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny	Axon diameter (mean) Przekrój aksonu (średnia)	Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny	Axon diameter (mean) Przekrój aksonu (średnia)
1	0.46	3	0.54	1	0.34
2	0.93	4	0.74	2	0.48
3	0.66	5	0.71	3	0.62
4	0.77	6	0.74	4	0.47
5	0.81	7	0.82	5	0.66
6	0.74	8	0.85	6	0.65
7	0.80	9	0.89	7	0.89
8	0.84	10	1.05	8	0.78
9	0.85	11	0.94	9	0.92
10	1.05	12	0.92	10	0.90
11	1.07	13	1.21	11	1.31
12	1.02	14	1.21	12	1.01
13	1.07	15	0.83	13	1.20
14	1.01	16	1.03	15	1.65
15	0.61	17	1.39	17	1.78
16	0.61	18	0.95		
17	0.80	19	1.37		
18	1.64	20	1.50		
		21	1.61		

Significant regression  
of II grade  
(parabolic)

Istotna regresja stop-  
nia II (paraboliczna)

Significant regression  
of II grade  
(parabolic)

Istotna regresja stop-  
nia II (paraboliczna)

Significant regression  
of II grade  
(parabolic)

Istotna regresja stop-  
nia II (paraboliczna)

Table 3. Nervous fibers of corpus callosum in rats exposed to the action of mild hypoxia. Division into classes according to Dx (diameter of axon)  
 Tabela 3. Włókna nerwowe spoidła wielkiego szczurów wystawionych na działanie łagodnego niedotlenienia. Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu)

	Control Norma	4 hours 4 godziny	24 hours 24 godziny after hypoxia po niedotlenieniu	14 days 14 dni	2 months 2 miesiące	
			Thickness of myelin Grubość mieliny			
Class I Klasa I	0.06±0.03	0.07±0.02	0.10±0.02*	0.10±0.03*	0.09±0.02*	
Class II Klasa II	0.08±0.04	0.09±0.02	0.10±0.01*	0.11±0.02*	0.11±0.02*	Mean Dx = 0.86
Class III Klasa III	0.11±0.03	0.10±0.03	0.13±0.04*	0.14±0.05	0.17±0.05*	średnia Dx = 0.86
			Number of myelin lamellae Liczba blaszek mieliny			
Class I Klasa I	6.6±2.2	7.0±3.1	7.5±4.0	4.5±2.2**	4.9±1.8**	Class I = Dx ≤ 0.58 (25%)
Class II Klasa II	8.0±3.1	8.5±4.2	9.9±6.3	9.2±2.6**	8.7±3.0**	Class II = 0.58 < Dx ≤ 1.13 (50%)
Class III Klasa III	10.2±4.3	10.9±3.7	10.2±4.1	10.3±4.2	9.8±3.4*	Class III = Dx > 1.13 (25%)

\* difference statistically significant in analysis of variations  $f < 0.05$   
 różnice statystycznie istotne w analizie wariancji  $f < 0.05$

\*\* difference highly statistically significant in analysis of variations  $f < 0.01$   
 różnice wysoce istotne statystycznie przy analizie wariancji  $f < 0.01$

The ratio of the number of myelin lamellae to the axon diameter expressed as regression equation, showed no differences between the experimental and control animals. In all groups a significant regression of II grade (parabolic) was obtained (see Tab. 2).

The studied myelin parameters (thickness and number of myelin lamellae) were related to axon diameter, in axon classes containing respectively, 25% (smallest axons), 50% (medium axons) and 25% (largest axons) of all axons in experimental and control animals. The above described differences in the studied parameters of axon and myelin were similar in all classes of axons (Tab. 3).

#### DISCUSSION

The myelin-oligodendroglial complex as well as axons of the central nerve fibers are highly sensitive to the action of different external factors. Aggressive exogenous agents may lead to necrotic changes of the total nervous fibers or to complete or incomplete demyelination (Smith, Benjamins 1984). Less intense stimuli, as mild hypoxia provoke only some derangements of membranous structures in the myelin, expressed by deviations in the pattern in myelin lipids, even if no evident morphological signs of demyelination are noticeable (Wender et al. 1988a). In our further studies concerning the alterations of white matter provoked by hypoxia, we have performed karyometric and cytophotometric studies of oligodendroglia (Wender et al. 1988b). We have established enlargement of cell nuclei in the early period and some nuclear shrinkage in the experimental groups studied after the longer time interval after hypoxia. Cytophotometric analysis of the relative DNA content in cell nuclei of oligodendroglia has indicated marked deviations in extinction of DNA after moderate hypoxia.

The heretofore presented morphometric evaluation of the apparently normal nervous fibers in corpus callosum of rats demonstrated some increase of mean axon and myelin parameters 24 hours after the action of mild hypoxia. The only explanation of this observation seems to involve edematous changes of the axoplasm, accompanied by loosening of the myelin structure.

In later periods (14 and 60 days) after the hypoxia, morphometric studies of the nervous fibers of corpus callosum have disclosed that the mean thickness of myelin and number of myelin lamellae were greater, whereas the axon parameters (diameter and area) smaller than in the control group. According to our opinion, the obtained results should be explained by some kind of selective destruction and disappearance of myelinated fibers in the course of hypoxia. The most stable should be the axons, which are smaller, but exhibit a relatively thick myelin sheath, whereas the bigger axons with relatively lower number of myelin lamellae would be more sensitive. The selective disappearance of

nervous fibers in corpus callosum, secondary to neuronal degeneration, so typical for the pathology of hypoxia, is evidently the decisive factor provoking the changes observed in our morphometric studies in myelin and axons.

#### CONCLUSIONS

1. 24 hours after the action of hypoxia nerve fibers in corpus callosum of rats show an increase of the mean parameters of axons and myelin, provoked by edematous changes of axoplasm, accompanied by loosening of myelin structure.

2. In the later periods after hypoxia, the mean thickness of myelin and the number of myelin lamellae are greater, whereas the mean diameter and area of axons are smaller than in the control group.

3. Mild hypoxia induces selective destruction and disappearance of myelinated fibers. Most stable are smaller axons exhibiting a relatively thick myelin sheath, whereas bigger ones are more sensitive, featuring a relatively smaller number of myelin lamellae.

#### BADANIA MORFOMETRYCZNE WŁÓKIEN NERWOWYCH SPOIDŁA WIELKIEGO SZCZURÓW PODDANYCH DZIAŁANIU ŁAGODNEGO NIEDOTLENIEŃ

##### Streszczenie

Szczury rasy Wistar poddano łagodnemu niedotlenieniu przez 30 minut w komorze szklanej o zawartości 7% tlenu. Po 4 i 24 godz. oraz po 14 i 60 dniach od zakończenia doświadczenia zwierzęta perfundowano mieszaniną glutaraldehydu i paraformaldehydu, a następnie skrawki spoidła wielkiego po utrwaleniu i zabarwieniu badano w mikroskopie elektronowym. Wykonane zdjęcia poddano analizie morfometrycznej na wielozadaniowym planimetrze Reicherta. Wyniki wyrażono w jednostkach roboczych po przeliczeniu według znanej wielkości jednostki mieliny – 12 nm.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Włókna nerwowe spoidła wielkiego szczurów wykazują 24 godziny po niedotlenieniu wzrost średnich wartości aksonu i mieliny, co jest wywołane przez zmiany obrzękowe aksoplazmy, z towarzyszącym rozluźnieniem struktury mieliny.

2. W późnym okresie po niedotlenieniu średnia grubość mieliny i liczba blaszek mieliny są większe, podczas gdy średni przekrój i pole aksonu mniejsze niż w grupie kontrolnej.

3. Łagodne niedotlenienie wywołuje selektywne zniszczenie i zanik włókien mielinowych; najbardziej odporne są mniejsze aksony, ale ze względnie grubą osłonką mielinową, bardziej wrażliwe natomiast aksony większe, lecz o względnie mniejszej liczbie blaszek mielinowych.

#### МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ СЛАБОЙ ГИПОКСИИ

##### Резюме

Крысы расы Wistar подвергались 30-ти минутной слабой гипоксии в стеклянной камере, содержащей 7% кислорода. По истечении 4 и 24 часов, а также 14 и 60 дней после эксперимента проводилась перфузия животных смесью glutaralдегида и параформальде-



гида. Затем, после фиксации и окрашивания, срезы мозолистого тела исследовались электронно-микроскопически. Фотографии были морфометрически анализированы многозадачным планиметром Райхерта. Результаты были выражены в рабочих единицах после пересчета по известной величине единицы миелины — 12 нм.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. В нервных волокнах мозолистого тела крыс 24 часа после гипоксии обнаруживается увеличение средних аксона и миелины, вызванное набуханием аксоплазмы с сосуществующим разрежением структуры миелины.

2. В позднем постигипоксическом периоде средняя толщина миелины и количество миелиновых бляшек больше, тогда как среднее поперечное сечение и площадь аксона меньше чем в группе контрольной.

3. Слабая гипоксия вызывает селективное разрушение и убыток миелиновых волокон: мелкие, но со сравнительно толстой миелиновой оболочкой — самые стойкие, а аксоны по-больше, но со сравнительно меньшим количеством миелиновых бляшек являются более чувствительными.

#### REFERENCES

1. Foncin J., Perre J., Rajadfetra N.: Cyanide encephalopathy: an experimental study with transmission electron microscopy. X Intern. Congress of Neuropathol., Stockholm 1986, Abstracts, 212.
2. 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.
3. Mossakowski M.: Morfologia i histochemia uszkodzeń gleju wywołanych cyjankami sodu w hodowli tkankowej. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 53—63.
4. Mossakowski M., Gajkowska B.: Obraz mikroskopowo-elektronowy uszkodzeń gleju wywołanych cyjankami sodu w hodowli pozaustrojowej. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 441—449.
5. Raine C.: The neuropathology of myelin diseases. In: *Myelin*. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 259—310.
6. Smith M., Benjamins J.: Model systems for study of perturbations of myelin metabolism. In: *Myelin*. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 441—487.
7. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Myelin lipids of the rat brain in experimental hypoxia. *Exp. Pathol.*, 1988a, 33, 59—63.
8. Wender M., Goncerzewicz A.: The effect of fatty acid deficient diet on the developing optic nerve of the rat. *J. Hirnforsch.*, 1986, 27, 435—440.
9. Wender M., Szczech J., Godlewski A., Grochowalska A.: Karyometric and cytophotometric studies of the oligodendroglia in the corpus callosum of rats after hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1988b, 26 (in press).

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

ELŻBIETA KIDA, KRYSZYNA RENKAWEK

## MORPHOLOGICAL ALTERATIONS OF RAT SUBSTANTIA NIGRA INDUCED BY SHORT-LASTING ANOXIA *IN VITRO*

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

Besides a number of different abnormalities, dopamine (DA) increased concentration in the brainstem and elevation of dopamine metabolites (dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid) in the brainstem, deep gray matter and cortex in a rat model of ischemia were recently reported (Iijima et al. 1986). This elevated DA concentration was mainly attributed to its increased synthesis. The pattern of structural changes or sensitivity of substantia nigra (SN) cells in ischemia or anoxia has not been fully elaborated. Animal models of ischemia showed a relatively good preservation or only haphazardous injury of SN *in vivo* (Pulsinelli, Brierley 1979). A recently described animal model of complete ischemia of the brain, however, revealed a constant, rather selective SN damage (Mossakowski et al. 1986).

The aim of the present study was to examine the direct effect of short-lasting oxygen deprivation on the morphological properties of SN in a model of anoxia induced *in vitro*.

### MATERIAL AND METHODS

Substantia nigra was dissected out under microscopic control from the rostral midbrain of newborn Wistar rats under sterile conditions, placed in a pool of medium and cut into small pieces. Thin slices of SN (about 1–2 mm<sup>2</sup>) were placed on collagen-coated glass coverslips and kept at 36,5°C in Carrel flasks. The cultures were grown in a medium composed of 25% human serum, 65% Minimal Essential Medium, 10% chick embryo extract supplemented with 600 mg% glucose and 100 U/ml penicillin. The cultures were fed twice weekly. On the 14th day *in vitro* (DIV), at the stage of SN development *in vitro* when well differentiated nerve cells with numerous synaptic contacts are

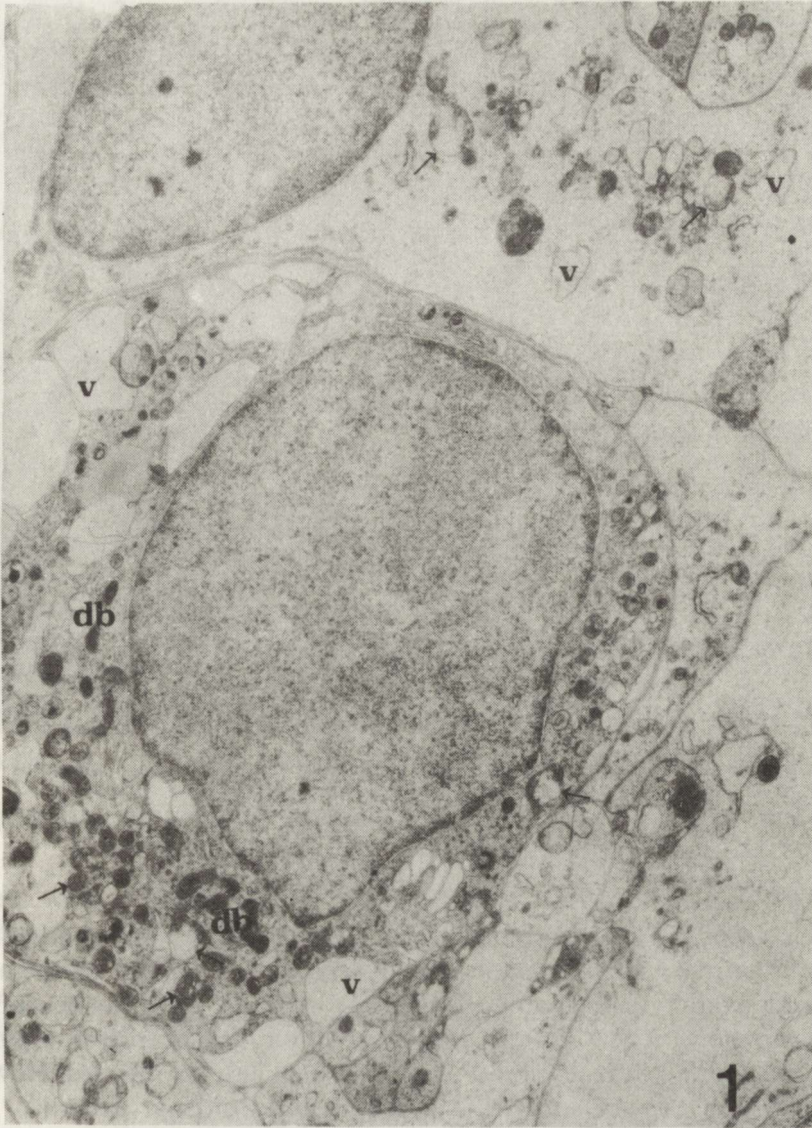
present, experimental cultures were transferred for 30 minutes to a nitrogen atmosphere (100%) in Carrel flasks adapted for gas flow (Kraśnicka et al. 1967). Control cultures were grown in standard conditions. After 2, 24, 48 and 72 h post anoxia both experimental and control cultures were stained with cresyl violet or processed for electron microscopy according to the previously described method (Renkawek et al. 1982). A total number of 40 cultures was used in these experiments.

## RESULTS

Under the light microscope no significant morphological alterations could be found in the experimental SN cultures as compared with the control group.

Under the electron microscope well preserved, differentiated nerve cells, synaptic contacts of various types and glial cells represented mainly by astrocytes were found in the control cultures of SN (for detail see Kida 1986). Ultrastructural alterations observed in experimental, exposed to anoxia, SN cultures were most severely expressed in the cultures examined 2 h after oxygen deprivation and involved mainly the astroglial cells. Some of the astrocytes had a swollen, electron-lucent cytoplasm with damaged organelles. Nuclear chromatin formed in the nuclei of these cells a thin rim beneath the nuclear envelope. In the cytoplasm numerous vacuoles of various size and enlarged mitochondria with disrupted cristae and clear matrix were present (Fig. 1). In some astroglial cells mitochondria were characterized by a diminished number of irregularly arranged cristae and dark, granular matrix (Fig. 1). Some of the astrocytes in these cultures had dark, condensed mitochondria of elongated shape but well preserved other organelles including granular endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. Sometimes in the cytoplasm membranous or dense bodies were found. Often, astrocytes with swollen cytoplasm contained dilated channels of granular endoplasmic reticulum deprived of ribosomes and enlarged cisternae of Golgi apparatus. A few cells with clumping of the nucleoplasm and condensed organelles were seen.

Nerve cells were better preserved. In some neurocyte cytoplasm large mitochondria with disrupted, short cristae and electron-lucent matrix were present. Besides mitochondrial alterations, distended cisternae of Golgi apparatus, enlarged channels of granular endoplasmic reticulum and vacuoles, sometimes very large, could be traced (Fig. 2). In other, usually small nerve cells, accumulation of the organelles in the cytoplasm around the nucleus and along the long axis of dendritic processes was found (Fig. 3). In these cells mitochondria had a dark or granular matrix, cristae were irregularly arranged. In the cytoplasm large vacuoles, dense bodies and lysosomes were present. Mitochondrial alterations were confined only to a certain number of nerve cells meanwhile in other neurons mitochondria were intact, but even in these cells numerous vacuoles of different size could be found (Fig. 4). In the neuropil swollen astroglial processes were encountered. Synapses showed no alterations,

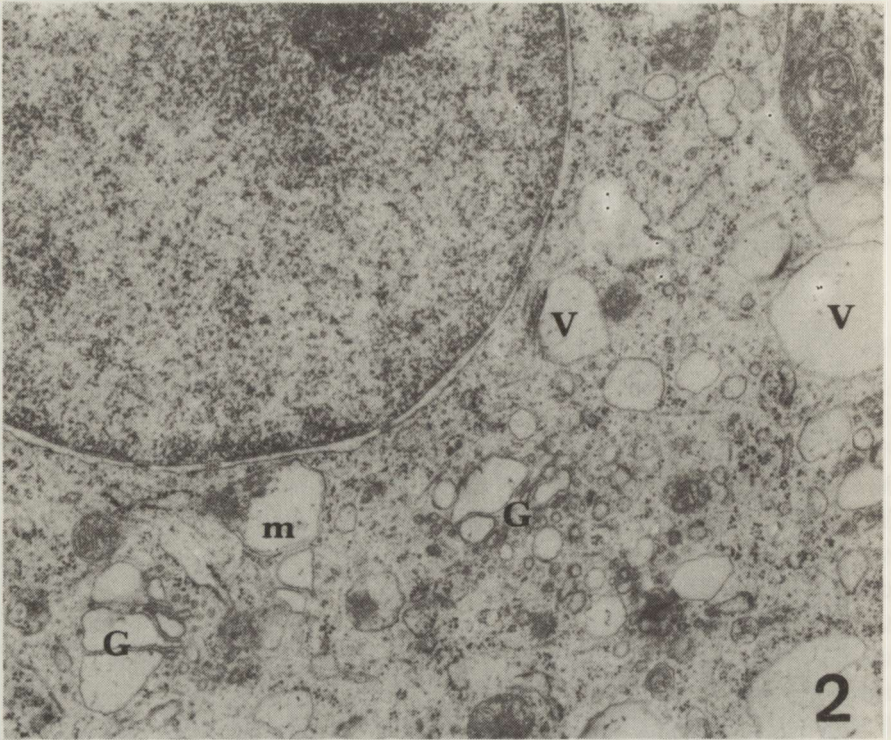


*Fig. 1.* SN culture 14 DIV, 2 h after anoxia. Astroglial cells with damaged mitochondria (arrows), vacuoles (v) and dense bodies (db). Swelling of cellular processes in the neuropil.  $\times 3600$

*Ryc. 1.* Hodowla istoty czarnej 14 dni *in vitro* (DIV), 2 godziny po anoksji. Astrocyty z uszkodzonymi mitochondriami (strzałki), wakuolami (v) oraz ciałami gęstymi (db). Obrzmienie wypustek komórkowych w neuropilu. Pow. 3600  $\times$

however, some of the post synaptic terminals identified as dendrites revealed mild swelling (Fig. 5).

The cultures examined 24 h after anoxia were less affected. Some of glial cells still showed low electron density and swollen cytoplasm. Occasionally astrocytes with electron-lucent cytoplasm containing a diminished number of



*Fig. 2.* The same culture. Nerve cell with vacuoles (v), enlarged cisternae of Golgi apparatus (G) and swollen mitochondria (m).  $\times 9000$

*Ryc. 2.* Ta sama hodowla. Komórka nerwowa zawierająca wakuole (v), poszerzone zbiorniki aparatu Golgiego (G) i obrzmiałe mitochondria (m). Pow. 9000  $\times$

organelles confined to few vacuolar structures and damaged mitochondria with disrupted cristae and membranes could be seen. The nuclei of these cells revealed uniformly dispersed nucleoplasm forming a thin rim beneath the nuclear envelope. A few reactive astrocytes with abundant, rich in organelles cytoplasm and excentrically situated nucleus could also be observed. However, the majority of the glial cells had an intact ultrastructural pattern.

Individual nerve cell characterized by well developed granular endoplasmic reticulum exhibited focal dilatations of its channels with voluminous vacuoles filled with fibrillar material. The other organelles in these cells including mitochondria and Golgi apparatus were not altered. Some of the neuronal cells characterized by a small amount of granular endoplasmic reticulum channels showed mild dilatations of Golgi apparatus cisternae and a few lipid droplets.

The cultures examined 48 and 72 h after anoxia showed only slight ultrastructural alterations, confined to a small number of cells, mainly astrocytes. The majority of neurons and of glial cells revealed intact ultrastructural characteristics (Fig. 6, 7). Sporadically astrocytes with abundant, electron-lucent cytoplasm poor in organelles with large nucleus were seen.

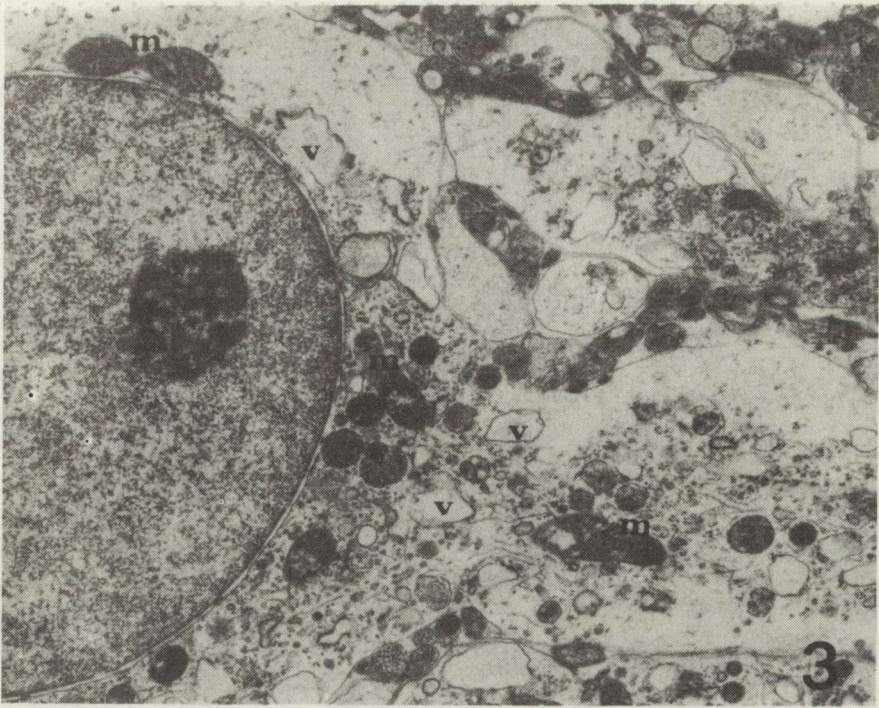


Fig. 3. The same culture. Small nerve cell with accumulation of organelles around the nucleus and along the long axis of the dendritic process. Vacuoles (v), damaged mitochondria (m).  $\times 4800$   
 Ryc. 3. Ta sama hodowla. Mała komórka nerwowa wykazująca nagromadzenie organelli komórkowych wokół jądra i wzdłuż wypustki dendrytycznej. Wakuole (v), uszkodzone mitochondria (m). Pow. 4800  $\times$

There were occasionally nerve cells with focal enlargement of granular endoplasmic reticulum channels and small vacuoles. In some astroglial cells thin, myelin-like lamellar figures could be seen (Fig. 7).

Astroglial cells corresponding to reactive forms were also rarely visible. The glycogen particles in the glial cells and their processes were only slightly increased in number as compared with those in control cultures.

#### DISCUSSION

Short-term anoxia *in vitro* induced no specific morphological changes in rat SN neurons. The alterations observed in neuronal cells seem to be reversible to a great extent as they were less pronounced and frequent in cultures examined in later periods after oxygen deprivation. Structural abnormalities observed in neurons represented thus rather a result of metabolic disturbances than deep cell injury and might reflect transient anaerobic metabolism. Glial cell alterations were more severe confirming the earlier observations of particular sensitivity of these cells to anoxia in tissue culture conditions (Renkawek et al. 1986).

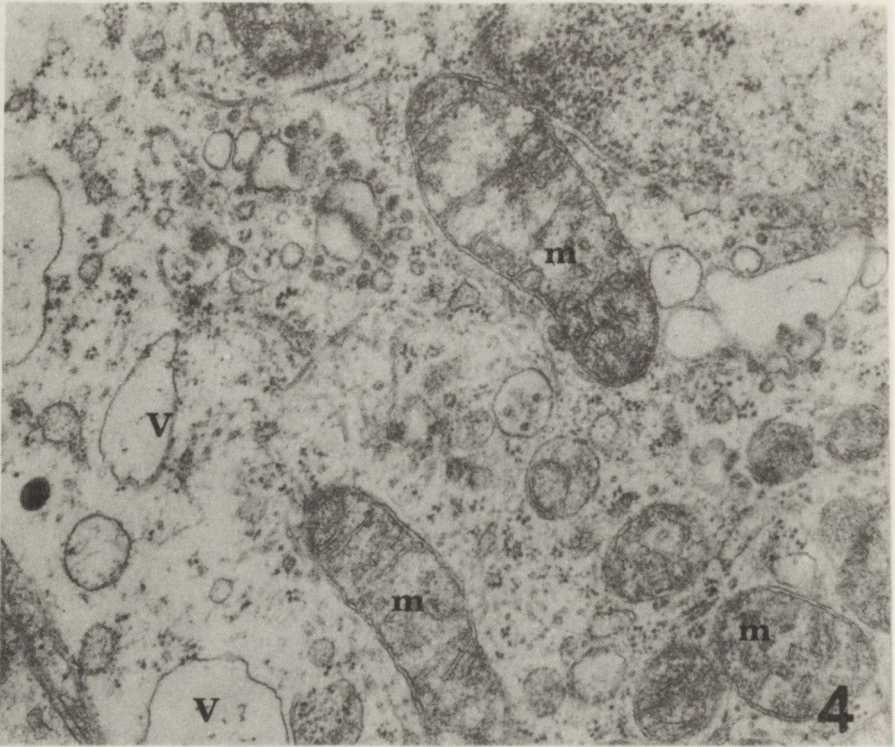
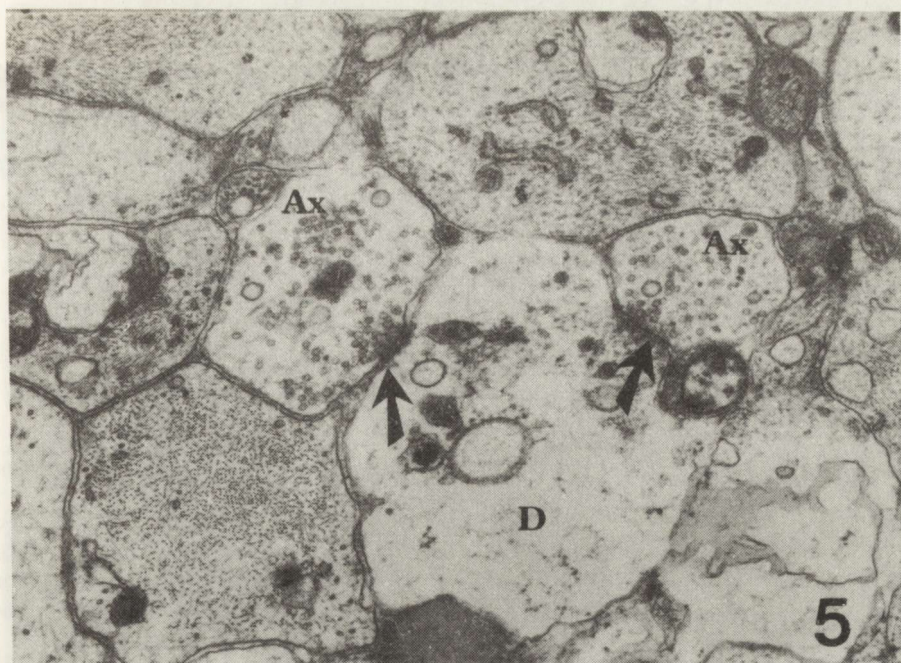


Fig. 4. The same culture. Fragment of cytoplasm of another nerve cell. Well preserved mitochondria (m), vacuoles (v).  $\times 9000$

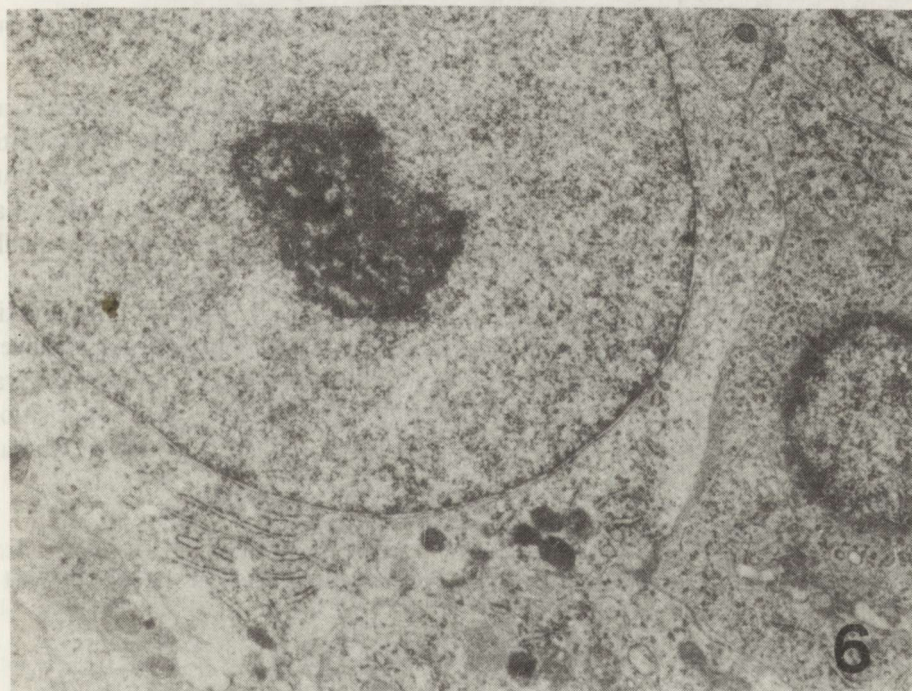
Ryc. 4. Ta sama hodowla. Fragment cytoplazmy innej komórki nerwowej zawierającej prawidłowo zachowane mitochondria (m) i wakuole (v). Pow. 9000  $\times$

The absence of intensive neuronal damage after anoxia in our cultures could be compared to the results of previous experiments performed on cortical slices which showed survival of numerous neurons even although their cellular metabolism was disturbed (Cohen 1962). Temporary, 5 minutes lasting anoxia performed on cerebral slices *in vitro* impaired the ability to reconstitute phosphocreatine, although the other high energy compound, ATP could be restored to a normal level even after 10 minutes of oxygen deprivation (Cohen et al. 1983). Moreover, *in vivo* experiments with rats showed an age-dependent vulnerability to anoxia and a relative resistance of the neonatal brain (Slotkin et al. 1986). The preservation and relative resistance of young tissue to anoxia confirmed also *in vitro* allowed to postulate that the synaptic activity may be mainly responsible for the sensitivity of mature tissue to anoxia (Rothman 1983). However, distinct alterations were reported in cerebellar cultures exposed to anoxia, even in the absence of synaptic contacts (Kraśnicka et al. 1986).

The early morphological alterations observed after both ischemia and anoxia *in vivo* included axonal degeneration (Yu et al. 1972) and perikaryal

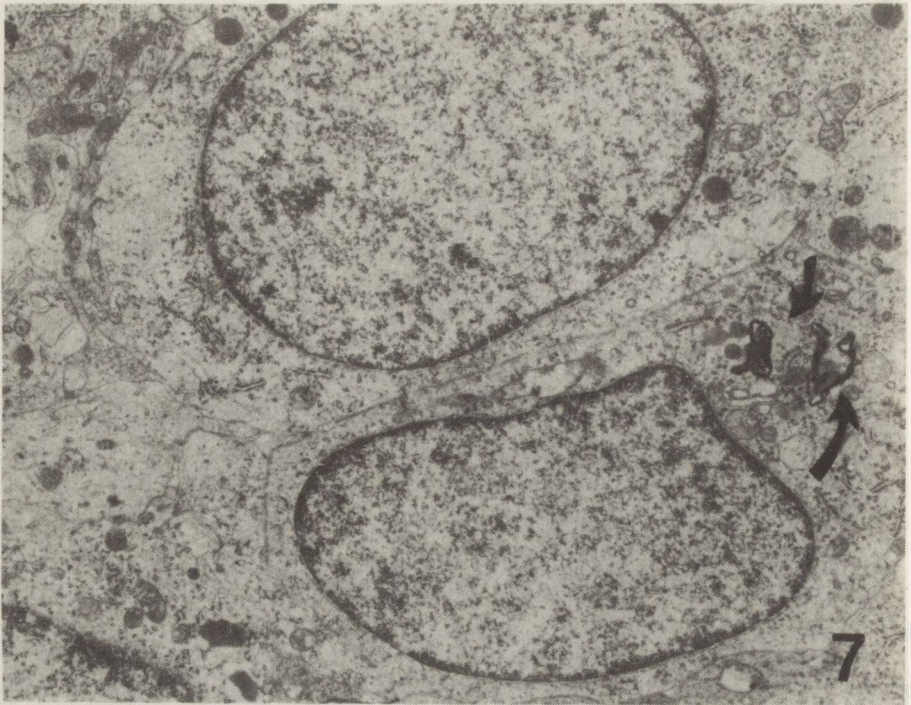


*Fig. 5.* The same culture. Two synaptic contacts (arrows). Well preserved axon terminals filled with small round synaptic vesicles (Ax), slightly swollen dendritic process (D).  $\times 9000$   
*Ryc. 5.* Ta sama hodowla. Dwa zakończenia synaptyczne (strzałki). Prawidłowo zachowane zakończenia aksonalne wypełnione okrągłymi, małymi pęcherzykami synaptycznymi (Ax), nieznacznie obrzmiała wypustka dendrytyczna (D). Pow. 9000



*Fig. 6.* SN culture 48 h after anoxia. Well preserved nerve cells.  $\times 4800$   
*Ryc. 6.* Hodowla istoty czarnej 48 godzin po anoksji. Prawidłowo zachowane komórki nerwowe. Pow. 4800  $\times$





*Fig. 7.* SN culture 72 h post anoxia. Myelin-like lamellar figures in the astroglial cytoplasm.  
× 3600

*Ryc. 7.* Hodowla istoty czarnej 72 godziny po anoksji. Figury mielinopodobne w cytoplazmie astrocytu. Pow. 3600 ×

abnormalities with chromatolysis and Golgi apparatus changes (Bubis et al. 1976). Recent experiments, however, point to rather selective, primary dendritic damage resembling excitotoxin effect (Johansen et al. 1984). In our experiments both perikaryal and dendritic changes, but of mild intensity were found what may have been determined by specific tissue culture conditions and especially lack of afferent innervation.

The relative good preservation of SN neurons exposed to short term anoxia in our experiments suggests their resistance to oxygen deprivation. However, further experiments with prolonged oxygen deficiency and longer survival periods after anoxia seem to be necessary to confirm our supposition representing an approach to evaluation of anoxic changes in SN in human pathology.

ZMIANY MORFOLOGICZNE ISTOTY CZARNEJ SZCZURA PODDANEJ  
KRÓTKOTRWALEMU NIEDOTLENIENIU W WARUNKACH ORGANOTYPOWEJ  
HODOWLI TKANKOWEJ

Streszczenie

Przeprowadzono mikroskopowo-elektronową ocenę zachowania się elementów komórkowych istoty czarnej szczura poddanych 30-minutowemu niedotlenieniu w warunkach organotypo-

wej hodowli pozaustrojowej. Zmiany ultrastrukturalne obecne zarówno w komórkach nerwowych, jak też glejowych były najbardziej nasilone we wczesnym okresie po niedotlenieniu. Przemijający charakter zmian morfologicznych i ich stosunkowo niewielkie nasilenie mogą wskazywać, że istota czarna reprezentuje strukturę mało wrażliwą na niedobór tlenu.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА КРЫСЫ  
ПОДВЕРГНУТОЙ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ В ОРГАНОТИПИЧНОЙ  
ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

Резюме

Проведены электронно-микроскопические наблюдения клеточных элементов черного вещества крысы, подвергнутого 30-ти минутной гипоксии в органотипичной тканевой культуре. Ультраструктурные изменения, обнаруженные как в нервных, так и в глиозных клетках были самыми интенсивными в раннем постгипоксическом периоде. Переходящий характер морфологических изменений и их относительно небольшая интенсивность показывают, вероятно, что черное вещество является структурой мало чувствительной в условиях кислородной недостаточности.

REFERENCES

1. Bubis J. J., Fujimoto T., Ito U., Mrsulja B. J., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian Gerbil. *Acta Neuropathol.*, 1976, 36, 285–294.
2. Cohen M. M.: The effect of anoxia on the chemistry and morphology of cerebral slices *in vitro*. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 337–344.
3. Cohen M. M., Bluhm R., Glonek T., Kopp S., Patel-Mandlik K., Pettegrew J.: In vitro model of stroke. In: *Stroke: animal models. Advances in Biosciences vol. 43*, Ed. V. Stefanovich, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, 1983, 1–11.
4. Iijima S., Hara K., Suga H., Nakamura S., Kameyama M.: Effect of ischemia on hydroxylase cofactor tetrahydrobiopterin and monoamine neurotransmitters in rat brain. *Stroke*, 1986, 17, 529–533.
5. Johansen F. F., Jørgensen M. B., von Lubitz D. K. J. E., Diemer N. H.: Selective dendritic damage in hippocampal CA1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.*, 1984, 291, 373–377.
6. Kida E.: Ultrastructural properties of rat substantia nigra in organotypic culture. *Neuropathol. Pol.*, 1986, 24, 145–159.
7. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Morphology of glial tissue culture *in vitro* under varied gas atmosphere. *Pol. Med. J.*, 1967, 6, 1574–1581.
8. Kraśnicka Z., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Effect of short lasting anoxia on *in vitro* culture of cerebellum. *Neuropatol. Pol.*, 1976, 14, 11–22.
9. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropatol. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
10. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10, 267–272.
11. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M. J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of the rat cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 321–330.
12. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of prostacyclin on the morphological and enzymatic properties of CNS cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986, 73, 111–118.

13. Rothman S. M.: Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science*, 1983, 220, 536–537.
14. Slotkin T. A., Cowdery T. S., Orband L., Pachman S., Whitmore W. L.: Effects of neonatal hypoxia on brain development in the rat: immediate and long-term biochemical alterations in discrete regions. *Brain Res.*, 1986, 374, 63–74.
15. Yu M. C., Bakay L., Lee J.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropathol.*, (Berl.), 1972, 22, 222–234.

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

BARBARA GAJKOWSKA, ANNIE VIRON\*

## IMMUNO-GOLD STAINING OF LEU-ENKEPHALIN IN THE RAT HYPOTHALAMIC NEUROSECRETORY NUCLEI

Laboratory of Ultrastructure of Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Science, Warszawa, \*Laboratory of Ultrastructure and Biology of the Nucleus IRCS, Villejuif, France

It is becoming increasingly clear that the hypothalamic magnocellular nuclei, the particularly supraoptic and paraventricular ones, produce several neuroactive substances in addition to vasopressin (VP) and oxytocin (OT) and their respective neurophysin (Swanson, Sawchenko 1980).

Among the opioid peptides Leu-enkephalin was identified biochemically in the hypothalamo-neurosecretory system by Rossier et al. (1979, 1980). According to electrophysiological data, Clarke et al. (1979) suggested inhibitory regulation of oxytocin release from neurohypophysial terminals by enkephalin. Martin and Voigt (1981, 1983) provided immunocytochemical evidence for Met-enkephalin in OT-terminals, and Leu-enkephalin in VP-terminals, relating to the intraneuronal and intravesicular coexistence of enkephalins and neurohypophysial hormones. Convincing immunoelectron microscopic evidence has been provided that enkephalinergic processes terminate in synaptoid fashion on pituicytes and it has been proposed that these glial elements could mediate the inhibitory action of enkephalin on VP and OT release from the neural lobe (Van Leeuwen et al. 1983).

The aim of the present study was to investigate the precise identity and intracellular distribution of Leu-enkephalin in neurosecretory cells in the rat hypothalamus by the use of immunocytochemistry.

### MATERIAL AND METHODS

Animals: 10 male Sprague-Dawley rats weighing about 230 g, were housed under controlled conditions with food and water *ad libitum*. Five of them were subjected to experimentally evoked ischemia according to the method described by Korpaczew et al. (1982). Under slight ether anesthesia, a special needle clip was inserted into the animal's chest and the vascular bundle of the heart was constricted. This operation led to cardiac arrest and cessation of blood circulation and respiration. Release of constriction of the heart vascular

bundle after 2.5 min and application of external heart massage allowed the return of the heart function and respiration within 1–3 min.

**Immersion fixation.** After this time the rats were decapitated and the brains immediately removed. The hypothalamic tissue containing supraoptic and paraventricular nuclei was immersed in fixative for 40 min. After fixation with 4% paraformaldehyde containing 0.1% glutaraldehyde, pH 7.4 in Sörensen phosphate buffer, the tissue samples were dehydrated in graded series of ethanol and finally embedded in Epon 812.

**Immuno-gold procedure.** The sections mounted on Nickel grids were floated on 50% Bovine serum albumin (BSA) before incubation for 30 min at room temperature in anti-Leu-enkephalin serum diluted 1:50 in phosphate-buffered saline (PBS). Then the grids were washed with PBS, floated 10 min on normal goat serum (diluted 1:5 PBS) and then 10 min on goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated to colloidal gold particles 5 nm in diameter (1:100 in PBA) (Janssen, Pharmaceutica Beerse, Belgium). Controls were carried out by using incubations in rabbit normal serum 1:5 in PBS phosphate-buffered saline in place of antibodies. After successive washing in PBS and distilled water the grids were air-dried. They were stained with uranyl acetate 4.7% in distilled water for 20 min, and washed for 30 sec with Reynold's solution. Electron microscopy: sections were examined and photographed in a Philips EM 300.

## RESULTS

In the routine procedure neurons of supraoptic (SO) and paraventricular (PV) nuclei possessed a large rounded nucleus with an excentrically located nucleolus, very well developed rough endoplasmic reticulum and a prominent Golgi apparatus (Gajkowska 1987) Neurosecretory granules were seen in the Golgi area or distributed throughout the cytoplasm. Lysosomes and multivesicular bodies or nucleolus-like bodies were rarely observed.

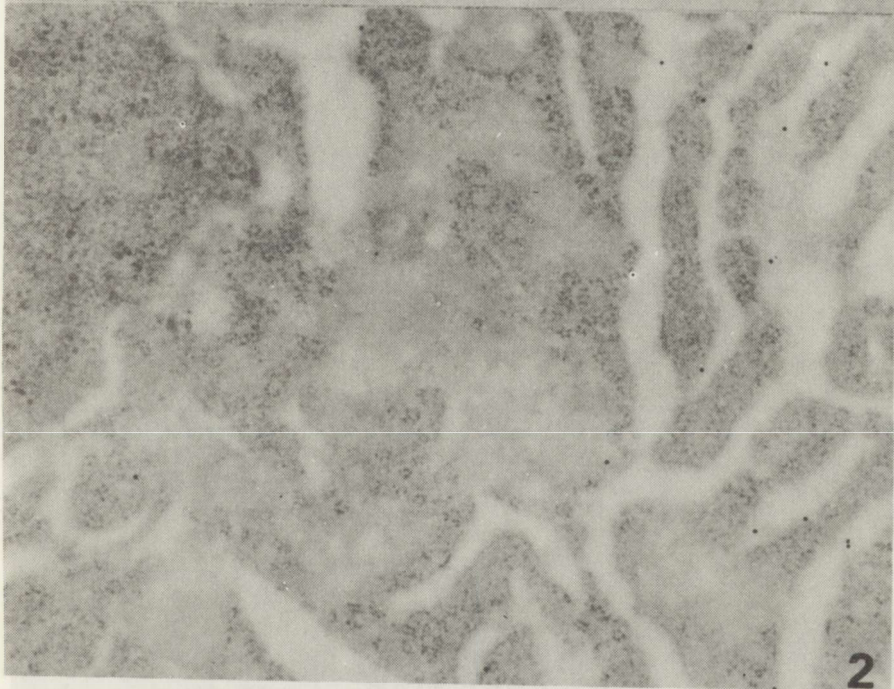
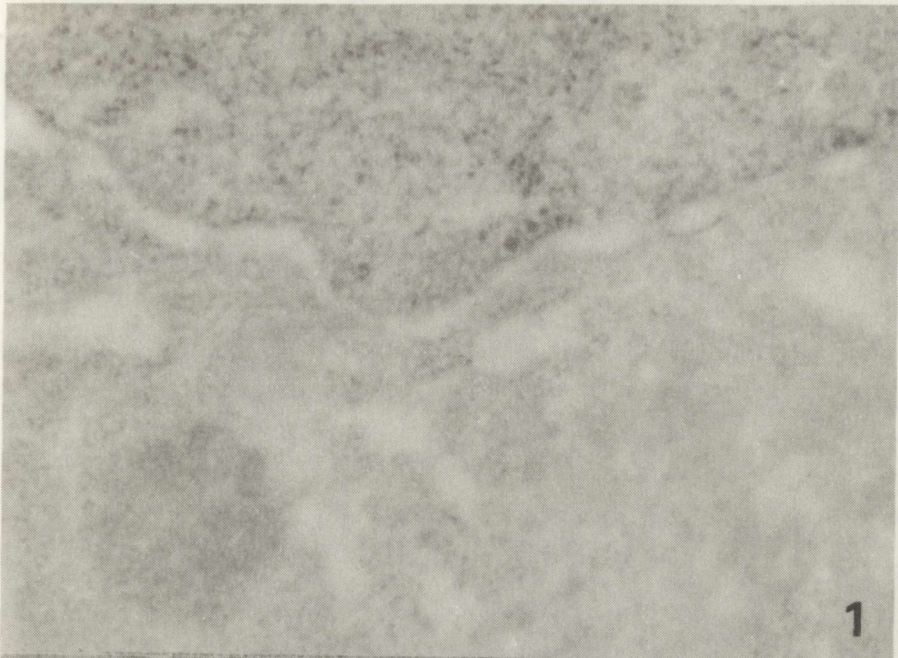
Fixation with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde resulted in a sufficient preservation of immunoreactive Leu-enkephalin, however, with this immunocytochemical procedure the overall morphology and ultrastructural details were poorly visualized (Figs 1, 2, 3, 4).

At the EM level, Leu-enkephalin-positive perikarya were among the largest in the SO nucleus, and sometimes were found among the neurons of the PV nucleus. Immunostaining was mainly localized on rough endoplasmic reticulum (RER) when gold particles were concentrated labelled with 5-nm particles of colloidal gold in control and experimental animals. Little or no

---

*Figs 1-4.* Post-embedding immuno-gold labelling of rat supraoptic and paraventricular nuclei with anti-Leu-enkephalin. Paraformaldehyde-glutaraldehyde fixation. Uranyl acetate and lead citrate counterstaining

*Ryc. 1-4.* Pozatopieniowe immunologiczne znakowanie złotem Leu-enkefaliną w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym. Utrwalanie paraformaldehydem i glutaraldehydem. Dobarwienie octanem uranylu i cytrynianem ołowiu

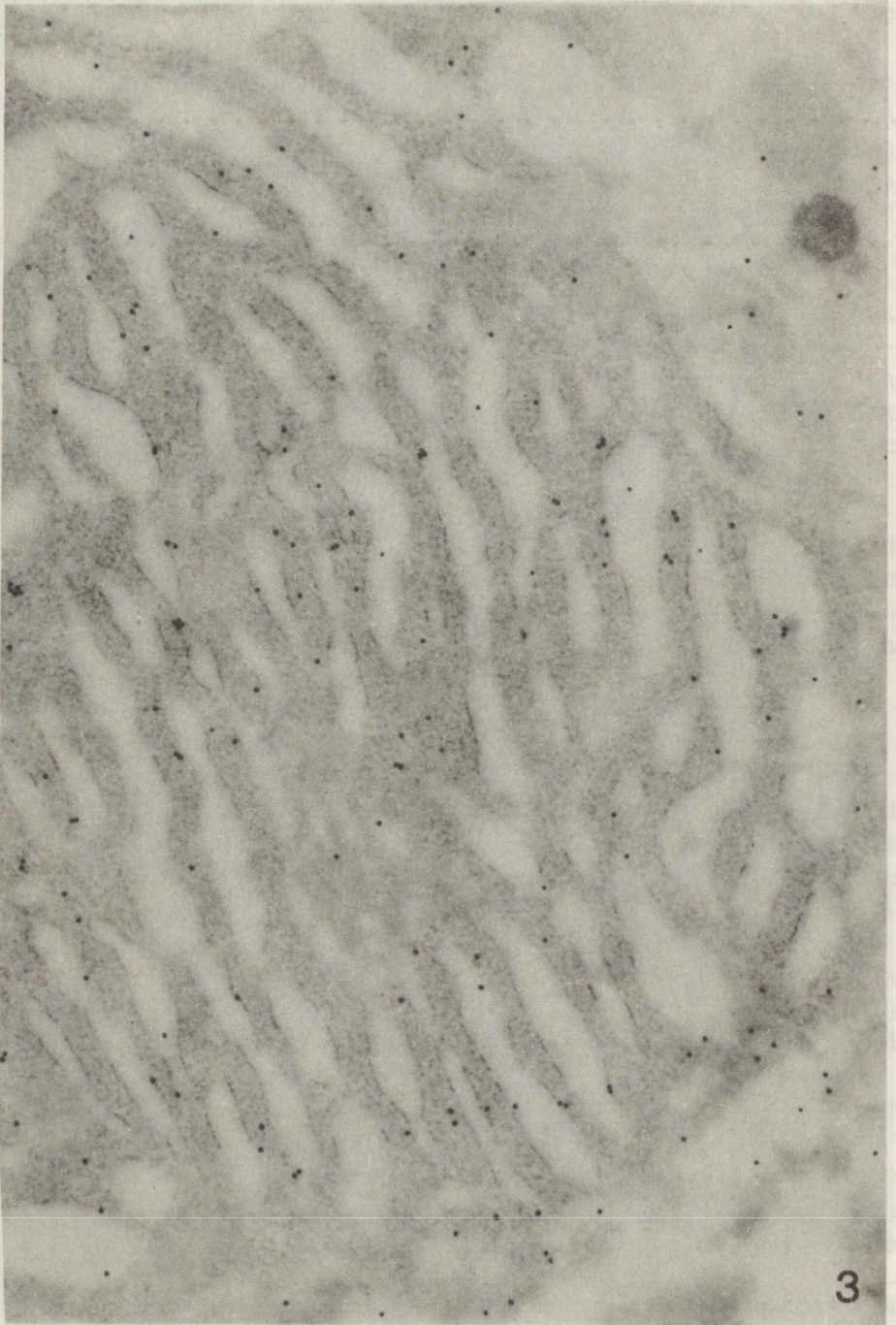


*Fig. 1.* Fragment of unlabelled neuron of paraventricular nucleus. Control animal.  $\times 45\,000$

*Ryc. 1.* Fragment niewyznakowanego neuronu jądra przykomorowego. Zwierzę kontrolne. Pow. 45 000

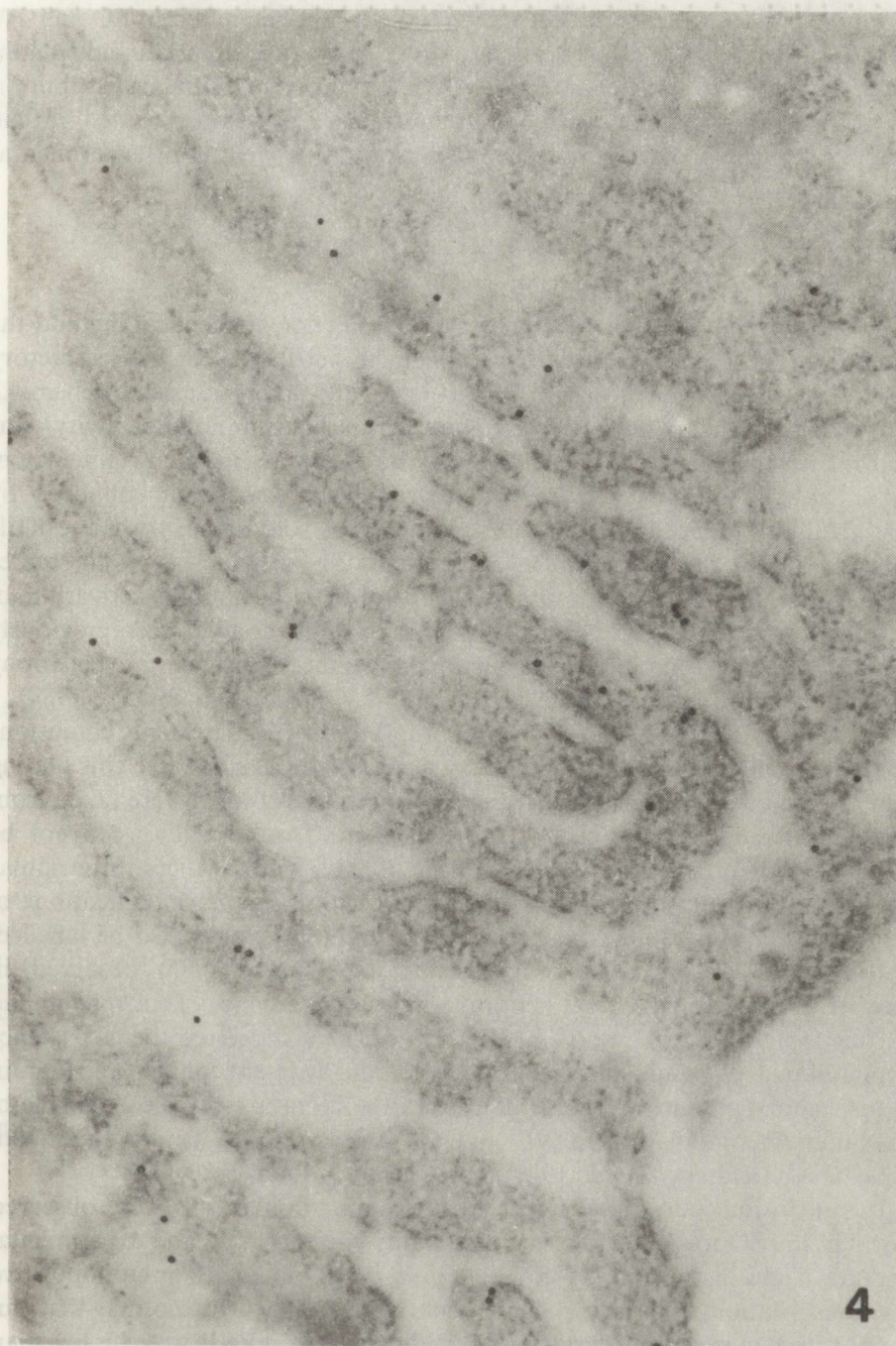
*Fig. 2.* Fragment of neuron of supraoptic nucleus containing very well developed rough endoplasmic reticulum labelled with gold particles (5 nm). Control animal.  $\times 36\,000$

*Ryc. 2.* Fragment neuronu jądra nadwzrokowego z dobrze rozwiniętą ziarnistą siateczką śródplazmatyczną wyznakowaną cząsteczkami złota (5 nm). Zwierzę kontrolne. Pow. 36 000  $\times$



*Fig. 3.* Fragment of well developed rough endoplasmic reticulum abundantly labelled with gold particles in supraoptic nucleus. Experimental animal.  $\times 36\,000$

*Ryc. 3.* Fragment dobrze rozwiniętej siateczki śródplazmatycznej ziarnistej wyznakowanej cząsteczkami złota w jądrze nadwzrokowym. Zwierzę doświadczalne. Pow.  $36\,000 \times$



*Fig. 4.* The rough endoplasmic reticulum area of Leu-enkephalin-immunopositive perikaryon in periventricular nucleus. No other cell organelles are labelled. Experimental animal.  $\times 60\,000$   
*Ryc. 4.* W perykarionie jądra przykomorowego obszary siateczki śródplazmatycznej ziarnistej Leu-enkefalino-immunopoztywne. Inne organelle komórkowe nie są wyznakowane. Zwierzę doświadczalne. Pow.  $60\,000 \times$



immunoreactivity was present on rough endoplasmic reticulum in SO and PV neurons of control animals (Figs 1, 2). After 2.5 min ischemia Leu-enkephalin immunoreactivity was observed in SO and PV neurons in a similar distribution (Figs 3, 4). The majority of the immunoreactive cells was located in the supraoptic nucleus. This was observed in normal as well as in experimental conditions.

#### DISCUSSION

In the present study we examined by the immunocytochemical method the localization of immunoreactive Leu-enkephalin substances in neurosecretory cells of SO and PV neurons of normal rats and after transient ischemia.

At a subcellular level the Leu-enkephalin-like immunoreactivity was localized on the rough endoplasmic reticulum. The intensity and frequency of Leu-enkephalin immunostaining in the cytoplasm was much enhanced by experimentally induced ischemia. The presence of gold particles on the RER indicated the sites of newly synthesized proteins. From the result of our studies it is clear, that transient cerebral ischemia evoked metabolic activation of synthesis of precursor forms of proteins. This phenomenon has been previously described in conventional electron microscopy studies as extensive hypertrophy of RER in neurosecretory cells of SO and PV nuclei (Gajkowska 1987).

It is surprising that a short time after application of the ischemic conditions the Leu-enkephalin immunoreactivity concerned RER exclusively. This finding seem to be connected with the fact that the specimens studied were taken from animals immediately after the ischemic incident. The possibility can not be precluded that in a longer period of time after ischemia others intracellular structures, especially those responsible for posttranslational modifications of the proteins (Golgi complex, neurosecretory granules) would also be labelled. Martin et al. (1983) and Lamberts and Goldsmith (1985) observed in neurosecretory terminals of rat neurohypophysis coexistence of enkephalin and neurohypophysial hormones (VP, OT). The authors suggested the coexistence of immunoreactive Leu-enkephalin and VP and Met-enkephalin and OT in neurosecretory granules. Various data from the literature revealed the role of enkephalin in modulation of VP and OT release in the neural lobe (Van Wimersma Greidanus et al. 1979; Lutz-Bucher, Koch 1980).

In conclusion, our study suggests that enkephalin-like cells were observed mostly in the SO nucleus of the hypothalamus under normal and experimental conditions, and distribution of colloidal gold clearly indicates immunopositive structures without obscuring their identity. It is worth noting that an experimental animals concentration of gold particles on RER were higher than in control animals.

The presence of Leu-enkephalin in some neurons of SO and PV nuclei suggest that enkephalins may play an important role in the hypothalamo-hypophyseal system after ischemia.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors thank Dr Edmond Puvion of the I.R.S.C. Villejuif (France) for providing facilities in his Laboratory, and Dr Barbara Kosicka, Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, for generous supply of the Leu-enkephalin antisera. Part of this work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (France).

## BARWIENIE IMMUNOLOGICZNE Z UŻYCIEM ZŁOTA LEU-ENKEFALINY W NEUROSEKRECYJNYCH JĄDRACH PODWZGÓRZA SZCZURA

### Streszczenie

Zbadano immunocytochemicznie lokalizację Leu-enkefaliny w neuronach jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) podwzgórza szczura, stosując metodę IGS (immuno-gold staining). Cząsteczki złota (5 nm) znakowały wyraźnie, jedynie, obszary zajmowane przez ziarnistą siateczkę śródplazmatyczną (RER). Badania te przeprowadzono także u zwierząt po krótkotrwałym (2,5 min) niedokrwieniu mózgowia, u których cząsteczki złota znakujące Leu-enkefalinę występowały w takiej samej lokalizacji, ale bardziej licznie. Leu-enkefalino-pozytywne neurony spotykano częściej w SO niż w PV.

Przypuszcza się, że Leu-enkefalina syntetyzowana w obydwu jądrach neurosekrecyjnych odgrywa rolę w regulacji układu podwzgórzowo-przysadkowego, również w warunkach niedokrwienia.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЛЕУ-ЭНКЕФАЛИНА С УПОТРЕБЛЕНИЕМ ЗОЛОТА В НЕВРОСЕКРЕЦИОННЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

### Резюме

Исследовалась иммуноцитохимическая локализация Leu-энкефалина в нейронах *N. supraopticus* (SO) и *N. paraventricularis* (PV) гипоталамуса крысы с употреблением immuno-gold метода. Частицы золота (5 nm) показывали только области занятые эндоплазматической зернистой сетчаткой. Идентичные исследования проводились у животных с кратковременной полной ишемией центральной нервной системы. Расположение частиц золота связанных с Leu-энкефалином имело в обеих группах животных такую же самую локализацию, но отличалось интенсивностью накопления. Нейроны содержавшие Leu-энкефалин выступали чаще в SO чем в PV.

Предполагается, что Leu-энкефалин синтезированный в обоих невросекрционных ядрах играет существенную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарной системы тоже в условиях ишемии мозга.

### REFERENCES

1. Clarke G., Wood P., Merrick L., Lincoln D.: Opiate inhibition of peptide release from the neurohumoral terminals of hypothalamic neurones. *Nature*, 1979, 282, 746–748.
2. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 131–146.
3. Lamberts R., Goldsmith P. C.: Preembedding colloidal gold immunostaining of hypothalamic neurons: light and electron microscopic localization -endorphin-immunoreactive perikarya. *J. Histochem., Cytochem.*, 1985, 33, 499–507.

4. Korpaczew G. W., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modielirowanije kliniczeskoj smierti postreanimationnoj bolezni u krysz. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, 1982, 3, 78–80.
5. Lutz-Bucher B., Koch B.: Evidence for a direct inhibitory effect of morphine on the secretion of posterior pituitary hormones. *Eur. J. Pharmacol.*, 1980, 66, 375–378.
6. Martin R., Voigt K. H.: Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature*, 1981, 289, 502–504.
7. Martin R., Geis R., Holl R., Schäfer M., Voigt K. H.: Co-existence of unrelated peptides on oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses: immunoreactive methionine<sup>5</sup>-enkephalin, leucine<sup>5</sup>-enkephalin-, and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience*, 1983, 8, 213–227.
8. Rossier J., Battenberg E., Pittman Q., Bayon A., Koda L., Miller R., Guillemin R., Bloom F.: Hypothalamic enkephalin neurons may regulate the neurohypophysis. *Nature (Lond.)*, 1979, 277, 653–655.
9. Rossier J., Pittman Q., Bloom F., Guillemin R.: Distribution of opioid peptides in the pituitary: a new hypothalamic-pars nervosa enkephalinergic pathway. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1980, 39, 2555–2560.
10. Swanson L. W., Sawchenko P. E.: Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinol.*, 1980, 31, 410–417.
11. Van Leeuwen F. W., Pool C. W., Sluiter A. A.: Enkephalin immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the rat neural lobe. *Neuroscience*, 1983, 8, 229–241.
12. Van Wimersma Greidanus T. B., Thody T., Verspaget H., De Rotte G. A., Geodemans J. H., Croiset G., Van Ree J. M.: Effect of morphine and beta-endorphin on basal and elevated plasma levels of alpha-MSH and vasopressin. *Life Sci.*, 1979, 24, 579–586.

Address of Dr. B. Gajkowska: Laboratory of Ultrastructure of Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

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

## ON MODIFICATION OF THE HISTOPATHOLOGICAL PICTURE OF MULTIPLE SCLEROSIS IN ADVANCED AGE\*\*

Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw, \*Department of Neuropathology,  
Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw

Multiple sclerosis (MS) is considered as a disease of young adults. However, a number of data presented recently point to a possibility of appearance of the disease symptoms in middle age, and even in advanced age, over 50–60 (Leibowitz et al. 1964). In the material of Leibowitz et al. (1964) among 282 cases of MS in 10% the disease began beyond 50 years of age. According to data of Noseworthy et al. (1983) such a late beginning of MS was found in 9.4% among 838 cases. In advanced age the course of the disease is usually progressive without remission and relapses (Larsen et al. 1985). Spinal motor (Leibowitz et al. 1964) or spinal and cerebellar signs (Noseworthy et al. 1983) predominate. Older patients are bedridden earlier than young ones (Müller 1951; Cazzulo et al. 1978; Detels et al. 1982). Diagnosis of MS is often difficult since the slow deteriorating motor function is misinterpreted very frequently as brain and spinal cord vascular disease. It is possible that differences in the clinical picture of MS in young and old cases may be related to morphological dissimilarity of the pathological process. Therefore, a comparison of morphological changes in various age cases, especially histological evaluation of immunological exponents of MS seems interesting.

### MATERIAL

The examined material comprised four cases of MS. Two of them concerned young people in which clinical picture and course of the disease were typical. Postmortem neuropathological examination confirmed clinical diagnosis of

---

\*\*Work supported by the Institute of Psychiatry and Neurology within agreement No r.34.1.

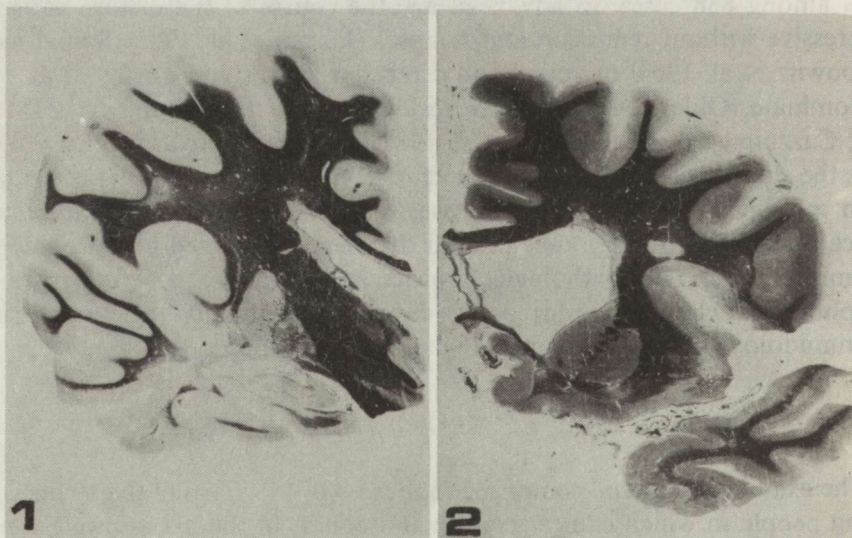
MS. Two other cases concerned old peoples in which clinical picture and course suggested clinical diagnosis of cerebral stroke of vascular origin. Short characteristics of all cases is presented below.

*Case 1.* Female patient, 33-year-old. Onset of the disease at the age of 16. Course of disease: at the beginning with remissions and relapses, after 24 years of age — progressive. Clinical symptomatology: numerous, polysystemic symptoms characteristic of MS. Bedridden at the age 27. Duration of disease: 17 years. Clinical diagnosis: Multiple sclerosis. Cause of death according to post mortem examination: Embolism of pulmonary artery.

*Case 2.* Male patient, 41-year-old. Onset of the disease at the age 29. Course of the disease: at first with remissions and relapses, after 39 years of age — progressive. Clinical symptomatology: numerous, polysystemic symptoms typical of MS. Bedridden at the age of 39. Duration of the disease: 12 years. Clinical diagnosis: Multiple sclerosis. Cause of death according to postmortem examination: pneumonia. In both above mentioned cases during final hospitalization cerebro-spinal fluid was not examined.

*Case 3.* Male patient, 76-year-old, with no data concerning the beginning of the disease and its course. As far as MS symptomatology is concerned, the only information available was retrobulbar neuritis at the age 56(?). Cerebro-spinal fluid during last hospitalization was normal. Cause of the death according to postmortem examination: pneumonia.

*Case 4.* Female patient, 81-year-old with no data concerning the beginning of the disease. As far as the course of the disease is concerned, there were data on gait disturbances lasting for some years. For one month prior to hospita-



*Figs 1 and 2.* Case 3. Paraventricular demyelination. Klüver—Barrera. Natural size —  
Ryc. 1 and 2. Przypadek 3. Okołodomorowa demielinizacja. Klüver—Barrera. Wielkość naturalna



*Fig. 3.* Case 4. Paraventricular demyelination. Klüver–Barrera. Natural size

*Ryc. 3.* Przypadek 4. Okołołokomorowa demielinizacja. Klüver–Barrera. Wielkość naturalna

*Fig. 4.* Case 4. Paraventricular demyelination with finger-like process. Klüver–Barrera. Natural size

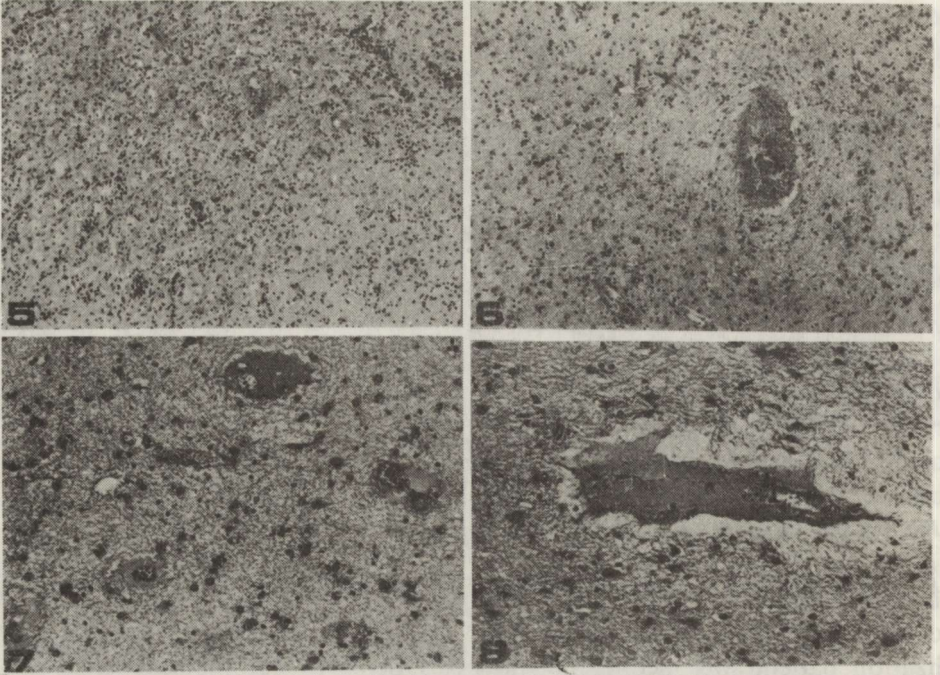
*Ryc. 4.* Przypadek 4. Okołołokomorowa demielinizacja z palczastą wypustką. Klüver–Barrera. Wielkość naturalna

lization patient was incoherent and bedridden. No pathological changes of CSF were found. Cause of death according to postmortem examination: pneumonia.

In all cases autopsy was performed before 24 hours after death. Postmortem examination of formalin-fixed brain and spinal cord in cases 1 and 2 confirmed clinical diagnosis of MS. In cases 3 and 4 with diagnosis of cerebral stroke, diagnosis of MS was established during gross examination of the brain, which revealed typical and typically located periventricular demyelination plaques (Figs 1–4). They were greyish in colour and were sharply demarcated from the surrounding tissue.

#### METHODS

For histopathological examination paraffin-embedded slices were stained with hematoxylin and eosin, and by van Gieson, luxol fast blue and PTAH – Mallory's methods. A part of slices was impregnated by Bielschowsky's and paraffin-modification of Cajal's method. In all cases three hemispheric slices (at the levels of basal ganglia, thalamus, and parieto-occipital region) and two brain stem slices were examined. On those sections from both groups of cases a trial of morphometric estimation of the immunological process intensity was carried out consisting in calculation of active demyelination plaques and perivascular infiltrates. In the histopathological investigation the picture of active acute, and subacute plaques was evaluated using Adam's following criteria concerning active plaques: 1. Congestion with or without transudate, 2. Distinct astroglial response, 3. Microglial reaction, 4. Loosening of tissue



*Fig. 5.* Case 1. Congestion, astroglial and microglial proliferation, discrete perivascular infiltrates, loosening of tissue structure. H-E.  $\times 112$

*Ryc. 5.* Przypadek 1. Przekrwienie, rozplęcenie astro- i mikrogleju, dyskretne okołonaczyniowe nacieki limfocytarne, rozrzedzenie podłoża. H-E. Pow. 112  $\times$

*Fig. 6.* Case 3. Congestion, ecchymosis, astroglial proliferation discrete perivascular infiltrates, loosening of tissue structure. H-E.  $\times 112$

*Ryc. 6.* Przypadek 2. Przekrwienie, wybroczyna krwotoczna, pobudzenie gleju astrocytarnego, dyskretne nacieki okołonaczyniowe, rozrzedzenie podłoża. H-E. Pow. 112  $\times$

*Fig. 7.* Case 3. Congestion, perivascular transudate, reactive astrocytes, loosening of tissue structure. H-E.  $\times 224$

*Ryc. 7.* Przypadek 3. Przekrwienie, przesiek okołonaczyniowy, przerost astrocytów, rozrzedzenie podłoża. H-E. Pow. 224  $\times$

*Fig. 8.* Case 3. Perivascular transudate, hypertrophic astrocytes, single rod cells. H-E.  $\times 224$

*Ryc. 8.* Przypadek 3. Przesiek okołonaczyniowy, przerosłe astrocyty, pojedyncze komórki mikrogleju pęczkowatego. H-E. Pow. 224  $\times$

structure, 5. Reduced myelin staining with slightly marked edge, 6. Perivascular lymphocytic infiltrates.

A distinctly outlined area with few vessels and a scarce amount of astrocytes was considered to be an old plaque.

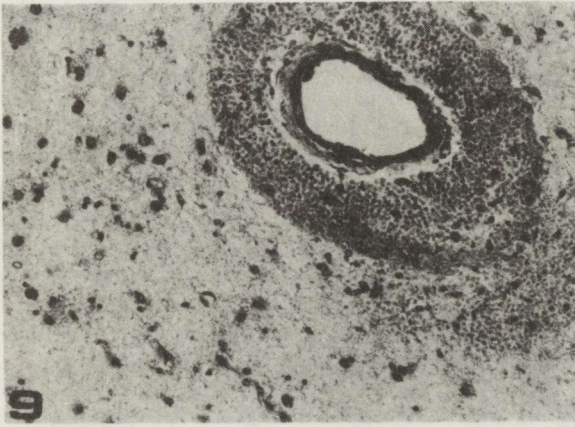
The quantity of lymphocytes in the perivascular space was identified and evaluated in a scale from 1+ to 3+: 1+ – a few perivascular lymphocytes (discrete lymphocytic infiltrate), 2+ – monolayer lymphocytic infiltrate, 3+ – multilayer perivascular lymphocytic infiltrate (cuff).

Because of the participation of plasmatic cells, monocytes, and phagocytes

in the immunological process, they were counted in every perivascular infiltrate in each case. These data are given in absolute numbers which are the sum obtained in 2 younger and 2 senile MS cases.

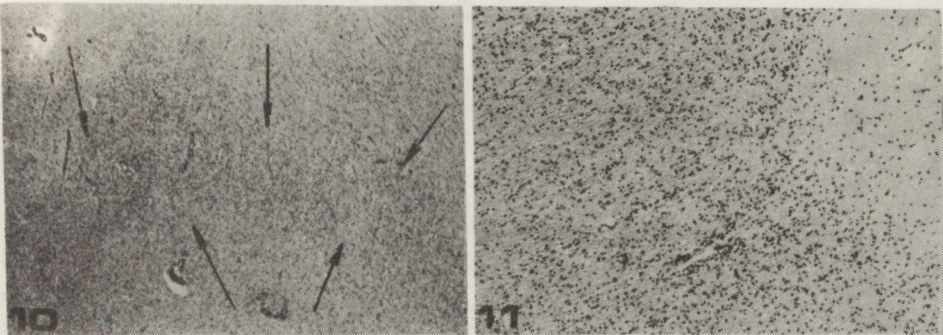
#### RESULTS

Congestion was found in all cases in the active plaques (Figs 5, 6 and 7) particularly in very small vessels. The perivascular transudate (Figs 7, and 8) and ecchymoses (Figs 6 and 9) were visible only in case 3 within the pale and



*Fig. 9.* Case 3. Ring perivascular hemorrhage, hypertrophic astrocytes, loosening of tissue structure. H-E.  $\times 224$

*Ryc. 9.* Przypadek 3. Kolista wybroczyna okołonaczyniowa, przerosłe astrocyty, rozrzedzenie podłoża. H-E. Pow. 224  $\times$



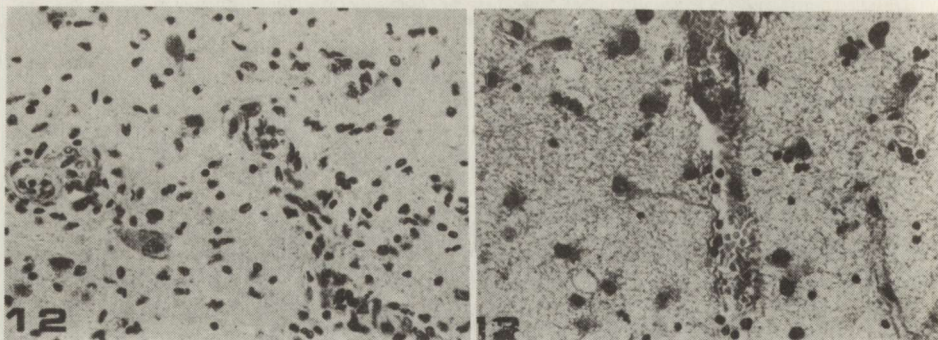
*Fig. 10.* Case 1. Dense zone of glial cells at the plaque margin (arrows). Discreet perivascular infiltrates. H-E.  $\times 32$

*Ryc. 10.* Przypadek 1. Oboczny wał glejowy (strzałki). Dyskretne nacieki okołonaczyniowe. H-E. Pow. 32  $\times$

*Fig. 11.* Case 3. Numerous glial cells in the white matter, indistinct dense zone of glial cells at plaque edge. H-E.  $\times 112$

*Ryc. 11.* Przypadek 3. Zagęszczenie gleju w istocie białej, słabo zaznaczony oboczny wał glejowy. H-E. Pow. 112  $\times$





*Fig. 12.* Case 1. Congestion, hypertrophy of astroglial cells, rod cell forms of microglia, discrete perivascular lymphocytic infiltrates. H-E.  $\times 448$

*Ryc. 12.* Przypadek 1. Przekrwienie, przerost astrocytów, komórki mikrogleju pałeczkowatego, dyskretne okołonaczyniowe nacieki limfocytarne. H-E. Pow. 448  $\times$

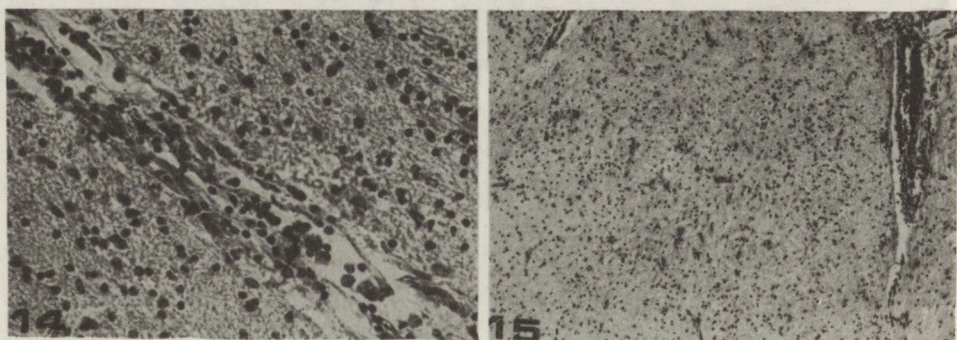
*Fig. 13.* Case 3. Congestion, discrete perivascular lymphocytic infiltrates, reactive astrocytes, loosening of tissue texture. Lack of microglial rod cells. H-E.  $\times 448$

*Ryc. 13.* Przypadek 3. Przekrwienie, dyskretne okołonaczyniowy nacieki limfocytarne, przerosłe astrocyty, rozrzedzenie podłoża. Brak komórek pałeczkowatych mikrogleju. H-E. Pow. 448  $\times$

somewhat rarefied background with a scarce amount of cells (Figs 4, 5 and 7). Reduced myelin staining and loosening of the active plaque structure was noted in all cases (Figs 3, 4, 5, 6 and 7).

Proliferation of astrocytes with appearance of their reactive forms was seen within plaques in all cases, but the astroglial response on the active plaque edge was more pronounced in case 1 and 2 than in senile cases (Figs 10, 11).

The participation of activated microglia in active plaques was also more distinct in cases 1 and 2 than in senile cases (Figs 12, and 13). The most important difference concerned the intensity of the lymphocytic reaction. In all



*Fig. 14.* Case 1. Perivascular lymphocytic infiltrate with phagocytic cell participation, hypertrophic astrocytes, rod cells. H-E.  $\times 448$

*Ryc. 14.* Przypadek 1. Okołonaczyniowy nacieki limfocytarne z udziałem makrofagów, przerosłe astrocyty, komórki pałeczkowate. H-E. Pow. 448  $\times$

*Fig. 15.* Case 1. Multilayer and discrete perivascular lymphocytic infiltrates. H-E.  $\times 112$

*Ryc. 15.* Przypadek 1. Wielorzędowy oraz dyskretne nacieki limfocytarne. H-E. Pow. 112  $\times$

Table 1. Intensity of the perivascular mononuclear cells response within fresh plaques  
 Tabela 1. Nasilenie okołonaczyniowych nacieków komórek jednojądrzastych w świeżych blaszkach

Groups of MS cases Grupy przypadków z MS	Mean age in groups Średnia wieku w grupach	Number of fresh plaques Liczba świeżych blaszek	Lymphocytic infiltrates Nacieki limfocytarne			Other cells in infiltrates Inne komórki w naciekach		
			Discreet Dyskretne +	Monolayer Jednorzęd. ++	Multilayer Wielorzęd. +++	Monocytes Monocyty	Plasmocytes Plazmocyty	Phagocytes Makrofagi
Young age cases Przypadki wieku młodego	37	27	26	17	10	21	18	83
Senile age cases Przypadki wieku starczego	78.5	12	12	—	—	2	3	8

cases within the active plaque and at its edge discreet perivascular lymphocytic infiltrates (Figs 10, 11, 13 and 14) were seen. However, only in case 1 and 2 mono- or multilayer perivascular lymphocytic infiltrates were found (Fig. 15). They surrounded greater number of vessels in cases 1 and 2, than in cases 3 and 4. This was possibly connected with a greater number of active plaques in case 1 (14 plaques) and 2 (13 plaques), than in analogous sections in case 3 (7 plaques) and 4 (5 plaques) (Table 1.)

Discreet perivascular lymphocytic infiltrates in apparently normal white matter occurred in all cases. In the subarachnoid space discreet and monolayer infiltrates were found in cases 1 and 2 (Fig. 16). Among the senile cases few discreet infiltrates were seen subarachnoideally only in case 3. The participation of other mononuclear cells (counted only within perivascular lymphocytic infiltrates) was different in younger cases than in senile ones. Comparison of younger cases with senile ones is difficult, considering the fact that the number of active plaques in senile cases made up 45% of the number of plaques in cases 1 and 2. In young age cases, however, 18 plasmatic cells, 21 monocytes and 83 phagocytes were found, whereas in senile cases the number of these cells amounted to 2, 3 and 8 respectively. Thus, the latter numbers were several times lower. The old plaques in both groups differed only in respect to the lymphocytic reaction, more distinct in cases 1 and 2. Activated areas of old plaques were found in both groups.

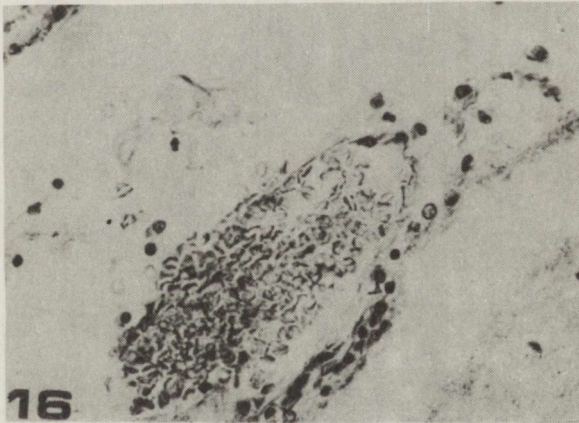


Fig. 16. Case 1. Discreet perivenous infiltrate in subarachnoid space. H-E.  $\times 448$

Ryc. 16. Przypadek 1. Dyskretny naciek okołozylny w przestrzeni podpajęczynówkowej. H-E. Pow. 448  $\times$

#### DISCUSSION

It is commonly accepted, that the recent areas of demyelination are characterized by congestion with or without transudate, marked proliferation of astroglial and microglial cells, loosening of tissue structure, partial

destruction of myelin and perivenous lymphocytic infiltrates (Adams 1977). Activated neuroglia cells form the plaque border. An old plaque shows a distinctly outlined border and a scarce amount of astrocytes within the plaque. The activated plaque can be distinguished by signs of recent plaque at peripheral zone of demyelinated area.

Evaluation of MS patients deceased in young and advanced age on the basis of the above listed criteria, indicates, that congestion is a constant feature of recent demyelination. Perivascular transudate and ecchymoses were found only in senile case 3. Interpretation of changes in this area is difficult. Markedly reduced myelin staining with rarefaction of background with scarce cells seems to indicate rather an old demyelinating focus, but considerably increased vascular permeability and perivascular lymphocytic infiltrates point to the possibility of an acute and subacute process. This process would be atypical because activation of the demyelinated area takes place in the central part of the plaque. In the subject deceased at the age of 76, the effect of the period before death, increasing vascular permeability within the rarefied plaque cannot be excluded. Glial proliferation with reactive astrocytic forms was present in all cases, but a dense zone of cells at the plaque perimeter was more marked in younger cases. Although, it is necessary to emphasise difficulties interpretation of the morphological picture in senile cases. Astroglial and microglial proliferation forms a distinct dense cell zone surrounding the plaque. In senile individuals with cerebral atrophy resulting in reduction of the brain volume, including the white matter, microscopic evaluation of the latter gives the impression of distinct astroglial proliferation. The lack of standards for determining the number of astroglial cells on the respective surface of tissues at various ages does not allow reference.

Thus, it is impossible to determine definitively whether in senile individuals astroglial proliferation is present or whether there is a standard for a respective age. Therefore, assessment of the plaque margin glial proliferation is very difficult and estimation of the old plaque activity is also not easy in senile cases. A widening of the demyelination area probably could mean a manifestation of small vessels congestion. An essential criterion for assessment of the demyelination process activity is a perivenous hematogenic infiltrate composed of lymphocytes, monocytes, plasma cells, which represents a morphological exponent of an immunological process. In cases with the onset of illness and death at young age discreet lymphocytic infiltrates occur around a greater number of vessels than in senile cases.

The presence of mono- and multilayer infiltrates in young cases, contrary to senile ones, in which those infiltrates within a plaque and its neighbourhood were not observed, is also worth noting. In our material the lymphocytic reaction in senile cases was weaker in spite of distinct demyelinating manifestations, than in younger cases. The infiltrates located in the dense zone of glial cells surrounding a plaque and in the subarachnoid space were also more marked and more numerous in younger cases.

However, there was no clear difference in respect to the inflammatory signs in apparently healthy tissues in both groups. The effect of the immunological process in MS include i.a. an increased IgG level in the cerebro-spinal fluid (CSF) and serum (Davison, Curner 1977; Thompson 1977), the presence of IgG in astrocytes of recent plaques (Davison, Curner 1977), humoral response to oligoclonal IgG (Kappa) (Link et al. 1980), and a considerable percentage of oligoclonal IgG in the CSF (Noseworthy et al. 1983).

In exacerbations of the disease, a decrease of early lymphocytes T and T<sub>s</sub> in blood is observed (Reinherz et al. 1980), similarly as in acute experimental allergic encephalitis (EAE) (Raine et al. 1980). The number of cytotoxic T<sub>K</sub> cells decreases and their reduction is more evident in the CNS than in the blood (Zaffaroni et al. 1985). It is not clear, whether it is a sign of migration of those cells from the blood to the CSF via the perivascular space of the brain (Nyland et al. 1982). Numerous data indicate, however, that the function of the immunological system varies with ageing since the thymus gland, bone marrow, spleen and lymph nodes are growing old. The number of T<sub>H</sub> cells decreases (Nagel et al. 1981; Dwilewicz-Trojaczek 1982). In MS plaques T<sub>H</sub> lymphocytes dominate in the perivascular infiltrates (Brinkman et al. 1982, Nyland et al. 1982). The drop of T<sub>H</sub> cells count is connected with a decline of interleukine 2 production in old humans (Makinodan, Hirokawa 1985) and animals (Gaidl et al. 1976). It results in failure of the humoral reaction. It seems that the decrease of IgG in the serum in old MS persons may be a manifestation of that failure (Thompson 1977).

Controversial data on T<sub>s</sub> lymphocytes: both the decline of the number of T<sub>s</sub> cells (Nagel et al. 1981; Dwilewicz-Trojaczek 1982) and their insufficiency as well as the increase of their activity in humans (Makinodan, Hirokawa 1985) and animals have been described (Gaidl et al. 1976). Contrary to short-living lymphocytes B (5–14 days), lymphocytes T live a long time (10–15 years) (Kuratowska 1982). Therefore, they are subjected to the process of ageing, likewise as cells of other tissues.

Absolute and percentual T-cell counts indicate a significant depression with ageing (Teasdale et al. 1976). The surface density of antigen Thy I on the T cell surface decrease with ageing. Within the mitochondria of lymphocytes T of old subjects the number of mitochondrial cristae diminishes and myelin-like bodies occur, the ultrastructure of the cell nucleus is also changed. Metabolic disturbances occur as well (Makinodan, Hirokawa 1985). Consequently, in the ageing process not only the regulatory character of thymus, but also senile changes of lymphocytes T lead to failure and alterations of the cell-mediated and humoral immunological reactions. In our cases the perivascular lymphocytic and other infiltrate cell reaction within the plaque and in the adjacent area is distinctly less intensive than in the younger cases compared for reference. The number of monocytes, plasma cells and phagocytes in perivascular infiltrates may constitute an additional criterion for estimation of the local immunological activity. The absolute number of those cells in infiltrates of senile cases was

considerably lower than in younger cases, which were moreover treated with suppressive drugs.

Histological evaluation does not enable a conclusion as to the insufficiency of the immunological system. It is possible only to suppose that the lack of plasma cells may be connected with insufficiency of lymphocytes B, resulting from the defective regulative function of the lymphocyte T system. Although the B-cell number remains stable, their function is impaired with ageing (Teasdale et al. 1976).

Ageing of the bone marrow and reticuloendothelial system may influence the decrease of monocytes and phagocytes quantity in the perivascular infiltrations of recent demyelinating plaques. May be the weak reaction of microglial cells in senile cases is also connected with ageing.

In the experimental investigation the antigen originating from old animals showed reduced encephalitogenic properties as compared with young animals (Wender, Goncerzewicz 1987). It is possible that in human advanced age the morphological picture of the demyelination plaques depends on antigen properties as well as on the change of the immunological response.

If MS is an autoaggressive disease, the changed properties of antigen would in advanced age modify pathogenesis and the morphological picture of the disease. A peculiarity of the clinical picture of MS in advanced age could be related to an insufficiency or a different reaction of the ageing immunological system as well as to changed properties of the antigen. In senile MS cases the contribution of multi-organ or systemic disease processes should also be taken into account.

#### W SPRAWIE MODYFIKACJI OBRAZU HISTOPATOLOGICZNEGO STWARDNIENIA ROZSIANEGO W WIEKU STARCZYM

##### Streszczenie

U dwóch chorych zmarłych z rozpoznaniem udaru niedokrwiennego w wieku 76 i 81 lat na sekcji makroskopowej mózgu stwierdzono typowe, zlokalizowane okołokomorowo, blaszki stwardnienia rozsianego. Porównano aktywne ogniska demielinizacyjne w tych przypadkach z aktywnymi ogniskami demielinizacji u zmarłych z rozpoznaniem SM w wieku 33 i 41 lat. W starczych przypadkach SM stwierdzono niewielki udział mikrogleju oraz wyraźnie mniejszą reakcję limfocytarną. Okołonaczyniowe nacieki limfocytarne były mniej liczne oraz mniej intensywne niż u zmarłych w wieku młodym i średnim. W naciekach okołonaczyniowych w przypadkach starczych komórki plazmatyczne, monocyty i fagocyty były mniej liczne. Uwzględniono możliwość wpływu starzenia się układu immunologicznego na obraz histopatologiczny aktywnych blaszek SM w wieku starczym.

#### К МОДИФИКАЦИИ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ РАССЕЯНОГО СКЛЕРОЗА В СТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

##### Резюме

У двух больных умерших в возрасте 76 и 81 года с диагнозом ишемического инсульта мозга, на аутопсии мозга обнаружено типические, перивентрикулярно расположенные бляшки рассеянного склероза. Активные очаги демиелинизации в этих старческих случаях

были сравнены с активными демиелинизационными очагами умерших с диагнозом рассеянного склероза в возрасте 33 и 41 лет.

В старческих случаях констатировано меньшее участие микроглии и отчетливо меньшую лимфоцитарную реакцию. Периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов было меньше и были они менее интенсивны, чем в случаях, умерших и молодом в среднем возрасте. В периваскулярных инфильтратах старческих случаев обнаружено меньше плазматических клеток, моноцитов и фагоцитов. Обсуждается возможность влияния старения иммунологической системы на гистопатологическую картину активных очагов рассеянного склероза в старческом возрасте.

#### REFERENCES

1. Adams C. W. M.: Pathology of multiple sclerosis: Progression of the lesion. *Br. Med. Bull.*, 1977, 33, 1, 15–20.
2. Brinkman C. J. J., ter Laak H. J., Hommes O. R., Popema S., Delmotte P.: T-lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis lesions. *New Eng. J. Med.*, 1982, 307, 1644.
3. Cazzulo C. L., Ghezzi A., Marforio S., Caputo D.: Clinical picture of multiple sclerosis with late onset. *Acta Neurol. Scand.*, 1978, 58, 190–196.
4. Davison A. N., Curner M. L.: Immunochemistry and biochemistry of myelin. *Br. Med. Bull.*, 1977, 33, 1, 60–66.
5. Detels R., Clark V. A., Valdiviezo N. L., Visser B. R., Malmgren R. M., Dudley J. P.: Factors associated with a rapid course of multiple sclerosis. *Arch. Neurol.*, 1982, 39, 337–341.
6. Dwilewicz-Trojaczek J.: Immunologia starzenia się. In: *Wybrane zagadnienia immunologii klinicznej*. Eds.: Z. Kuratowska, A. Lutyński, J. Dwilewicz-Trojaczek. PZWL. Warszawa, 1982, 183–188.
7. Gaidl E. A., Junes J. B., Weksler M. E.: Immunological studies of aging. *Exp. Med.*, 1976, 144, 1037–1048.
8. Kuratowska Z.: Limfocyt — centralna komórka reakcji immunologicznej. In: *Wybrane zagadnienia immunologii klinicznej*. Eds.: Z. Kuratowska, A. Lutyński, J. Dwilewicz-Trojaczek. PZWL. Warszawa, 1982, 20–35.
9. Larsen J. P., Kvaale G., Ruse T., Nyland H., Aarli J. A.: Multiple sclerosis — more than one disease? *Acta Neurol. Scand.*, 1985, 72, 145–150.
10. Leibowitz V., Alter M., Halopern L.: Clinical studies of multiple sclerosis in Israel. *Neurology*, 1964, 14, 926–932.
11. Link H., Kam-Hansen S., Kristensson K., Lauzenzi M., Friden A., Roström B.: Studies of immune reaction in multiple sclerosis by active T-rosette test, immunofixation and myelinotoxicity of lymphocytes in the rabbit eye. In: *Progress in Multiple Sclerosis Research*. Ed.: H. J. Bauer, S. Poser, G. Ritter. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, 235–243.
12. Makinodan T., Hirkawa K.: Normal aging of the immune system. In: *Relations between natural aging and disease*. Ed. H. A. Johnson, Raven Press, New York, 1985, 28, 117–132.
13. Müller R.: Course and prognosis of disseminated sclerosis in relation to age of onset. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1951, 66, 561–570.
14. Nagel J. E., Arrest F. J., Adler W. A.: Enumeration of T-lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans. *J. Immunol.*, 1981, 127, 5, 2086–2088.
15. Noseworthy J., Paty D., Wonnacott T., Feasby T., Ebers G.: Multiple sclerosis after age 50. *Neurology* 1983, 33, 1537–1544.
16. Nyland H., Matre R., Mork S., Bjerke J. R.: T-lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis lesions. *New Eng. J. Med.*, 1982, 307, 1643–1644.
17. Raine C. S., Schamburg H. H.: The neuropathology of myelin disease. In: *Myelin*. Ed. P. Morrel, Plenum Press, New York, London, 1977, 271–351.

18. Raine C. S., Traugott U., Stone S. H.: Applications of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis to the study of multiple sclerosis. In: *Progress in Multiple Sclerosis Research*. Ed: H. J. Bauer. S. Poser, G. Ritter. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, 3–10.
19. Reinherz E. L., Wiener H. L., Hauser S. L., Cohen J. A., Distaso J. A., Schlossman S. F.: Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. *New Eng. J. Med.*, 1980, 303, 125–129.
20. Teasdale C., Thatcher J., Whitehead R. H., Huges L. E.: Age dependence of T-lymphocytes. *Lancet*, 1976, 1, 1410–1411.
21. Thompson E. J.: Laboratory diagnosis of multiple sclerosis: immunological and biochemical aspects. *Br. Med. Bull.*, 1977, 33, 1, 28–33.
22. Wender M., Goncerzewicz A.: Susceptibility of Wistar rats to encephalitogenic antigen derived from aged animals. *Neuropatol. Pol.*, 1987, 25, 247–252.
23. Zaffaroni M., Caputo D., Ghezzi A., Cazzullo C. L.: T-cell subsets in multiple sclerosis: relationships between peripheral blood and cerebrospinal fluid. *Acta Neurol. Scand.*, 1985, 71, 242–248.

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



KRYSTYNA KOWALCZUK, DANUTA JESIONEK, EWA NOWOSADZKA,  
IRENA BORKOWSKA

## BADANIA AKTYWNOŚCI $\beta$ -MONOOKSYGENAZY DOPAMINOWEJ W MÓZGU I NADNERCZACH KRÓLIKA pt

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Lublin

W ośrodkowym układzie nerwowym królika z dziedziczną drżączką porażną (królik pt) wykazano znaczne różnice w stężeniu amin katecholowych w porównaniu ze stężeniami występującymi u królika zdrowego (Borkowska i wsp. 1986). Dotyczy to przede wszystkim niskiego poziomu dopaminy w pniu mózgu i mózdzku mutantów neurologicznych, przy równoczesnym wyższym poziomie noradrenaliny. Enzymem katalizującym reakcję hydroksylacji dopaminy do noradrenaliny zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym, jest  $\beta$ -monoooksygenaza dopaminowa (Levin i wsp. 1960).

W celu wyjaśnienia, czy obserwowane różnice poziomu noradrenaliny wynikają ze zmian aktywności  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej, podjęto próbę porównania aktywności tego enzymu u królików pt i królików zdrowych. Badania przeprowadzono na zróżnicowanych anatomicznie obszarach ośrodkowego układu nerwowego oraz na nadnerczach.

### MATERIAŁY I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły 6–8 tygodniowe króliki objawowe pt wyhodowane w Zwierzętarzni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Mińsku Mazowieckim oraz króliki zdrowe w tym samym wieku, które pochodziły spoza stada mutantów pt. Po uśmierceniu zwierząt preparowano nadnercza, a z mózgu izolowano pień mózgu i mózdzek, które natychmiast zamrażano.

Aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej oznaczano na podstawie metody Nagatsu i Udenfriend (1972), stosując jako substrat tyraminę. Metoda polega na enzymatycznym przekształcaniu tyraminy w oktopaminę, którą po

utlenieniu do p-hydroksybenzaldehydu oznacza się spektrofotometrycznie przy 330 nm.

Homogenizację tkanek przeprowadzano w buforze Tris-HCl (5 mmol/l) o pH 6,5 z dodatkiem roztworu Triton X-100 w ilości 0,1/100 ml w temperaturze 0°C stosując 10 ml roztworu buforowego na 1,0 g tkanki (Bouclier i wsp. 1977). Homogenat wirowano przez 20 minut przy 10 tys. obrotów/min, a uzyskany supernatant służył do oznaczeń aktywności DBH.

Próby inkubacyjne zawierały: bufor octanowy 1,0 mol/l, pH 5,5–0,2 ml, fumaran sodowy 0,2 mol/l – 0,05 ml, N-etylomaleimid 0,2 mol/l – 0,15 ml, N-metylo-N-benzyl-2-propylaminę 0,02 mol/l – 0,05 ml, kwas askorbinowy 0,2 mol/l, pH 5,5 – 0,05 ml, roztwór katalazy (akt. 35405 jedn. Bergmayera/ml, ~ odpowiada ~41000 U) – 0,30 ml, tyraminę 0,4 mol/l – 0,05 ml oraz homogenat tkankowy 0,05 lub 0,4 ml. Czas inkubacji wynosił 20 lub 60 minut, a temperatura 37°C.

Próby kontrolne zawierały od początku inkubacji inaktywowany enzym. Ze względu na obecność endogennej tyraminy w mózgu zwierząt (Spector i wsp. 1964) przeprowadzono również dodatkową kontrolę w postaci inkubacji homogenatu bez egzogennej tyraminy. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie roztworu kwasu trójchlorooctowego (3 mol/l) w ilości 0,2 ml. Następnie próby wirowano, a klarowny supernatant przenoszono na kolumny Dowex 50 W w formie H<sup>+</sup>. Oktopaminę eluowano przy pomocy 2 ml roztworu NH<sub>4</sub>OH o stężeniu 4 mol/l. Utlenianie oktopaminy do p-hydroksybenzaldehydu przeprowadzano w ciągu 5 minut przez dodanie do eluatu 0,2 ml nadjodanu sodowego o stężeniu 2 g/100 ml, a nadmiar NaJO<sub>4</sub> unieczynniano przy pomocy 0,2 ml pirosiarczynu sodowego o stężeniu 10 g/100 ml. Ilość powstałego p-hydroksybenzaldehydu oznaczano spektrofotometrycznie przy 330 nm. Aktywność β-monooksygenazy dopaminowej w 1 mg badanej tkanki wyrażano ilością nmoli bądź pmoli oktopaminy, która powstała w czasie 1 godz. inkubacji.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej uwzględniając liczbę oznaczeń (n), średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ), odchylenie standardowe (SD) oraz istotność różnic testem C-Cochrana i Coxa (Oktaba 1980).

#### WYNIKI

Przed rozpoczęciem właściwych oznaczeń aktywności β-monooksygenazy dopaminowej zanalizowano efektywność stosowanej metody, biorąc pod uwagę stężenie homogenatu tkanki oraz czas inkubacji w zależności od rodzaju badanej tkanki. Na podstawie otrzymanych wyników przyjęto, że dla oznaczeń w mózgu przeprowadza się inkubację homogenatu z 40 mg tkanki w czasie 60 minut, natomiast dla nadnerczy wystarcza inkubacja z 1,25 mg tkanki w czasie 20 minut.

Badaniem objęto 12 królików pt oraz 10 królików zdrowych. Wyniki z oznaczeń aktywności enzymu w tkance mózgu oraz w nadnerczach poddano analizie statystycznej, a uzyskane wartości ujęto w tabeli 1.

Tabela 1. Aktywność β-monooksygenazy dopaminowej w homogenatach tkanki mózgu oraz nadnercza królika pt i królika zdrowego  
 Table 1. Dopamine-β-hydroxylase activity in homogenates of the brain stem, cerebellum and adrenals of pt and healthy rabbits

Tkanka Tissue	Królik Rabbit	Liczba oznaczeń Number of estimation n	Aktywność (pmol lub nmol/godz./mg tkanki) Activity (pmol or nmol/h/mg tissue) $\bar{X} \pm SD$	Porównanie grup Groups comparison	
				wartość funkcji testowej value of test's function	P
pień mózgu brain stem	pt	18	140,67 ± 29,67 (pmol)	C° = 2,45	< 0,05
	zdrowy healthy	13	114,95 ± 26,56 (pmol)		
móżdżek cerebellum	pt	15	61,35 ± 16,27 (pmol)	C° = 1,48	nieistotne insignificant
	zdrowy	14	52,48 ± 16,00 (pmol)		
nadnercza adrenals	pt	16	68,42 ± 27,52 (nmol)	C° = -1,81	nieistotne insignificant
	zdrowy healthy	32	82,33 ± 15,95 (nmol)		

Jak wynika z przedstawionych danych, zarówno u zwierząt zdrowych, jak i mutantów pień mózgu wykazuje dwukrotnie wyższą aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej w stosunku do aktywności występującej w mózdzku. Dla mutantów pt wartość średnia wynosiła w pniu mózgu 140,67 pmol/godz./mg tkanki, a w mózdzku 61,35 pmoli, natomiast u królików zdrowych aktywność w pniu wynosiła 114,95 pmol/godz./mg tkanki, a w mózdzku 52,48 pmoli. Porównując grupę królików pt z grupą zwierząt kontrolnych można zauważyć, że aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej przypadająca na mg tkanki jest nieznacznie większa w mózgu królików pt. Po uwzględnieniu wartości testowej ( $C^\circ$ ) oraz wartości granicznej ( $C_{0,05}$ ) stwierdzono, że różnica statystycznie istotna dotyczy tylko aktywności w pniu mózgowym ( $p \leq 0,05$ ).

Wyniki badań przeprowadzonych na nadnerczach wykazały, że nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą królików pt i zdrowych. U mutantów pt aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej odpowiadała najczęściej wartości około 70 nmol/godz./mg tkanki, a u zwierząt kontrolnych wartości 80 nmol/godz./mg tkanki.

Na podstawie danych zamieszczonych w tabeli 1 i uwzględniając masę poszczególnych tkanek obliczono całkowitą aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej w badanych tkankach ("aktywność narządowa"). Uzyskane wartości przedstawia tabela 2. Ponieważ masa pnia mózgu królika pt wynosiła średnio 1709 mg (wahała się w granicach od 1380 mg do 2120 mg), a u królika zdrowego 1835 mg (od 1350 do 2280 mg), wynik aktywności całkowitej dla pnia mózgu mutantów odpowiada wartości 4,0 nmol/min, zaś dla grupy zwierząt kontrolnych 3,5 nmol/min. Średnia waga mózdzku królika pt wynosiła 868 mg (779–1100 mg), a mózdzku królika zdrowego 1076 mg (780–1260 mg), tak więc całkowita aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej mózdzku wynosi dla obu badanych grup około 0,9 nmol/min.

Mimo że waga nadnerczy jest 10–20-krotnie niższa od wagi mózdzku lub pnia mózgu, to "aktywność narządowa" nadnerczy jest kilkadziesiąt razy większa. I tak średnia waga nadnerczy mutantów wynosiła 56,7 mg (42–70 mg), a zwierząt kontrolnych 58,7 mg (35–72 mg); całkowita aktywność badanego enzymu odpowiada więc wartości 64,65 nmol/min dla królików pt i 80,54 nmol/min dla królików zdrowych.

Tabela 2. Całkowita aktywność  $\beta$ -monoooksygenazy dopaminowej pnia mózgowego, mózdzku, nadnerczy królika pt i królika zdrowego (nmol/min)

Table 2. Total activity of dopamine-  $\beta$ -hydroxylase in pt and healthy rabbits brain stem, cerebellum and adrenals (nmol/min)

Królik Rabbit	pień mózgu brain stem	mózdzek cerebellum	nadnercza adrenals
pt	4,00	0,89	64,65
zdrowy healthy	3,51	0,94	80,54

Reasumując dane zawarte w tabelach można stwierdzić, że z wyjątkiem pnia mózgu nie ma znamiennych różnic w aktywności  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej pomiędzy grupą królików pt a grupą zwierząt kontrolnych.

#### OMÓWIENIE

Przedstawiona praca jest kontynuacją naszych poprzednich badań dotyczących amin katecholowych w ośrodkowym układzie nerwowym królika pt. Zainteresowanie  $\beta$ -monooksygenazą dopaminową wynikało z faktu, że w poprzedniej pracy stwierdzono diametralnie różny stosunek stężeń dopaminy do noradrenaliny w mózgu królika pt w porównaniu ze zdrowym zwierzęciem. U mutantów wynosił on 0,5, a w grupie kontrolnej powyżej jedności. Wiadomo, że markerem dla noradrenergicznego układu nerwowego jest  $\beta$ -monooksygenaza dopaminowa (Hartman i wsp. 1972), która katalizuje ostatni etap syntezy noradrenaliny.

Beta-monooksygenaza dopaminowa jest miedzioproteiną i podczas reakcji hydroksylacji,  $\text{Cu}^{2+}$  ulega cyklicznej redukcji i utlenianiu (Friedman, Kaufman 1965). W związku z tym, związki chelatujące i sulfhydrylowe, które tworzą kompleksy z  $\text{Cu}^{2+}$ , hamują aktywność enzymu (Nagatsu i wsp. 1967). Potencjalnymi inhibitorami  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej mogą być również niektóre analogony dopaminy (Creveling i wsp. 1962). Przypuszcza się, że proces inaktywacji oraz ponownej reaktywacji enzymu przez związki będące zarówno substratem, jak i inhibitorem dla  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej, zależy w dużym stopniu od pH środowiska (Colombo i wsp. 1984). W większości tkanek organizmu występują tego rodzaju endogenne inhibitory, dlatego też w nie oczyszczonych preparatach tkankowych aktywność  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej jest niewielka. W badaniach *in vitro* stosuje się zatem oprócz substancji zabezpieczających enzym przed jego inaktywacją również substancje, które znoszą hamujące działanie endogennych inhibitorów.

W oznaczeniach przeprowadzanych na homogenatach tkankowych dodatkową przeszkodę stanowi obecność noradrenaliny, której duże stężenie hamuje reakcję hydroksylacji dopaminy. W metodach, w których stosuje się jako substrat dopaminę, należy przed wykonaniem oznaczenia oddzielić enzym od endogennej noradrenaliny. W tym celu stosowana jest ekstrakcja enzymu przy użyciu Con-A-Sefarozy (Racz i wsp. 1986). Istnieją jednak metody, gdzie zamiast dopaminy stosuje się tyraminę (Kuzuya, Nagatsu 1968; Nagatsu, Udenfriend 1972). W naszych doświadczeniach posłużono się tym składem medium inkubacyjnego, który zawiera jako substrat tyraminę.

Przeprowadzone badania wykazały, że w odróżnieniu od nadnerczy, homogenat tkanki mózgu królika wykazuje bardzo małą aktywność  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej. Niemniej stwierdzono zasadnicze różnice rozmieszczenia enzymu w zależności od obszaru anatomicznego mózgu. Zgodnie z przewidywaniami, pień mózgu, jako obszar noradrenergiczny, wykazuje

zdecydowanie większą aktywność niż mózdzek. Podobne wyniki uzyskali Bouclier i wsp. (1977), którzy przy użyciu radioaktywnej tyraminy badali aktywność narządową nadnerczy szczura i otrzymali wartość 2,35 nmol/min. i myszy (u szczura pień — 100 pmol/godz./mg tkanki, a mózdzek — 56 pmol/godz./mg tkanki; u myszy pień 64 pmol/godz./mg, mózdzek zaś 33 pmol/godz./mg tkanki). Wspomniani autorzy badali również całkowitą aktywność narządową nadnerczy szczura otrzymali wartość 2,35 nmol/min. U królika uzyskaliśmy 30-krotnie wyższą wartość badanego enzymu (tab. 2). Tak duża różnica wynika nie tylko z większej masy nadnerczy królika, lecz również z jego odmienności gatunkowej. Królik, w odróżnieniu od szczura, a także człowieka, należy do tych zwierząt, u których w tkance chromafinowej nadnerczy noradrenalina dominuje nad adrenaliną.

Zasadniczym celem naszych badań było porównanie aktywności  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej w mózgu królika pt z aktywnością królika zdrowego. Chociaż aktywność wyrażona w pmol/mg tkanki była nieco wyższa w grupie mutantów neurologicznych (tab. 1), to na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że istotna różnica występuje tylko w pniu mózgu. W związku z tym nie wydaje się możliwe, żeby tak niewielki wzrost aktywności  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej był przyczyną wyższych stężeń noradrenaliny, jakie stwierdzono u mutantów pt (Borkowska i wsp. 1986). Należy więc szukać innej przyczyny zmian w poziomie amin katecholowych w mózgu królika pt.

Wiadomo że na skutek zahamowania aktywności oksydazy monoaminowej (MAO) wzrasta zawartość noradrenaliny w pęcherzykach magazynujących aminy katecholowe. Być może w mózgu królików pt ulega zmianie aktywność MAO, problem wymaga więc dodatkowych badań.

Ponadto należałoby się zastanowić nad miejscem magazynowania noradrenaliny i enzymu odpowiedzialnego za jej syntezę w przypadku dużych zmian morfologicznych, jakie występują w strukturach pnia mózgu i mózdzku u mutantów pt. Wiadomo że w warunkach fizjologicznych noradrenalina gromadzi się w obrębie neuronu w charakterystycznych pęcherzykach, a z błoną tych organelli związana jest również  $\beta$ -monooksygenaza dopaminowa. Nasuwa się wobec tego pytanie, czy istnieje możliwość magazynowania noradrenaliny i enzymu również poza neuronem, a mianowicie w komórkach glejowych, podobnie jak to ma miejsce w przypadku nowotworów neuroglejowych. Jak wynika z pracy Zelman i Taraszewskiej (1984), zagęszczenie komórek glejowych w mózgu królika pt jest znacznie większe i dłużej utrzymujące się niż u królika zdrowego. Komórki te mogłyby zatem stanowić dodatkowy magazyn noradrenaliny i  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej. Ponieważ nasze badania nad aktywnością  $\beta$ -monooksygenazy dopaminowej, a także oznaczenie amin biogennych były przeprowadzone na całej tkance bez izolowania komórek glejowych, udział tych ostatnich możemy traktować tylko jako hipotezę do rozstrzygnięcia w dalszych badaniach.

DOPAMINE- $\beta$ -HYDROXYLASE ACTIVITY IN THE BRAIN AND SUPRARENAL GLANDS OF pt RABBIT

## Summary

The activity of dopamine- $\beta$ -hydroxylase was determined in the case of rabbits with hereditary paralytic tremor (pt), showing marked differences in the level of catecholamines in the central nervous system. Activity of the enzyme was investigated in a homogenate of brain tissue and adrenals using the method of converting tyramine to octopamine, which was determined with the help of spectrophotometry, after conversion to p-hydroxybenzaldehyde.

It was found that the activity of the investigated enzyme is higher in the pt rabbit's brain stem than in the brain of the healthy rabbit. In the cerebellum, however, no statistically significant difference was found. Both in the case of the control group and the neurological mutants, the activity of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in the adrenals was much higher than that appearing in the brain.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ДОФАМИНОВОЙ  $\beta$ -МОНООКСИГЕНАЗЫ В МОЗГУ И НАДПОЧЕЧНИКАХ КРОЛИКА РТ

## Резюме

Определялась активность дофаминовой  $\beta$ -монооксигеназы у кроликов с наследственным дрожательным параличом (pt), в центральной нервной системе которых наблюдаются большие разницы в уровне катехоламинов. Активность энзима исследовалась в гомогенате ткани мозга и в надпочечниках при помощи метода, заключающегося в преобразовании тирамина в октофамин, который после его превращения в п-гидроксibenзальдегид определялся спектрофотометрически.

Установлено, что активность исследуемого энзима была выше в мозговом стволе кролика (pt), чем в мозговом стволе здорового животного. В то же время в мозжечке не было статистически существенной разницы в активности этого энзима. Активность дофаминовой  $\beta$ -монооксигеназы в надпочечниках как здоровых животных, так и неврологических мутантов была во много раз выше активности в мозгу.

## PIŚMIENICTWO

1. Borkowska I., Jesionek D., Solski J., Wójcicka B.: Poziom amin katecholowych w mózgu królika pt. *Neuropatol. Pol.*, 1986, 24, 69–77.
2. Bouclier M., Mandel P., Anusi D.: Microdetermination of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activities using a simplified, single step radioenzymatic assay. *Pharmacol. Res. Commun.*, 1977, 9, 743–754.
3. Colombo G., Rajashekhar B., Giedroc D., Villafranca J.: Alternate substrates of dopamine- $\beta$ -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 1593-1600; 1601-1606.
4. Creveling C., Daly J., Witkop B., Udenfriend S.: Substrates and inhibitors of dopamine- $\beta$ -oxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, 64, 125–134.
5. Friedman S., Kaufman S.: 3,4-Dihydroxyphenylethylamine- $\beta$ -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 4763–4773.

6. Hartmen B., Zide D., Udenfriend S.: The use of dopamine- $\beta$ -hydroxylase as a marker for the central noradrenergic nervous system in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1972, 69, 2722–2726.
7. Kuzuya H., Nagatsu T.: A Simple assay of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in the homogenate of the adrenal medulla. *Enzymol. Biol. Clin.*, 1968, 36, 31–38.
8. Levin E., Levenberg B., Kaufman S.: The enzymatic conversion of 3,4-dihydrophenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2080–2086.
9. Nagatsu T., Kuzuya H., Hidaka H.: Inhibition of dopamine- $\beta$ -hydroxylase by sulfhydryl compounds and the nature of the natural inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 139, 319–327.
10. Nagatsu T., Udenfriend S.: Photometric assay of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in human blood. *Clin. Chem.*, 1972, 18, 980–983.
11. Okta W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa*. PWN, Warszawa, 1980, 132–133.
12. Racz K., Kuchel O., Debinski W., Buu N.: Improves liquid chromatographic determination of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in tissues and plasma. *J. Chromatogr.*, 1986, 382, 117–125.
13. Spector S., Melmon K., Lovenberg W., Sjoerdsma A.: The presence and distribution of tyramine in mammalian tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1963, 140, 229–231.
14. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205–218.

Adres autorów: Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej A. M., ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin.



MICHAŁ WALSKI, JERZY BOROWICZ

## BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE ELEMENTÓW SZKIELETU KOMÓRKOWEGO NEURONÓW JĄDER NEUROSEKRECYJNYCH PODWZGÓRZA SZCZURA

Instytut Biostruktury Akademii Medycznej, Warszawa, Pracownia Ultrastruktury Układu  
Nerwowego, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Badania mikroskopowo-elektronowe z zastosowaniem różnych technik utrwalania komórek wykazały, że substancja podstawowa cytoplazmy ma strukturę siateczkową (Wolosewick, Porter 1976; 1979). Mikrotrabekularna siateczka jest utworzona ze spolimeryzowanych białek, pomiędzy którymi istnieje faza wodna zawierająca niskocząsteczkowe metabolity. Obecnie uważa się, że siateczka ta jest jednym z elementów szkieletu wewnątrzkomórkowego. Poza tym szkielet komórkowy jest reprezentowany przez mikrotubule, filamenty pośrednie i mikrofilamenty (Weber i wsp. 1978; Groniowski 1981). Według Groniowskiego (1981) szkielet komórkowy jest odpowiedzialny za istnienie ładu wewnątrzkomórkowego. W celu ujawnienia elementów szkieletu komórkowego metodami cytochemicznymi stosowano barwniki polikationowe, takie jak czerwień rutenu (Dolapchieva i wsp. 1986), azotan lantanu (Burton, Fernandez 1973) oraz błękit alcjany (Schofield i wsp. 1975). Powinowactwo tych barwników do składowych szkieletu komórkowego wskazuje, iż w ich skład wchodzi glikoproteiny (Hinkley 1973). Stosowane obecnie utrwalacze aldehydowe wraz z kwasem taninowym dają dobre wyniki w uwidacznianiu błon plazmatycznych, mikrotubul oraz filamentów (Hepwood 1985). Ostatnio ta metoda została wzbogacona dodatkową procedurą dotrwalania osmem wraz z żelazocyjankiem potasu i dobarwianiem materiału tkankowego przed odwodnieniem solami uranu (Goldfischer i wsp. 1981; King, Hiams 1982).

Badania szkieletu komórkowego prowadzono zarówno na komórkach, pochodzących z hodowli tkankowych, jak również na komórkach niez izolowanych, pochodzących z różnych tkanek zwierzęcych (Bretscher, Weber 1980; Mesland, Spicle 1983). Istotnym problemem dyskutowanym przez autorów

tych prac był dobór techniki utrwalania oraz metoda mogąca w sposób jak najbardziej wiarygodny uwidocznić szkielet komórkowy. Stosowane techniki szybkiego zamrażania izolowanych komórek, a następnie napylenie ich powierzchni warstwą węgla, umożliwiły, między innymi, dokonanie obserwacji sieci mikrotrabekularnej w fibroblastach (Houser, Kirschner 1980), jak również molekularnej organizacji mikrotubul i mikrofilamentów w komórkach nerwowych (Hirokawa 1982; 1986). Komórka nerwowa ze względu na swoją funkcję i specyficzną budowę jest dogodnym modelem do badań szkieletu komórkowego. Zwraca się szczególną uwagę na elementy szkieletu reprezentujące aksoplazmę w postaci mikrofilamentów cytoplazmatycznych, filamentów towarzyszących mikrotubulom, a w szczególności na mikrotubule (Metuzala i wsp. 1980; Jockusch, Jockusch 1981). Mikrotubule, które w komórkach nerwowych noszą nazwę neurotubul, podobnie jak neurofilamenty, biegną równolegle do długiej osi neuronu. Tym strukturom przypisuje się udział w procesie transportu aksonalnego, jak również uważa się, że odgrywają one dużą rolę w formowaniu i orientacji pęcherzyków w synaptosomach (Gray i wsp. 1982; Allen, Weiss 1985).

Większość badań z użyciem wyznaczników komponent glikoproteinowych szkieletu komórkowego prowadzono na izolowanych neuronach zwierząt zmiennoocieplnych, co było podyktowane możliwością łatwiejszej penetracji stosowanych wyznaczników (Burton, Fernandez 1973; Hinkley 1973).

Badania przedstawione w niniejszej pracy prowadzono na neuronach jąder sekrecyjnych podwzgórza szczurów mając na celu zobrazowanie elementów szkieletu komórkowego. Do badań zastosowano utrwalacze aldehydowe wraz z błękitem alcjanu oraz jako kontrolę utrwalacze z kwasem taninowym, uważając je za dobre wyznaczniki elementów wewnątrzkomórkowego szkieletu.

#### MATERIAŁ I METODY

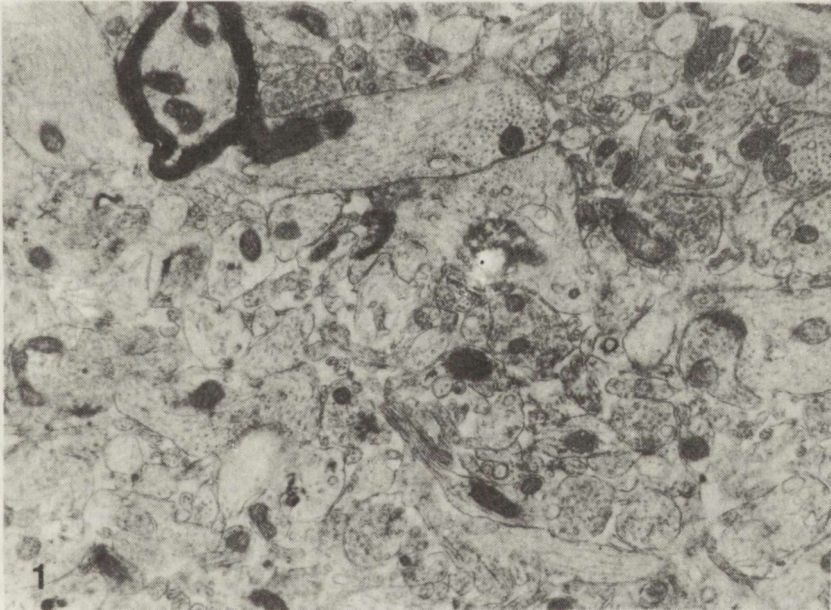
Materiał pobierano z jąder nadwzrokowych i przykomorowych podwzgórza szczurów rasy Wistar, o masie ciała około 200 g, bezpośrednio po dekapitacji. Okolice mózgu, z których pobierano wycinki tkankowe o wymiarach  $0,5 \times 0,5$  mm w trakcie pobierania opłukiwano płynem utrwalającym. Tkanekę pobraną od każdej grupy zwierząt utrwalano według następujących zasad:

- 1) Utrwalacz A składał się z 2% glutaraldehydu, 1,5% paraformaldehydu i 0,5% błękitu alcjanu w 0,2 M buforze kakodylanowym o pH 7,4. Utrwalanie prowadzono przez 3 godz. w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$  z zachowaniem ciągłego ruchu płynu utrwalającego. Następnie wycinki tkankowe płukano w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4 z dodatkiem błękitu alcjanu w stężeniu 0,5%. Dotrwalanie prowadzono 3 godz. w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$  w 1,5%  $\text{OsO}_4$  w 0,1 M buforze kakodylanowym, do którego dodano błękit alcjanu w ilości 0,5%.

2) Utrwalacz B zawierał 2,5% glutaraldehyd, 2% paraformaldehyd i 1% kwas taninowy w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4. Utrwalanie prowadzono przez 6 godz. w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$ , a następnie płukano przez 24 godz. w 0,1 M buforze kakodylanowym. Kolejno preparaty inkubowano przez 30 min w 0,8 % wodnym roztworze żelazocyjanku potasu i dotrwalało w temperaturze pokojowej w 1%  $\text{OsO}_4$  w 0,1 M buforze kakodylanowym z dodatkiem 0,8% żelazocyjanku potasu przez 60 min. Po trzykrotnym przepłukaniu materiału w 0,1 M buforze kakodylanowym preparaty kontrastowano "w bloku" w 1% wodnym roztworze octanu uranylu przez 1 godz. Materiały tkankowe utrwalane według 1 i 2 procedury, odwadniano w szeregu alkoholi i tlenku propylenu i zatapiano do Eponu 812. Dokumentację wykonano na mikroskopie elektronowym JEM 7A. Wymiary omawianych elementów oceniano na podstawie pomiarów dokonanych na mikrografiach elektronowych o stałym powiększeniu wynoszącym  $150\,000 \times$ .

#### WYNIKI

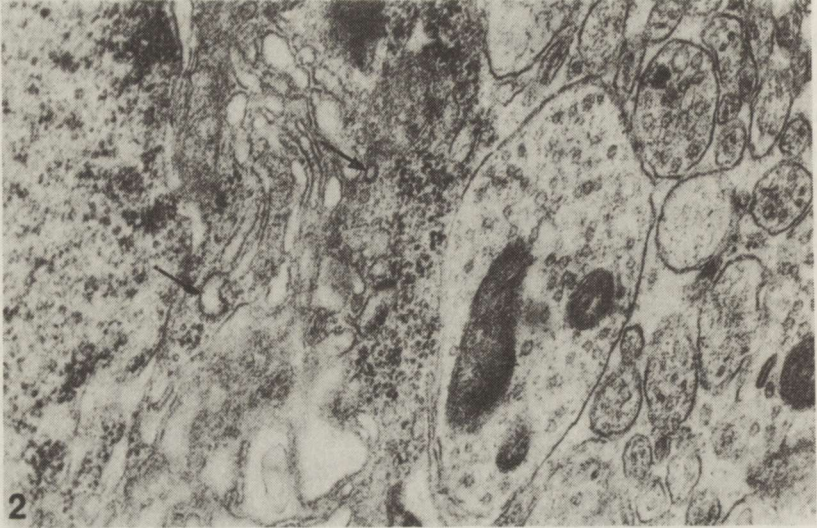
Obraz komórek nerwowych pochodzących z jąder neurosekrecyjnych podwzgórza szczura utrwalanych w aldehydach z jednoczesnym "dobarwianiem" błękitem alcjana (utrwalacz A) wykazuje dobre zróżnicowanie elementów morfotycznych komórek. Widoczne jest dobre zachowanie błon plazmatycznych z jednoczesnym podkreśleniem ich rysunku (ryc. 1). W pobliżu jądra



Ryc. 1. Reakcja z błękitem alcjana. Neurony jądra nadwzrokowego mózgu szczura. W aksonach widoczne liczne neurotubule. Pow.  $10\,500 \times$

Fig. 1. Alcian blue reaction. Neurons of supraoptic nucleus. Axons containing numerous neurotubules.  $\times 10\,500$

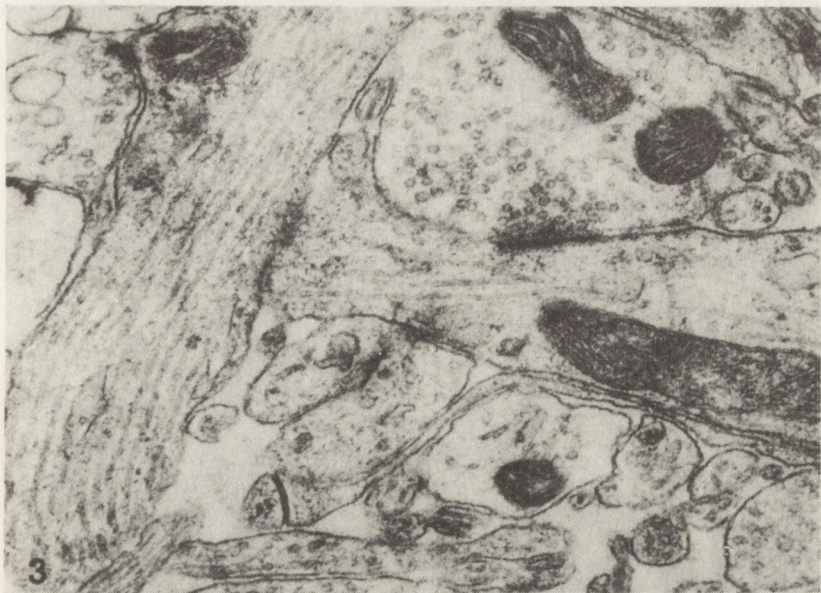
komórkowego obserwowano kompleks Golgiego zajmujący duży obszar cytoplazmy. Zbudowany był on ze spłaszczonych lub szerokich zbiorników ułożonych równolegle oraz pęcherzyków związanych ze zbiornikami, lub też położonych w ich sąsiedztwie. Niekiedy w obrębie zbiorników i pęcherzyków obserwowano delikatny elektronowęsty materiał (ryc. 2).



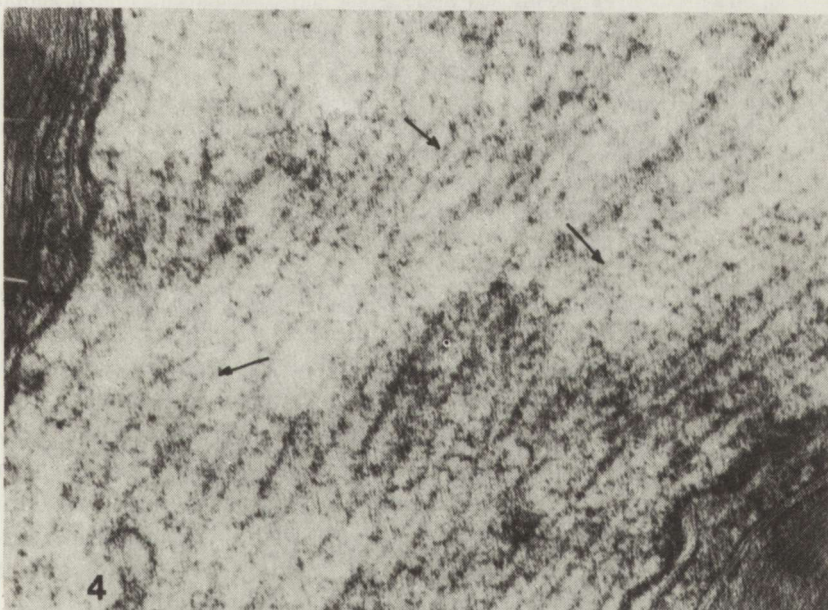
Ryc. 2. Reakcja z błękitem alcjanu. Fragment neuronu jądra przykomorowego. Przy jądrze komórkowym widoczny kompleks Golgiego. W obszarze pęcherzyków kompleksu Golgiego delikatny produkt reakcji (strzałki). Pow. 36 000 ×

Fig. 2. Alcian blue reaction. Fragment of a neuron of paraventricular nucleus containing Golgi complex. In the vicinity of the Golgi complex a slight reaction product is seen (arrows). × 36 000

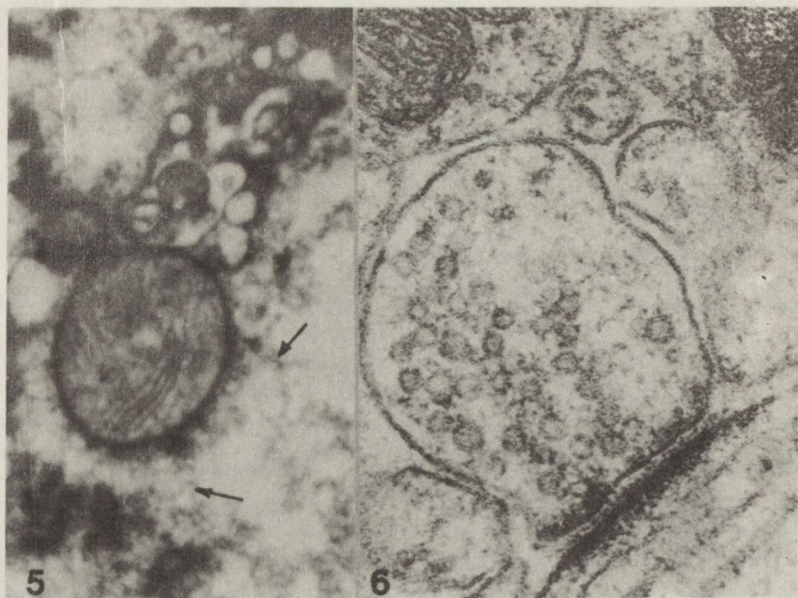
W aksonach na przekrojach podłużnych obserwowano liczne równoległe ułożone neurotubule. Ich szerokość wahała się w granicach 22–30 nm (ryc. 3). Kolejnym elementem strukturalnym cytoplazmy, dobrze uwidocznionym po zastosowaniu błękitu alcjanu, były układy neurofilamentów (ryc. 4). Z przeprowadzonych pomiarów wynika, iż grubość neurofilamentów waha się w granicach 5–11 nm. W ultraskrawkach pochodzących z obwodowych części blozków tkankowych, gdzie penetracja błękitu alcjanu była ułatwiona, obserwowano produkt reakcji o nieco zwiększonej gęstości elektronowej. Tworzył on delikatną siateczkę. Jej wyznakowane błękitem alcjanu fragmenty przylegały do powierzchni mitochondriów, błon innych struktur cytoplazmy oraz neurotubul (ryc. 5). Dodatnią reakcję z błękitem alcjanu obserwowano wśród błon tworzących osłonki mielinowe. W badanym materiale były również dobrze widoczne synaptosomy, a w szczególności strefy błon pre- i postsynaptycznych. Na powierzchni błon ograniczających szczelinę synaptyczną obserwowano drobnowłókienkowy oraz ziarnisty materiał, który w części postsynaptycznej posiadał bogatszy rysunek (ryc. 6).



Ryc. 3. Reakcja z błękitem alcjanu. W aksonach jądra nadwzrokowego widoczne neurotubule na przekroju podłużnym. Do włókna nerwowego przylega kolbka synaptyczna. Pow. 36 000 ×  
 Fig. 3. Alcian blue reaction. Axons originating in supraoptic nucleus showing longitudinally sectioned neurotubules. Note synaptic bouton close to the nerve fiber. × 36 000



Ryc. 4. Reakcja z błękitem alcjanu, jądro przykomorowe. We wnętrzu włókna nerwowego widoczna sieć neurofilamentów (strzałki). Przestrzenie między blaszkami osłonki mielinowej wyznakowane produktem reakcji. Pow. 110 000 ×  
 Fig. 4. Alcian blue reaction, paraventricular nucleus. Nerve fiber displaying the network of neurofilaments (arrows). Note the reaction product between membranes of myelin sheath. × 110 000



Ryc. 5. Reakcja z błękitem alcjanu, jądro przykomorowe. Na powierzchni mitochondrialnej błony zewnętrznej oraz fragmentach siateczki śródplazmatycznej elektronowo-gęsty produkt reakcji. W otoczeniu mitochondrium delikatna siateczka, która może stanowić fragment siatki mikrotrabekularnej (strzałki). Pow. 42 000 ×

Fig. 5. Alcian blue reaction. Paraventricular nucleus. The surface of mitochondrial membrane and some fragments of endoplasmic reticulum contain the reaction product. Note fine mesh around the mitochondrium, it probably represents a fragment of the microtrabecular network (arrows).  
× 42 000

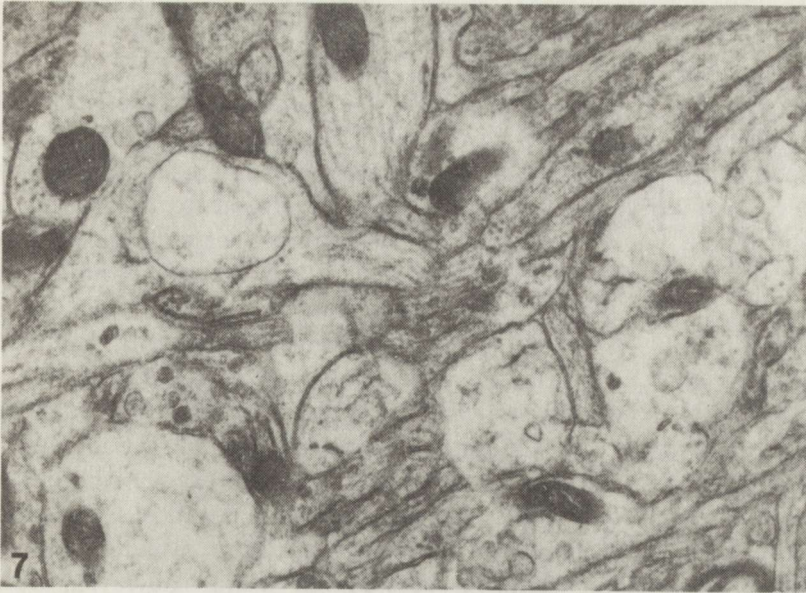
Ryc. 6. Reakcja z błękitem alcjanu, jądro przykomorowe. Kolbka synaptyczna przylegająca do aksonu. Na błonach pre- i postsynaptycznych uwidoczniony został drobnowłókienkowy materiał. Pow. 65 000 ×

Fig. 6. Alcian blue reaction. Paraventricular nucleus. The synaptic bouton laying close to the axon profile displays fine fibrillar material in association with pre- and postsynaptic membranes.  
× 65 000

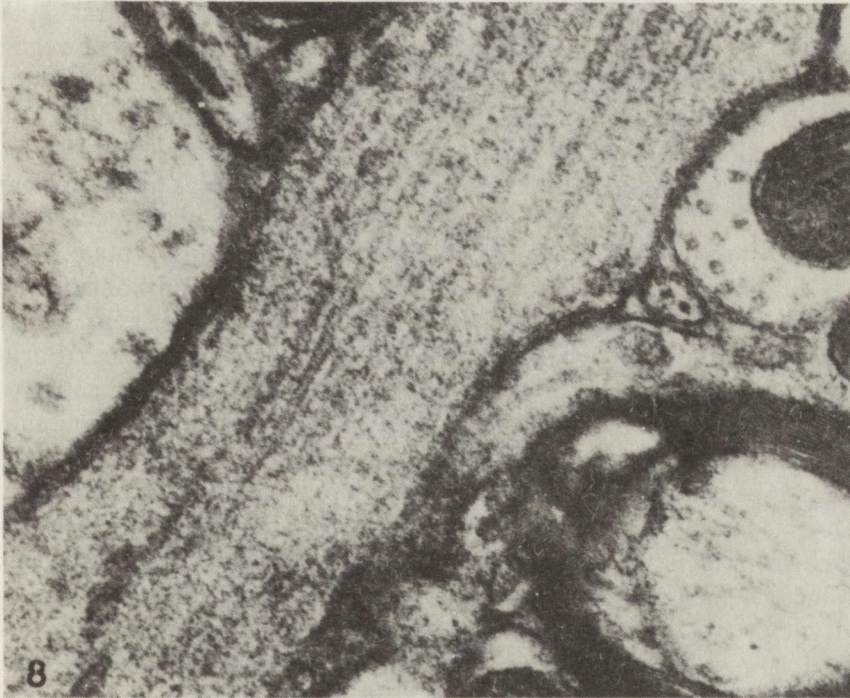
Zastosowana metoda utrwalania jąder neurosekrecyjnych podwzgórza w utrwalaczach aldehydowych z kwasem taninowym (utrwalacz B) oraz dotrwalanie materiału w mieszaninie żelazocyjanku potasu z czterotlenkiem osmu wykazała bardzo duże zróżnicowanie wszystkich struktur błonowych. Również rysunek neurotubul i neurofilamentów został ujawniony bardzo przejrzysto i kontrastowo. Nie ujawniły się jednak przy tym sposobie utrwalania fragmenty opisane po zastosowaniu utrwalacza A (ryc. 7). W tej technice utrwalania (B) rysunek ścian poszczególnych neurotubul jest bardzo wyraźny. Na przekrojach poprzecznych kolisty profil neurotubul ma średnicę 20–28 nm (ryc. 8).

#### OMÓWIENIE

Badania biochemiczne prowadzone w ostatnich dziesiątkach lat wykazały, że struktury zawarte w cytoplazmie podstawowej, we wszystkich dotychczas przebadanych komórkach, zawierają glikoproteiny. Znaczna część tych związ-



Ryc. 7. Utrwalanie z kwasem tanninowym i żelazocyjankiem potasu. Jądro przykomorowe. W widocznych fragmentach neuronów neurotubule oraz neurofilamenty. Pow. 36 000 ×  
 Fig. 7. Fixation with tannic acid and ferrocyanide. Paraventricular nucleus. Neurotubules and neurofilaments are seen within the fragments of secretory neurons. × 36 000



Ryc. 8. Utrwalanie z kwasem tanninowym i żelazocyjankiem potasu. Jądro nadwzrokowe. We fragmencie neuronu uwidocznione ułożone równolegle neurotubule. Pow. 80 000 ×  
 Fig. 8. Fixation with tannic acid and ferrocyanide. Supraoptic nucleus. Fragment of neurons showing parallel arrangement of neurotubules. × 80 000

ków ma charakter białek integralnych błon organelli komórkowych, chociażby mitochondriów (Martin, Bosmann 1971). Prowadzone w połowie lat siedemdziesiątych badania (Autori i wsp. 1975) wykazały obecność glikoprotein zarówno adsorbowanych na błonach frakcji mikrosomalnej komórek wątrobowych, jak również w wolnym od ultrastruktur przesączu. Ta ostatnia frakcja glikoproteinowa nie ulegała precypitacji z przeciwciałami białek surowicy, zawierała zaś dziesięciokrotnie więcej kwasu N-acetyloneuraminowego w porównaniu do białek surowicy. Zastosowanie bezjonowego detergentu (Triton WR-1339) wykazało, iż również absorbowane na mikrosomach glikoproteiny należą do "wolnej" frakcji sialoprotein substancji podstawowej cytoplazmy. Dalsze badania cytowanych autorów (Autori i wsp. 1975) sugerują, że są one uwalniane z aparatu Golgiego, a następnie wbudowywane do mikrosomów. Część tych glikoprotein stanowić może element puli białkowej tworzącej siatkę mikrotrabekularną. Nie można jednak wykluczyć jeszcze innej możliwości syntezy tych białek. Wiadomo chociażby z badań nad syntezą cząsteczek kolagenu, że znaczna część zmian potranslacyjnych, a w tym początek glikozylacji, zachodzi już na terenie siateczki śródplazmatycznej (Hay 1983). Być może ten mechanizm dotyczy glikoprotein wchodzących w skład sieci mikrotrabekularnej. Tym też można tłumaczyć brak wyraźnej reakcji z błękitem alcjanu na terenie aparatu Golgiego, zakładając pominięcie tego ostatniego w procesie ostatecznej syntezy białek sieci mikrotrabekularnej. Stosowane metody cytochemiczne do badania szkieletu komórkowego przy użyciu barwników polikationowych (Tani, Ametani 1970), kwasu taninowego (Mizuhira, Futaesaku 1972), jak również utrwalania w mieszaninie osmu z żelazocyjankiem po osu dały dobre rezultaty (McDonald 1983; 1984).

W naszym materiale błękit alcjanu ujawnił produkt reakcji na powierzchni neurotubul. Castejon i wsp. (1976) stwierdzają, iż powinowactwo błękitu alcjanu do mikrotubul ewidentnie wykazuje obecność glikoprotein przylegających do ścian. Obserwacje te zostały potwierdzone testami kontrolnymi: po trawieniu hialuronidazą jądrową uzyskano znacznie zmniejszony efekt barwienia błękitem alcjanu ścian mikrotubul. Lantan stosowany przez Burtona i Fernandez (1973) do badania izolowanych neuronów z mózgu ryb wybarwił części rdzenne mikrotubul. Według sugestii wymienionych autorów rdzeń mikrotubul może być reprezentantem elementów odpowiedzialnych za transport wewnątrztrabekularny, a neurotubule mogą spełniać funkcje dyfuzyjnych kanałów dla transportu wybranych substancji kationowych. Podsumowując ważkość prowadzonych badań z zastosowaniem lantanu, autorzy wskazują na dobre ujawnienie grup polianionowych oraz wykazanie komponent mukopolisacharydowych po zastosowaniu azotanu lantanu. Hinkley (1973) stosując błękit alcjanu w badaniu mózgu ryb ujawnił drobnowłókienkową siateczkę łączącą mikrotubule w obrębie aksonu i sugeruje, iż te włókienkowe elementy mogą formować "układ siateczkowy" dla transportu materiału. Obserwacje te dotyczyły włókienek łączących mikrotubule, pęcherzyki synaptyczne oraz mikrotubule i mitochondria. Badania prowadzono również z użyciem



siarczanu winblastyny, który blokował transport wewnątrzaksonalny, powodował rozrywanie większości mikrotubul, jak również uszkadzał "włókienka" tworzące siateczkowate połączenie mikrotubul (Fernandez i wsp. 1971).

Zastosowany w naszych badaniach błękit alcjanu wyznakował również drobnowłókienny materiał przylegający do strefy błon pre- i postsynaptycznych. Przeprowadzone badania enzymantyczne mające na celu identyfikację składu chemicznego włókienek strefy błon synaptycznych wykazały obecność glikoprotein bogatych w kwas hialuronowy i chondroitynosiarczanowy (Castejon i wsp. 1976).

W prowadzonych przez nas badaniach dla indentyfikacji struktur szkieletu komórkowego zastosowaliśmy utrwalanie z kwasem taninowym, a następnie dotrwalanie mieszaniną osmu z żelazocyjankiem potasu. To postępowanie stanowiło pewnego rodzaju badanie kontrolne dla użytej metody z błękitem alcjanu. Kwas taninowy został wprowadzony do mikroskopii elektronowej jako dodatek do utrwalaczy aldehydowych, wzbogacający kontrast struktur zewnątrz i wewnątrzkomórkowych, a w szczególności błon plazmatycznych (Hopwood 1985). Przyjmuje się, że stosowane utrwalacze aldehydowe zawierające kwas taninowy reagują z polipeptydami i proteinami, a następnie tworzą trwałe chelatowe połączenia z osmem lub żelazem (Futaesaku, Mizuhira 1972). Podkreśla się również, iż kwas taninowy stabilizuje komponenty fosfolipidowe zapobiegając ich ekstrakcji podczas odwadniania. Wymienione właściwości utrwalacza aldehydowo-taninowego sprawiły, iż był on stosowany do badań błon plazmatycznych oraz płaszcza powierzchniowego komórek nabłonka jelitowego, nabłonka nefronu, rzęsek drzewa oskrzelowego, włókienek keratynowych, mikrotubul i innych struktur (Mizuhira, Futaesaku 1972; Walski, Olszewska 1981). W analizowanych przez nas preparatach utrwalanych kwasem taninowym podstawowe składniki szkieletu komórkowego, w szczególności neurotubule i neurofilamenty miały bardzo wyraźny rysunek, co potwierdza przydatność tej metody do rutynowych badań cytoskeletonu.

Zastosowane przez nas techniki badania szkieletu komórkowego jąder neurosekrecyjnych podwzgórza mózgu szczura pozwoliły dokonać obserwacji poszczególnych jego składowych. Błękit alcjanu uwidoczniał delikatne struktury siateczkowe, które mogą odpowiadać anionowej sieci mikrotrabekularnej szkieletu komórkowego. Uważamy przeto, iż stosowane przez nas metody będą przydatne do dalszych badań ładu wewnątrzkomórkowego na modelach doświadczalnych.

#### ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF CYTOSKELETAL ELEMENTS IN HYPOTHALAMIC ENDOCRINE NEURONS

##### Summary

Endocrine neurons of hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei of the rat were investigated to elucidate the elements of the cell cytoskeleton. Two fixation methods were used: A) in aldehydes containing alcian blue and B) in aldehydes containing tannic acid. Specimens fixed in

tannic acid were postfixed in a mixture of ferrocyanide and osmium tetroxide. Alcian blue labelled the neurotubule wall and the surface of neurofilaments. Fragments of the microtrabecular network were also visible. Some fine filaments were well revealed in association with synaptic membranes. The reaction product also appeared between the membranes of the myelin sheath.

Fixation with tannic acid allowed good preservation of membraneous structures. This method also made possible observations of neurotubules and neurofilaments. The cytochemical techniques used in this study seem to be useful as regards investigations of the cytoskeletal organization of the neurons.

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО СКЕЛЕТОНА НЕВРОНОВ НЕВРОСЕКРЕЦИОННЫХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

### Резюме

Исследовались нейроны супраоптических и паравентрукулярных ядер гипоталамуса крысы, чтобы познать элементы клеточного скелетона. Применялись два способа фиксации: фиксация в альдегидах с добавлением альциановой лазури и фиксация в альдегидах добавлением танниновой кислоты. Материал фиксированный в танниновой кислоте был добавочно фиксирован в смеси ферроцианида калия и четырехоксида осмия.

Альциановая лазурь обозначила стенки невротубулл и деликатную микрофиламентарную сеточку внутри нейронов. Хорошо был определен мелковолоконцевый материал прилегающий к синаптическим мембранам.

Метод фиксации с танниновой кислотой хорошо выявил мембранные структуры. Способ этот позволил также на наблюдения микротубул и микрофиламентарной сеточки внутри нейронов.

Употребленные в этих исследованиях цитохимические методы кажутся пригодными в исследованиях клеточного скелетона нейронов.

### PIŚMIENICTWO

1. Allen R. B., Weiss D. G.: The role microtubules in axonal transport. *J. Cell Biol.*, 1985, 101, 251a.
2. Autori F., Svenson H., Dallner G.: Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. I. Presence of glycoproteins in microsomes and cytosol. *J. Cell Biol.*, 1975, 67, 687–699.
3. Autori F., Svenson H., Dallner G.: Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. III. Release of glycoprotein from the Golgi-fraction and their transfer to microsomal membranes. *J. Cell. Biol.*, 1975, 67, 715–724.
4. Bretscher A., Weber K.: Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J. Cell Biol.*, 1980, 86, 335–340.
5. Burton P. R., Fernandez H. L.: Delineation by lanthanum staining of filamentous elements associated with the surfaces of axonal microtubules. *J. Cell Sci.*, 1973, 12, 567–583.
6. Castejon H. V., Castejon O. J., Vilorio M. E.: Application of alcian blue in the electron microscopic study of mouse and human cerebral cortex nerve cells. *Acta Histochem.*, 1976, 56, 285–300.
7. Dolapchieva S., Ovtsharoff W., Tchev K.: Localization of ruthenium red positive material in rabbit peripheral nerves. *Acta Histochem.*, 1986, 78, 19–30.
8. Fernandez H., Burton P., Samson F.: Axoplasmic transport in the crayfish nerve cord. *J. Cell Biol.*, 1971, 51, 176–192.
9. Futaesaku Y., Mizuhira V., Nakamura H.: The new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observations of biological specimens. *Proc. Int. Congr. Histochem. Cytochem. Kyoto*, 1972, 155–156.

10. Goldfischer S., Kress Y., Coltoff-Schiller B., Berman J.: Primary fixation in osmium-potassium ferrocyanide: the staining of glycogen, glycoproteins, elastin, and intranuclear reticular structure and intercisternal trabeculae. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, 29, 1105–1111.
11. Gray E. G., Westrum L. E., Burgoyne R. D., Barron J.: Synaptic organization and neuron microtubule distribution. *Cell. Tissue Res.*, 1982, 226, 579–588.
12. Groniowski J.: Ultrastrukturalne elementy ładu wewnątrzkomórkowego. *Patol. Pol.*, 1981, XXXII, 449–460.
13. Hay E. D.: *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press, New York, 1983.
14. Hinkley E. R.: Axonal microtubules and associated filaments stained by alcian blue. *J. Cell Sci.*, 1973, 13, 753–761.
15. Hirokawa N.: Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.*, 1982, 94, 129–142.
16. Hirokawa N.: Quick-freeze deep-etch replica observations of the cytoskeleton. *Proc. XIth Int. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, 1986, 1901–1904*.
17. Hopwood D.: Cell and tissue fixation, 1972–1982. *Histochem. J.*, 1985, 17, 389–442.
18. Houser J. E., Kirschner M. W.: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.*, 1980, 86, 212–234.
19. Jockusch H., Jockusch B. M.: Structural proteins in the growth cone of cultured spinal cord neurons. *Exp. Cell Res.*, 1981, 131, 345–352.
20. King S. M., Hyams J. S.: The ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae*: an improved fixation schedule. *J. Microsc.*, 1982, 13, 415–418.
21. Martin S. S., Bosmann H. B.: Glycoprotein nature of mitochondrial structure protein and neutral sugar content mitochondrial proteins and structural proteins. *Exp. Cell Res.*, 1971, 66, 59–64.
22. McDonald K.: Filaments and membranes in the mitotic apparatus. *Proc. 41st Annual Meeting Electron Microscopy Society of America, San Francisco, 1983, 544–547*.
23. McDonald K.: Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. *J. Ultrastruct. Res.*, 1984, 86, 107–118.
24. Mesland D. A. M., Spicle H.: Plasma membrane-associated filament systems in cultured cells visualized by drycleaving. *J. Cell Sci.*, 1983, 64, 351–364.
25. Matuzals J., Lasek R. J., Hodge A. J.: Stereo electron microscopy of the neurofilamentous network prepared by a sandwich technique. *Eur. J. Cell Biol.*, 1980, 22, 380.
25. Mizuhira V., Eutaesaku Y.: New fixation for biological membranes using tannic acids. *Acta Histochem. Cytochem.*, 1972, 5, 233–236.
27. Schofield B. H., Williams B. R., Doty S. B.: Alcian blue staining of cartilage for electron microscopy. Application of the critical electrolyte concentration principle. *Histochem. J.*, 1975, 7, 139–149.
28. Tani E., Ametani T.: Substructure of microtubules in brain nerve cells as revealed by ruthenium red. *J. Cell Biol.*, 1970, 46, 159–163.
29. Walski M., Olszewska K.: Differentiation of the nephron cell membranes using a complex fixation with tannic acid. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1981, 19, 88–89.
30. Weber K., Rathke P. C., Obsorn M.: Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1978, 75, 1820–1824.
31. Wolosewick J. J., Porter K. R.: Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line. WI-38. *Am. J. Anat.*, 1976, 147, 303–324.
32. Wolosewick J. J., Porter N. R.: Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *J. Cell Biol.*, 1979, 82, 114–139.

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

MARIA SKONIECZNA, URSZULA DORSZ-DROŹDŹ, MAŁGORZATA SIWICKA,  
WŁODZIMIERZ BICZ

## OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND ACTIVITY OF SOME CHOSEN OXIDOREDUCTASES OF MITOCHONDRIA OF RAT BRAIN SUBJECTED TO SEVERE ENVIRONMENTAL HYPERTHERMIA\*

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, School of Medicine, Warszawa

Exposure to elevated environmental temperature produces in the animal organism a number of complex interrelated changes, among which a shift in mitochondrial metabolism plays an important role. To date a number of papers have been published demonstrating that hyperthermia modifies the activity of the respiratory chain of liver mitochondria (Cassuto, Chaffee 1966; Roberts, Chaffee 1976; Swaroop, Ramasarma 1982; Skonieczna et al. 1986a), the kidney (Puranam et al. 1984), heart (Bedrak, Samoiloff 1967), the small intestine mucosa (Musaev et al. 1981) and skeletal muscle (Brooks et al. 1971).

The molecular mechanism of the metabolic changes arising in the brain under the influence of elevated environmental temperature is relatively little known. The results of studies devoted to this problem are controversial (Goldberg et al. 1966; Carlsson et al. 1976). In view of this, investigations were undertaken of the functional state of brain mitochondria. It was found in earlier research that under conditions of moderate hyperthermia changes occur in the activity of respiratory enzymes in the brain mitochondria (Skonieczna et al. 1987). The present study was undertaken to investigate the influence of acute environmental hyperthermia on the activity of respiratory chain enzymes, respiration and oxidative phosphorylation processes in brain mitochondria.

### MATERIAL AND METHODS

Adult male albino rats (200–230 g body weight) were used. They were fed a standard diet and received water *ad libitum*. The animals were adapted before the experiments to laboratory conditions for 5–6 days. During the experi-

---

\* This work was supported by Grant No. 06-02.II.3.6 from the Polish Academy of Sciences

ments the rats were kept in a chamber with forced air flow, humidity within  $30 \pm 10$  per cent and regulated temperature. The control temperature was  $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . The animals were exposed 6 h daily for three successive days to the experimental temperature of  $41 \pm 1^\circ\text{C}$ . For three days before introducing the animals into the warm chamber their temperature was measured twice daily in the rectum with a mercury baguette thermometer. Rectal temperature was also measured immediately before placing the animals in the chamber and after exposure. On the next day, 18 h after the end of exposure to heat the animals were decapitated and the brain hemispheres were prepared out for removing the mitochondrial fraction which was isolated according to the method of Clarck and Niclas (1970). The mitochondria were suspended in a medium of the following composition: 0.25 M sucrose, 10 mM Tris, 0.5 mM  $\text{K}^+$ EDTA, pH 7.4. The mitochondrial suspension (10 mg/ml) was subjected to ultrasonification for 2 min with 30 s interruption and 30 s intervals in a MSE tissue disintegrator of 9 kHz frequency and 16 amplitude. The sediment obtained after 10 min centrifugation at  $8500 \times g$  was discarded and the supernatant containing submitochondrial particles was stored on ice for enzyme determinations.

#### Enzymatic assays

The activities of NADH:cytochrome c reductase and succinate:cytochrome c reductase were determined as described by Sottocasa (1967). Cytochrome oxidase activity was measured according to the method of Smith (1954), succinate dehydrogenase by the method of King (1963), NADH dehydrogenase by the method of King (1967).

Adenosine-triphosphatase assay. The reaction medium in a final volume of 1 ml contained: 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM NaCl, 20 mM KCl, 160 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12.5 mM sucrose and 1 mM ouabain. A 0.1-ml sample of the mitochondrial fraction (100–150  $\mu\text{g}$  protein) was added to the reaction medium and preincubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ . The reaction was started by addition of ATP to a final concentration of 3 mM. After 20 min the reaction was stopped by addition of 4 ml of cool mixture of 1% Lubrol and 1% ammonium molybdate in 1.8 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Atkinson et al. 1973). The yellow colour which developed was read at 390 nm. Latent ATP-ase activity was determined in the presence of 1 mM 2,4-dinitrophenol (Hosie 1965).

Oxygen uptake measurement. Oxygen uptake was determined at  $29^\circ\text{C}$  by the polarographic method with the use of an oxygen electrode of Clark type coupled with a OH-120 Radelkis polarograph. The measurements were performed in a thermostated vessel of 1  $\text{cm}^3$  volume with constant stirring. The medium for oxygen consumption measurement contained: 300 mM mannitol, 10 mM KCl, 0.2 mM  $\text{K}^+$ EDTA, 10 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.4, 1 mg bovine serum albumin and about 2–3 mg mitochondrial protein.

Respiration in state 4 was induced by addition of 4 mM potassium

succinate or 10 mM potassium glutamate and 5 mM potassium L-malate. The state of active respiration (state 3) was evoked by adding to the reaction mixture 300 nmoles ADP. The phosphorylation index ADP/O and respiratory control ration were calculated according to the method of Estabrook (1967).

## RESULTS

The results of body temperature measurement in the animals during three days before exposure to heat and on the successive days of thermic treatment are shown in Figure 1. It results from these data that the mean morning and afternoon temperature in the tested group of animals before exposure to heat was 37.4°C. The heat treatment was applied between 9<sup>00</sup> a.m. and 3<sup>00</sup> p.m. (6 h) for three successive days. The results indicate that exposure to a temperature of 41°C causes a rise of the rat body temperature after the first day of exposure by 2.5°C. After further exposures the body temperature of the animals was

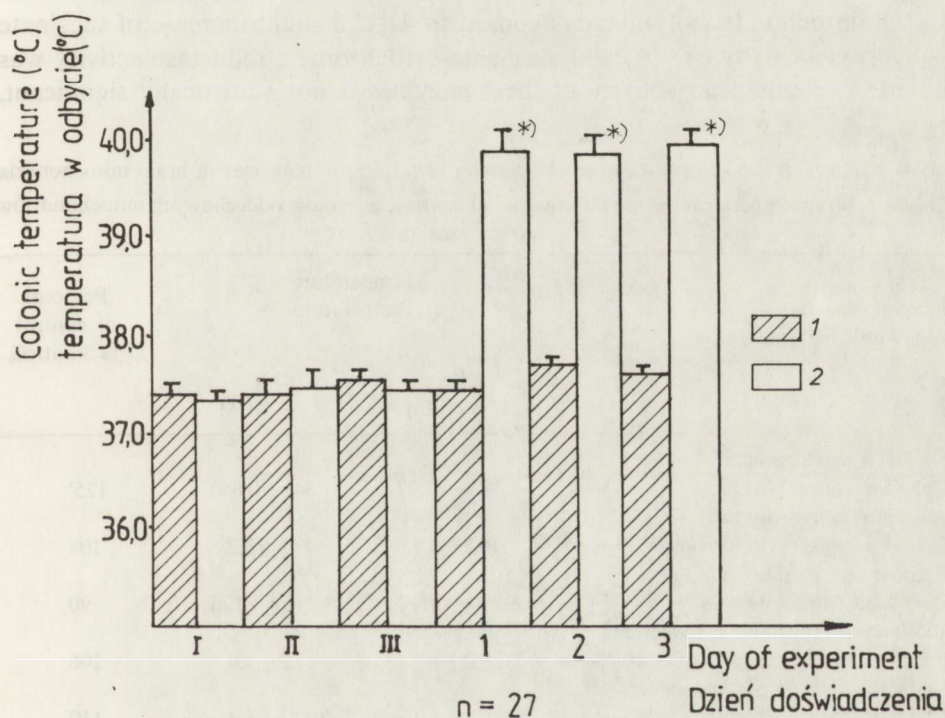


Fig. 1. Body temperature of rats before and after the exposure to an ambient temperature of 41°C. Values are arithmetic means  $\pm$  SEM from 27 rats. I—III days before exposure to heat, 1—3 days heat exposure. 1 — colonic temperature of animals at 9<sup>00</sup> a. m., 2 — colonic temperature of animals at 3<sup>00</sup> p.m. \* $p \leq 0.001$

Ryc. 1. Temperatura ciała szczurów przed i po ekspozycji na temperaturę środowiska 41°C. Wartości są średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM dla 27 szczurów. I—III dni przed nagrzewaniem, 1—3 dni nagrzewania, 1 — temperatura w odbycie o godz. 9<sup>00</sup>, 2 — temperatura w odbycie o godz. 15<sup>00</sup>. \* $p \leq 0.001$

elevated. Mean body temperature after the second exposure was 39.9°C in the tested group, and after the third one 40°C. Each time after the test the animals were transferred to laboratory conditions (19–22°C). Measurements before the next exposure proved that while the animals remained in the laboratory, their body temperature returned to normal.

The rats were sacrificed by decapitation 18 h after the end of the last exposure to heat. The submitochondrial fraction of the brain was isolated and the activity of respiratory enzymes localized inside the mitochondrial membrane was determined. The results are shown in Table 1.

It results from these data that exposure of the animals to heat enhanced NADH dehydrogenase activity by about 25 per cent. Statistical analysis demonstrated that the differences are statistically significant at  $p \leq 0.02$  in relation to the control (exposure temperature 21°C). Parallely with the increase in NADH dehydrogenase activity, that of the enzymatic system NADH-cytochrome c reductase increased by about 10 per cent. Statistical analysis indicated, however, that the differences are not statistically significant. In the mitochondria of animals exposed to 41°C a slight increase of succinate dehydrogenase (by ca 8%) and succinate-cytochrome c reductase activity was noted. The enhanced activity of these enzymes is not statistically significant,

Table 1. Effect of exposure to heat on the activity of respiratory enzymes in brain mitochondria  
Tabela 1. Wpływ hipertermii środowiskowej na aktywność enzymów oddechowych mitochondriów mózgu szczura

Enzyme activity Aktywność enzymatyczna	Temperature Temperatura		Per cent of control % kontroli
	21°C	41°C	
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
NADH dehydrogenase <sup>a/</sup> Dehydrogenaza NADH	1.473 ± 0.037	1.841 ± 0.050	125 <sup>x/</sup>
Succinate dehydrogenase <sup>b/</sup> Dehydrogenaza bursztynianowa	44.2 ± 2.7	47.6 ± 3.2	108
Cytochrome oxidase <sup>a/</sup> Oksydaza cytochromowa	1.350 ± 0.110	1.215 ± 1.126	90
Succinate:cytochrome c reductase <sup>b/</sup> Bursztynian-cytochrom c reduktaza	29.2 ± 1.4	31.2 ± 1.6	106
NADH-cytochrome c reductase <sup>b/</sup> NADH-cytochrom c reduktaza	96.7 ± 4.9	107.3 ± 6.3	110

Values are means ± SEM for six experiments  
Wartości są średnimi ± SEM z 6 doświadczeń

<sup>a/</sup> Results are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein  
Wyniki wyrażono w  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  białka

<sup>b/</sup> Results are expressed as  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein  
Wyniki wyrażono w  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  białka

<sup>x/</sup>  $p \leq 0.02$

however. On the other hand, exposure to heat depresses in the animals cytochrome oxidase activity, but the differences are not statistically significant.

Measurement of the activity of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase, the key enzyme participating in the process of ATP synthesis, are shown in Figure 2. These data indicate that, under the conditions of environmental hyperthermia applied ( $41^{\circ}C$ ), a statistically significant increase in the activity of this enzyme by about 20 percent occurs. The enzyme in the control group show, in the presence of 2,4-dinitrophenol (DNP) an about twofold activity increase. Exposure of the animals to heat produces a change in the susceptibility of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase to the activating action of DNP. In the presence of the latter  $Mg^{2+}$ -ATP-ase activity in the heat-treated animal mitochondria increases much less (ca 10%).

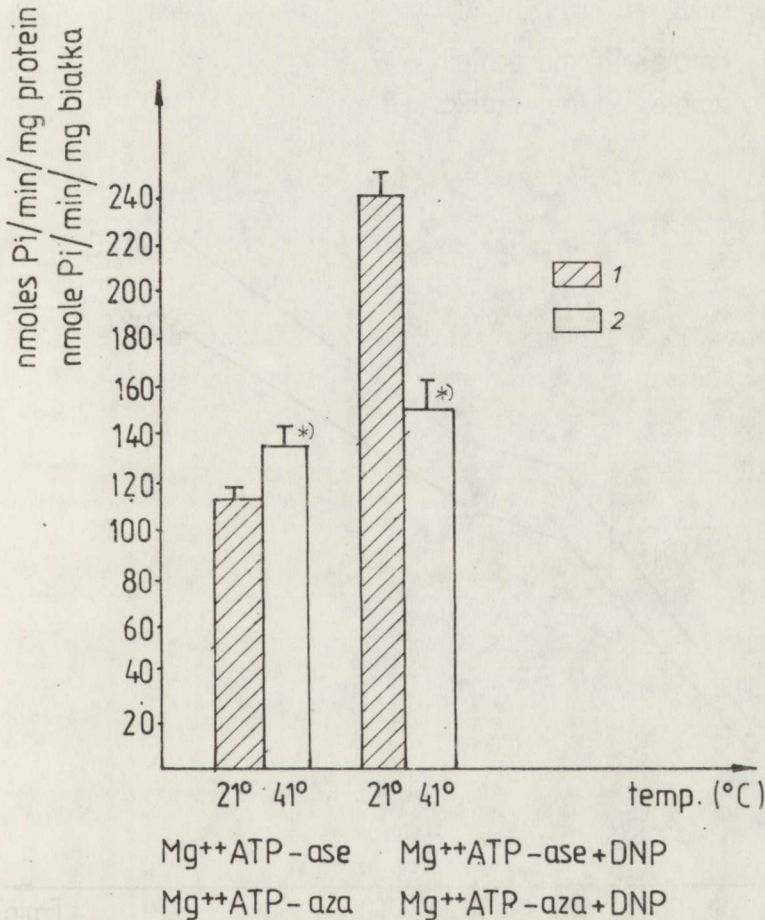


Fig. 2. Activity of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase in brain mitochondria of rats exposed to high ambient temperature. Values are arithmetic means  $\pm$  SEM from 6 rats. \*) $p \leq 0.02$

Ryc. 2. Aktywność  $Mg^{2+}$ -ATP-azy mitochondriów mózgu szczurów poddanych działaniu wysokiej temperatury środowiska. Wartości są średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. \*) $p \leq 0.02$



The kinetic studies of ATP hydrolysis by  $Mg^{2+}$ -ATP-ase during 1–60 min are presented in Figure 3. The results of these experiments show that the curves representing this process catalysed by the enzyme in the control and the tested groups have a very similar course – both are triphasic. In the time interval of 1–15 min the quantity of inorganic phosphate released by the enzyme in the control group and in the tested one is very similar, without statistically significant differences. When the incubation period is prolonged, a statistically significant increase in the amount of phosphate released by the enzyme of the animals exposed to heat occurs as compared with that in the control group. In the course of further experiments the process of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase inhibition by chlorpromazine (CPZ) – a known inhibitor of this enzyme (Akera, Brody 1972) – was studied.

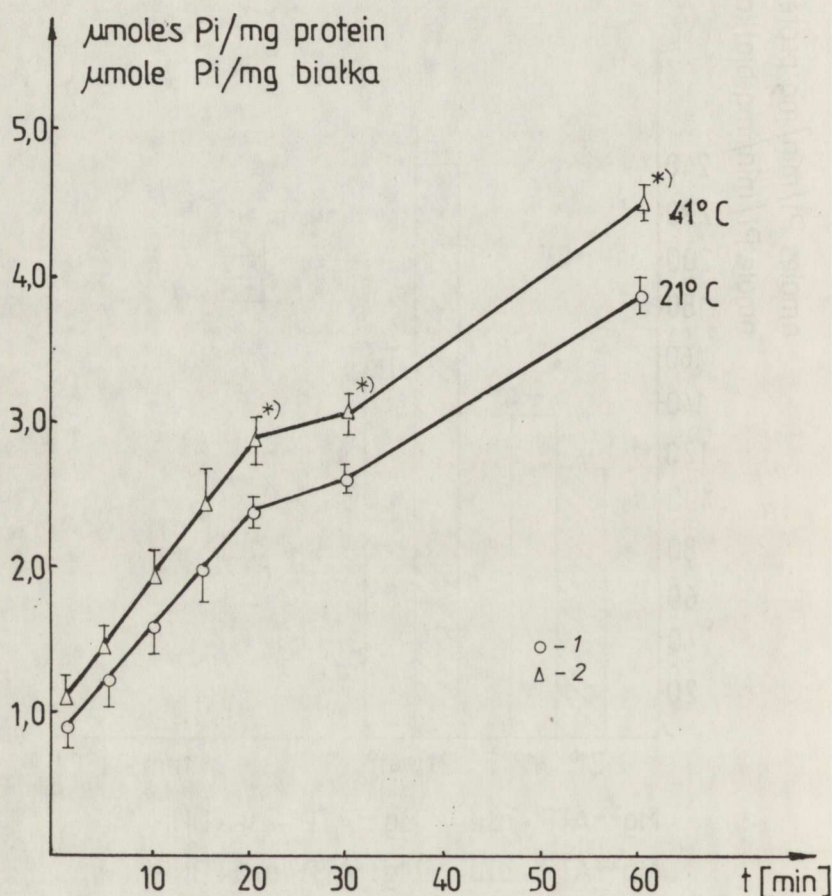


Fig. 3. Hydrolysis of ATP by  $Mg^{2+}$ -ATP-ase as a function of time. Each point represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*)  $p \leq 0.02$ , 1 – control group, 2 – rats exposed to  $41 \pm 1^\circ C$   
 Ryc. 3. Hydroliza ATP przez  $Mg^{2+}$ -ATP-azę jako funkcja czasu. Każdy punkt jest średnią  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. 1 – grupa kontrolna, 2 – grupa nagrzewana w temperaturze  $41 \pm 1^\circ C$ .

\*)  $p \leq 0.02$

Analysis of the inhibition curves (Fig. 4.) indicates that, in the presence of chlorpromazine in a  $2.5 \times 10^{-5}$  M to  $1 \times 10^{-4}$  M concentration, no statistically significant differences appear in the degree of inhibition of the enzyme in the control and the experimental group, whereas CPZ in a  $2.5 \times 10^{-4}$  M concentration caused a 70 per cent inhibition of enzyme activity in the control group and a much weaker, by about 40 per cent, depression of enzyme activity occurs in animals subjected to thermic treatment. After an increase of CPZ concentration in the incubation medium the degree of inhibition of enzyme activity in both groups of animals increases, reaching at concentration of  $1 \times 10^{-3}$  M 90 per cent in the control group and 65 per cent in the test group. The  $I_{50}$  value was found to be for the enzyme of the control group  $1.75 \times 10^{-4}$  M and for the enzyme of the thermically treated animals it is higher amounting to  $4 \times 10^{-4}$  M. The functional state of brain mitochondria of animals after subjection to thermic treatment was evaluated on the basis of polarographic measurement of oxygen uptake (results are shown in Tab. 2). These data indicate that exposure of the animals to heat causes an about 13 per cent increase of mitochondrial activity in respiration state 4 in the presence of succinate and a slight decrease of the oxygen uptake rate in respiration state 3. Statistical analysis demonstrated, however, that these differences are not statistically significant. The parametres of oxidative phosphorylation (ADP/O and RCR) in mitochondria of control and of tested animals are very close and do not show statistically significant differences.

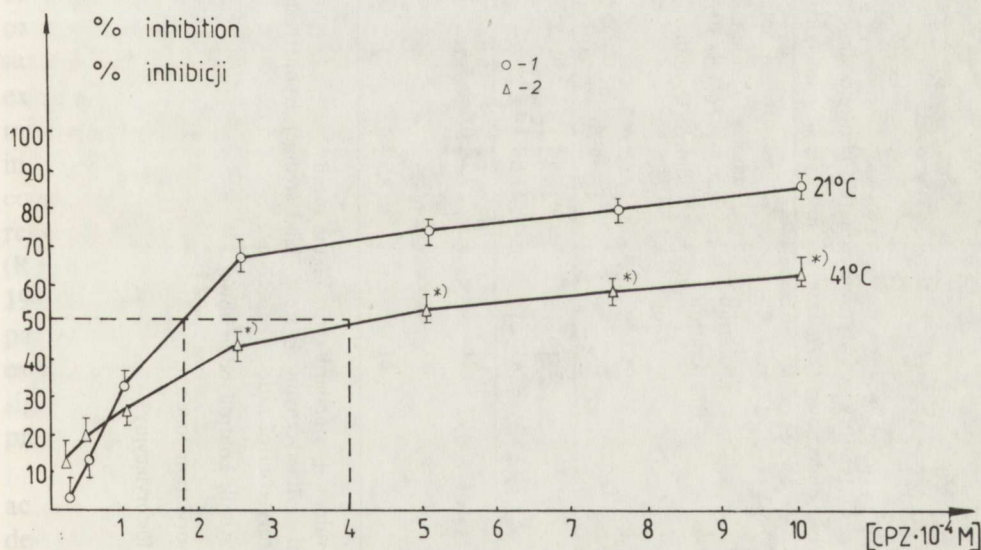


Fig. 4. Percent of inhibition of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase as a function of chlorpromazine concentration. Each point represents mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. 1 – control group, 2 – rats exposed to  $41 \pm 1^\circ C$ . \*)  $p \leq 0.02$

Ryc. 4. Procent inhibicji  $Mg^{2+}$ -ATP-azy jako funkcja stężenia chloropromazyny. Każdy punkt jest średnią  $\pm$  SEM z 6 doświadczeń. 1 – grupa kontrolna, 2 – szczury nagrzewane w temperaturze  $41 \pm 1^\circ C$ . \*)  $p \leq 0,02$

Table 2. Respiratory activity and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria after exposure to high temperature

Tabela 2. Aktywność oddechowa i oksydacyjna fosforylacja mitochondriów mózgu szczura poddanego działaniu wysokiej temperatury otoczenia

Substrate Substrat	Temperature Temperatura (°C)	Oxygen uptake nmoles O <sub>2</sub> /min/mg protein Zużycie tlenu nmole O <sub>2</sub> /min/mg białka		ADP/O	RCR	Number of animals Liczba zwierząt
		state 4 stan 4	state 3 stan 3			
Succinate	21	10.2±1.2	44.5±3.1	1.90±0.12	4.8±0.4	10
Bursztynian	41	11.6±1.4	43.8±2.7	1.82±0.11	4.5±0.3	10
Glutamate + malate	21	9.2±0.6	36.8±2.3	2.75±0.10	4.9±0.5	8
Glutaminian + jabłczan	41	8.7±0.5	34.5±2.7	2.66±0.13	4.7±0.6	10

Results are mean values ± standard error of the mean.

Wyniki są średnimi arytmetycznymi ± średni błąd średniej arytmetycznej.

respiratory control ratio

RCR

– współczynnik kontroli oddechowej

phosphorylation index

ADP/O

– iloraz fosforylacyjny

## DISCUSSION

High environmental temperature is a stress factor to which the organism responds by a number of metabolic changes (Karlyev 1985). Under conditions of acute environmental hyperthermia there occurs an insufficiency of the thermoregulative mechanisms, owing to the disturbed heat exchanges with the environment, this causing a rise of body temperature above normal.

The experimental model applied by us consisted in a threefold subjection of the animals for six hours to elevated environmental temperature of  $41 \pm 1^\circ\text{C}$ . This temperature is the lower limit of intensive hyperthermia. Survival of the rats under the conditions applied was 85 per cent. The results of our investigations demonstrated that exposure of the animals to  $41^\circ\text{C}$  breaks down the thermoregulation mechanism as manifested by the appearance of fever. The body temperature rise was rather pronounced amounting on the successive days of exposure to  $2.5^\circ$ ,  $2.5^\circ$  and  $2.4^\circ\text{C}$ . These data agree with the results of other authors (Carlsson et al. 1976; Rakhimov, Almatov 1977).

The results of earlier studies indicate that exposure of animals to heat produces changes in oxidation processes in the mitochondria of various organs. The intensity of these changes depends of the kind of tissue, the environmental temperature and the time of exposure. Short action of elevated temperature ( $41^\circ\text{C}$ , 2 h) on the organism depressed the respiratory activity of the mitochondria of skeletal muscles and simultaneously stimulated processes of oxidative phosphorylation (Karlyev 1985), whereas in the liver the substrate oxidation rate did not change (Rakhimov, Almatov 1977; Swaroop, Ramasarma 1982). The investigations of Musaev et al. (1981) indicate that, during exposure of animals to heat, the changes are most pronounced in the mitochondria of the small intestine mucosa. The oxygen uptake rate increases in respiration states 3 and 4, and the phosphorylation index and respiration control decrease. When the elevated environmental temperature is applied repeatedly ( $38^\circ$  and  $41^\circ\text{C}$ ) the oxidation rate decrease in the liver mitochondria (Rakhimov, Almatov 1977; Swaroop, Ramasarma 1982; Skonieczna et al. 1986a) and in the kidneys (Puranam et al. 1984), the oxidative phosphorylation parameters remaining unchanged. The results of the present paper indicate that exposure of animals to a temperature of  $41^\circ\text{C}$  for three days does not cause significant changes in the respiratory activity and oxidative phosphorylation processes in the brain mitochondria.

Under conditions of environmental hyperthermia changes occur in the activity of the mitochondrial respiratory enzymes. Depression of succinate dehydrogenase activity in the liver mitochondria was observed even after a short exposure to excessive heat (Swaroop, Ramasarma 1982; Skonieczna et al. 1986b). Thermic stress produces a decrease in succinate oxidase and cytochrome oxidase activity in the heart and skeletal muscle mitochondria (Bedrak, Samoiloff 1967). We have demonstrated in our earlier investigations that exposure of animals to moderate environmental hyperthermia enhances

NADH dehydrogenase and NADH-cytochrome c reductase activity and depresses succinate dehydrogenase and succinate-cytochrome c reductase activity in the brain mitochondria (Skonieczna et al. 1987). The here presented results indicate that application of a higher temperature, up to 41°C, to the animals does not enhance the observed modifications in the respiratory enzymes. In the brain mitochondria of animals subjected to acute environmental hyperthermia only an increase of NADH dehydrogenase activity was noted. The question arises, why do, under the influence of hyperthermia, after a short time changes arise in the respiratory processes in the mitochondria of skeletal muscles and the small intestine mucosa, and after prolonged exposure, in the liver and kidney mitochondria, whereas no such modifications are found in the brain. It would seem that this question may at least partly be explained by the changes in blood circulation observed under conditions of environmental hyperthermia and consisting in an increased surface blood flow and its diminution in the internal organs (liver, kidneys), this leading to anoxia in these tissue. The studies of Carlsson et al. (1976) showed, on the other hand, that changes do not occur in blood flow in the brain when the body temperature of the animals rises to 41°C, and when it reaches 41°C the blood flow through the brain even increases with simultaneous enhanced lung ventilation. Owing to these mechanisms set in operation the brain temperature in animals exposed to heat is lower than in the remaining parts of the body. The data quoted here may explain the fact that, even under conditions of severe hyperthermia no changes are noted in the functional state of the brain mitochondria.

It should, however, be taken into account that, in spite of the lack of changes in the mitochondrial respiratory parameters, environmental hyperthermia may cause structural disturbances in the mitochondrial membranes. Rakhimov (1977) demonstrated that even short lasting elevated environmental temperature reduces the thermostability of liver mitochondria and increases their susceptibility to the lytic action of phospholipase D and trypsin. Musaev et al. (1981) also found some latent impairments in the mitochondrial membranes of the small intestine mucosa of animals exposed to elevated temperature. The liver and kidney mitochondria of the animals subjected to moderate environmental hyperthermia also exhibit a loosened structure of the mitochondrial membranes. As consequence of this the cytochrome c content decreases (Swaroop, Ramasarma 1982; Puranam et al. 1984). Structural disorders in the mitochondrial membranes observed under varying thermic conditions arise as the result of changes in the membrane phospholipid content (Raison 1973; Demediuk, Moscatelli 1983).

The results of Szepelev's investigations (1976) proved that, under conditions of severe environmental hyperthermia the degree of unsaturation of brain lipids is diminished because of the decrease of arachidonic acid content and increase of palmitic and stearic acids content. The changes observed by us and other authors (Brooks et al. 1971; Suchocka, unpublished data) in  $Mg^{2+}$ -ATP-ase activity in the mitochondria of animals exposed to heat may result from structural changes in the mitochondrial membranes. The latter enzyme is

lipid-dependent and its activity is regulated by the membrane lipids. It was found, under *in vitro* conditions that structural changes are induced in  $Mg^{2+}$ -ATP-ase by temperature (Parenti Castelli et al. 1983). Studies of the kinetics of the ATP hydrolysis reaction and kinetic investigations of the process of this enzyme inhibition by chlorpromazine point to structural changes in the enzyme arising as the result of exposure of the animals to heat. The enzyme of animals subjected to severe environmental hyperthermia is less sensitive to the action of the inhibitor ( $I_{50}$  value more than two times higher). We believe that modification of  $Mg^{2+}$ -ATP-ase activity under varying temperature conditions of the environment may be an indicator of structural changes in the inner mitochondrial membrane. Our suggestions agree with the conclusion of Gwóźdź et al. (1978) who demonstrated destructive changes in the brain mitochondria, increasing in intensity with the rise of the body temperature of the animals.

OKSYDACYJNA FOSFORYLACJA I AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH OKSYDOREDUKTAZ  
MITOCHONDRIÓW MÓZGU SZCZURA PODDANEGO DZIAŁANIU OSTREJ  
HIPERTERMII ŚRODOWISKOWEJ

Streszczenie

Przeprowadzono badania procesu oksydacyjnej fosforylacji, aktywności enzymów łańcucha oddechowego oraz  $Mg^{2+}$ -ATP-azy mitochondriów mózgu szczurów, które przez kolejne 3 dni nagrzewano 6 godzin w temperaturze  $41 \pm 1^\circ C$ .

Aktywność enzymów oddechowych oznaczano we frakcji cząstek submitochondrialnych. Iloraz fosforylacyjny ADP/O i współczynnik kontroli oddechowej wyznaczano metodą polarygraficzną, przy użyciu elektrody tlenowej Clarka.

Stwierdzono, że nagrzewanie zwierząt powoduje znamienny statystycznie wzrost aktywności dehydrogenazy NADH (ok. 25%) i  $Mg^{2+}$ -ATP-azy (ok. 20%), natomiast aktywności NADH-cytochrom c reduktazy, dehydrogenazy bursztynianowej, bursztynian-cytochrom c reduktazy i oksydazy cytochromowej ulegają nieznacznym zmianom, ale różnice te są nieznamiennie statystycznie.

Badania kinetyki reakcji hydrolizy ATP oraz procesu inhibicji przez chlorpromazynę wykazały, że w wyniku nagrzewania zwierząt dochodzi do zmian strukturalnych  $Mg^{2+}$ -ATP-azy mitochondriów mózgu. Pomimo występujących zmian  $Mg^{2+}$ -ATP-azy w badanych warunkach hipertermii środowiskowej nie następuje zaburzenie procesów oksydacyjnej fosforylacji. Wartości ADP/O i RCR mitochondriów mózgu zwierząt nagrzewanych ulegają nieznacznemu obniżeniu, ale różnice te są nieznamiennie statystycznie w stosunku do kontroli (zwierzęta przebywające w temp.  $21^\circ C$ ).

ОКСИДАТИВНАЯ ФОСФОРИЛЯЦИЯ И АКТИВНОСТЬ ИЗБРАННЫХ  
ОКСИДОРЕДУКТАЗ МОЗГОВЫХ МИТОХОНДРЕВ КРЫСЫ ПОДВЕРГНУТОЙ  
ДЕЙСТВИЮ ОСТРОЙ ТИПЕРТЕРМИИ СРЕДЫ

Резюме

Исследовались процесс оксидативной фосфорилиции, активности энзимов дыхательной цепи и  $Mg^{2+}$ -АТФ-азы митохондрий мозга крыс, подвергаемых в течение 3 очередных дней 6-ти часовому нагреванию в температуре  $41 \pm 1^\circ C$ .

Активность дыхательных энзимов обозначалась в субмитохондриальной фракции. Частное фосфорилиции ADP/O и коэффициент дыхательного контроля определялись полярографическим методом, употребляя кислородную электроду Clarka.

Обнаружено, что нагревание животных вызывает статистически знаменательное увеличение активности дегидрогеназы NADH (около 25%) и  $Mg^{2+}$ -АТФ-азы (около 20%), вместо того активность NADH-цитохром с редуктазы, янтарной дегидрогеназы, сукцинатоцитохром с редуктазы и цитохромовой оксидазы изменяется незначительно и эти изменения статистически незначительны.

Исследования кинетики реакции гидролиза АТФ и процесса торможения хлорпромазиной показали, что нагревание животных приводит и структуральным изменениям  $Mg^{2+}$ -АТФ-азы митохондрий мозга. Не смотря на изменения  $Mg^{2+}$ -АТФ-азы в исследованных условиях гипертермии среды, нет нарушения процесса оксидативной фосфорилиции. Величина ADP/O и RCR митохондрий мозга нагреваемых животных незначительно понижаются, но это понижение статистически незначительное по сравнению с контрольной группой (животные пребывающие в температуре 21°C).

#### REFERENCES

1. Akera T., Brody T. M.: Effects of chlorpromazine free radical on brain enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 1972, 21, 1403–1411.
2. Atkinson A., Gatenby A. D., Lowe A. G.: The determination of inorganic orthophosphate in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 320, 195–204.
3. Bedrak E., Samoiloff V.: Comparative effects of aldosterone and heat acclimatization on oxidative enzymes in rat tissues. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1967, 45, 717–722.
4. Brooks G., Hittleman K., Faulkner R.: Temperature, skeletal muscle mitochondrial function and oxygen debt. *Amer. J. Physiol.*, 1971, 220, 1053–1059.
5. Carlsson C., Haggerdal M., Siesjo B. K.: The effect of hiperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated aminoacids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001–1006.
6. Cassuto X., Chaffee R. R.: Effect of prolonged heat exposure on the cellular metabolism of the hamster. *Amer. J. Physiol.*, 1966, 210, 423–463.
7. Clark J., Niclas W.: The metabolism of rat brain mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4724–4731.
8. Demediuk P., Moscatelli E. A.: Synaptosomal and brain mitochondrial lipids in hibernating and coldacclimated Golden hamsters. *J. Neurochem.*, 1983, 40, 1100–1105.
9. Estabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP:O ratios. In: *Methods in enzymology*. Eds. R. W. Estabrook, M. E. Pullman, Academic Press, New York, 1967, 10, 41–47.
10. Farias R. N., Bloj B., Morero R. D., Sineriz F., Trucco R. E.: Regulation of allosteric membrane bound enzymes though changes in membrane lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 231–251.
11. Goldberg N., Passonneau J., Lowry O.: Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 1966, 241, 3997–4003.
12. Gwóźdz B., Dyduch A., Grzybek H., Panaz B.: Structural changes in brain mitochondria of mice subjected to hyperthermia. *Exp. Pathol.*, 1978, 15, 124–126.
13. Hosie R. J.: The localization of adenosine triphosphatases in morphologically characterized subcellular fractions of guinea-pig brain. *Biochem. J.*, 1965, 96, 404–412.
14. Karlyjev K. M.: Effect of high environmental temperature on oxygen consumption by the bodies of humans and animals. *Usp. Fizjol. Nauk.*, 1985, 16, 109–121.
15. King T. E.: Reconstitution of respiratory chain enzyme systems. XI. Use of artifical electron acceptors in the assay of succinate dehydrogenatng enzymes. *J. Biol. Chem.* 1963, 238, 4032–4036.

16. King T. E., Howard R. L.: Preparation and properties of soluble NADH dehydrogenase from cardiac muscle. In: *Methods in enzymology*. Eds. S. P. Colowik, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1967, 10, 275–294.
17. Musaev K., Almatov K., Rakhimov M., Akhmedov R.: Effect of hyperthermia on the functions of mitochondria from rat small intestine mucosa. *Vop. Med. Khim.*, 1981, 27, 763–769.
18. Parenti Castelli G., Barocca A., Fato R., Rabbi A.: A temperature dependent structural changes of mitochondrial ATP-ase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 111, 366–372.
19. Puranam R. S., Shivaswamy V., Kurup C. K., Ramasarma T.: Oxidations in kidney mitochondria of heat exposed rats: regulation by cytochrome c. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1984, 16, 421–431.
20. Raison J. K.: The influence of temperature-induced phase changes on the kinetic of respiratory and other membrane associated enzyme systems. *J. Bioenergetics*, 1973, 4, 285–309.
21. Rakhimov M., Almatov K.: Some characteristics of mitochondrial multienzyme systems from rat liver mitochondria after heating of rats. *Biokhimiya*, 1977, 42, 1852–1863.
22. Roberts J. C., Chaffee R. R.: Metabolic and biochemical aspects of heat acclimation in the deer mouse. *Peromyscus maniculatus sonoriensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, 53A, 367–369.
23. Shepelev A.: Effect of acute physical overheating of animals on peroxidation of lipids. *Vop. Med. Khim.*, 1976, 22, 47–51.
24. Skonieczna M., Piech A., Bicz W.: Influence of repeated exposure to elevated environmental temperature on the activity of respiratory enzymes of rat liver mitochondria. *Med. Pracy*, 1986a, 37, 227–235.
25. Skonieczna M., Kruszewska J., Nowak J., Bicz W.: Influence of increased environmental temperature on oxidation processes in rat liver mitochondria. *Acta Physiol. Pol.*, 1986b, 37, 157–167.
26. Skonieczna M., Kruszewska J., Bicz W.: Oxidations in brain mitochondria of rats exposed to heat. *Neuropatol. Pol.*, 1987, 25, 177–185.
27. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 50, 285–298.
28. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A.: An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biological and morphological study. *J. Cell. Biol.*, 1967, 32, 415–448.
29. Swaroop A., Ramasarma T.: Changes in mitochondrial oxidative metabolism under conditions of heat stress. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1982, 19, 382–387.

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



JAN PACHECKA, JERZY PODLEŚNY\*, WIESŁAW GAŹDZIK\*, KATARZYNA ZAREMBA,  
WŁODZIMIERZ BICZ

EFFECT OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON DISTRIBUTION  
OF CARBAMAZEPINE AND ITS MAIN METABOLITE  
10,11-EPOXY-CARBAMAZEPINE IN RAT BRAIN\*\*

Department of Drug Metabolism, School of Medicine, Warszawa and \*Laboratory of Clinical  
Pharmacokinetics, Center of Child Health, Warszawa

Carbamazepine is an iminostilbene derivative with anticonvulsant properties. The drug is widely used for the treatment of convulsive disorders, trigeminal neuralgia and other lightning pains (Suria, Killam 1980). The metabolism of carbamazepine has been extensively studied both in laboratory animals and in man. The main pathway of biotransformation involves formation of carbamazepine-10,11-epoxide, which is similar in activity to the parent drug. The epoxide crosses the blood-brain barrier and may contribute to the total anticonvulsant activity after carbamazepine administration (Frigerio, Morselli 1975; Frigerio et al. 1976). Carbamazepine and its main metabolite are distributed rapidly and quite uniformly to various organs and tissues, with higher concentration in liver, kidney and brain (Morselli et al. 1971; Morselli 1975). In the rat brain concentration of carbamazepine is 1.1 to 1.6 times that in plasma, whereas brain to plasma ratios for the epoxide range from 0.4 to 0.8, suggesting a reduced penetration of the metabolite into the brain after single dosing (Farghali-Hassan et al. 1976). Studies on the regional brain distribution in rats housed at constant room temperature (22°C) have shown that at shorter time higher carbamazepine concentrations may be found in the cortex and thalamus, whereas lower levels may be observed in the cerebellum and lower brain stem. In contrast, the carbamazepine epoxide was found apparently concentrate in the thalamus (Pantarotto et al. 1979). No data

---

\*\*The work was supported by Polish Academy of Sciences. Research Programme CPBP  
06-02.II.3.6.

are available in the current literature on the effects of high ambient temperature on the distribution of carbamazepine and its epoxide in different rat brain areas. In this study, we have examined the distribution of both carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in different brain areas of rats given a single dose of drug and exposed to high environmental temperature.

#### MATERIAL AND METHODS

*Animals.* Male white rats weighing 250–300 g were used for the experiments. Carbamazepine dissolved in oil was administered through a gastric probe in a dose of 50 mg/kg body weight and the rats were exposed to increased temperature. During hyperthermia the rats were housed 3–5 per cage at 28°C or 35°C for 6 h. The relative humidity during exposure to increase temperature was 40–70%. After 6 h of exposure, the rats were killed by decapitation. Blood serum and brain regions (hypothalamus, thalamus, striatum, hippocampus, lower brainstem, cerebellum and cerebral hemispheres) were collected and stored at –21°C until required for analysis.

*Extraction procedure.* To 0.5 ml blood serum or brain tissues (after homogenization of 0.1 g of net weight with 1 ml of distilled water) 12 µl of 5,5-diphenylhydantoin methanol solution (400 µg/ml as internal standard) and 50 µl acetate buffer, pH 4.0 was added. The samples were extracted with 4 ml of methylene chloride. The extractions were carried out for 30 min by shaking at room temperature. After separation by centrifugation the organic phase was transferred to conical glass tubes and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved in 200 µl of mobile phase solution and a 20 µl portion of this was injected for high performance liquid chromatography.

High performance liquid chromatography (HPLC). HPLC was carried out on an apparatus equipped with a 8500 pump Varian, USA, Spectrophotometric detector (Technicol, USA), integrator CDS 111 (Varian, USA) and registrator T-2-4100 (Laboratori Pristroje, CSRS).

The separation of the drug and metabolite was carried out using a system containing precolumn RP-18 SPMERI/10 18-GU (Brownelee Libs, USA), column PARTISIL CGS/C8 5 nm 100 mm × 4.6 mm (Whatman, USA) located in a thermostat (Labora Menheim FCR) at 30°C. The solvent system consisted of methanol:phosphate buffer, pH 4.42 (46:54 v/v), flow rate 80 cm<sup>3</sup>/h, wavelength – 210 nm.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in rat brain regions and serum were determined by high performance liquid chromatography using phenytoin as internal standard.

The results presented in Fig. 1. indicate that carbamazepine as well as carbamazepine-10,11-epoxide penetrate to all tested brain areas of control rats (21°C). The highest concentration of carbamazepine ( $5.5 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$  fresh tissue) was observed in the hippocampus, whereas the lowest ( $1.9 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  fresh tissue) in the cerebral hemispheres. In contrast to the parent drug, the main metabolite carbamazepine-10,11-epoxide was present at highest concentration in the hypothalamus ( $1.6 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$  fresh tissue) and the lowest in the hemispheres ( $0.5 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ ) fresh tissue.

A similar pattern of distribution of carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine in the brain of rats exposed 6 h to 28°C was observed, however, in the case of all anatomical regions tested, an increased level of the drug was observed. The increased level of carbamazepine in the hippocampus was  $6.3 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$  fresh tissue (Fig. 2). The exposure of rats to 35°C caused a significant increase of carbamazepine concentration in the hippocampus to  $9.8 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$  fresh tissue, and in the hemispheres to  $2.8 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  fresh tissue.

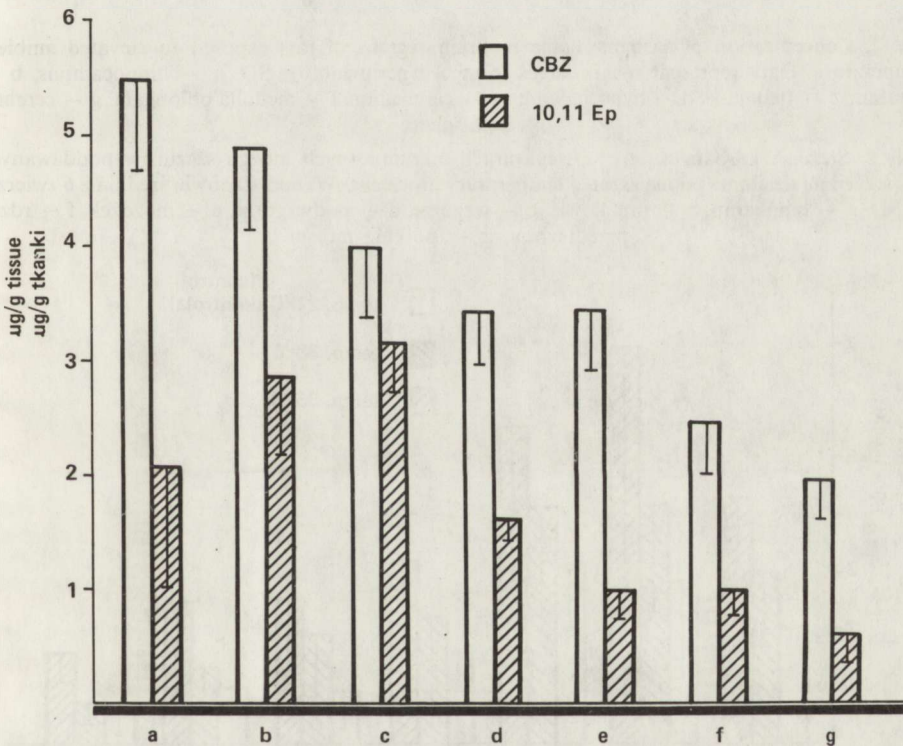


Fig. 1. Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine levels in rat brain regions. Data represent mean values from 6 experiments  $\pm$  SD. a – hippocampus, b – striatum, c – thalamus, d – hypothalamus, e – cerebellum, f – medulla oblongata, g – cerebral hemisphere

Ryc. 1. Poziomy karbamazepiny i 10,11-epoksykarbamazepiny w badanych strukturach mózgu. Wyniki stanowią średnią z 6 zwierząt  $\pm$  SD. a – hipokamp, b – prążkowie, c – wzgórze, d – podwzgórze, e – mózdzek, f – rdzeń przedłużony, g – półkule mózgu

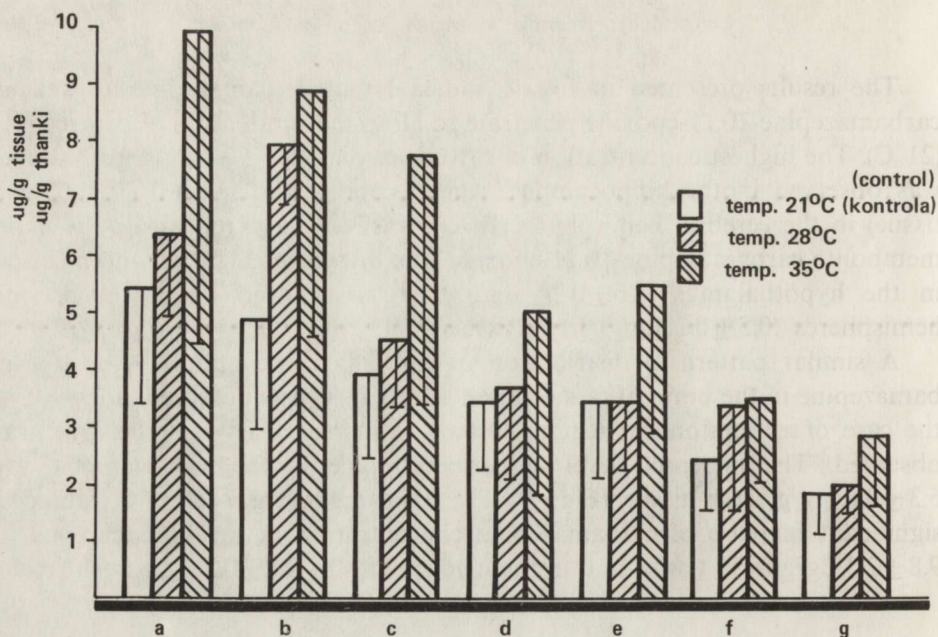


Fig. 2. Concentration of carbamazepine in brain regions of rats exposed to elevated ambient temperature. Data represent mean values from 6 experiments  $\pm$  SD. a – hippocampus, b – striatum, c – thalamus, d – hypothalamus, e – cerebellum, f – medulla oblongata, g – cerebral hemisphere

Ryc. 2. Stężenie karbamazepiny w strukturach anatomicznych mózgu szczurów poddawanych ekspozycji na działanie podwyższonej temperatury otoczenia. Wyniki stanowią średnią z 6 zwierząt  $\pm$  SD. a – hipokamp, b – prążkowie, c – wzgórze, d – podwzgórze, e – mózdzek, f – rdzeń przedłużony, g – półkule mózgu

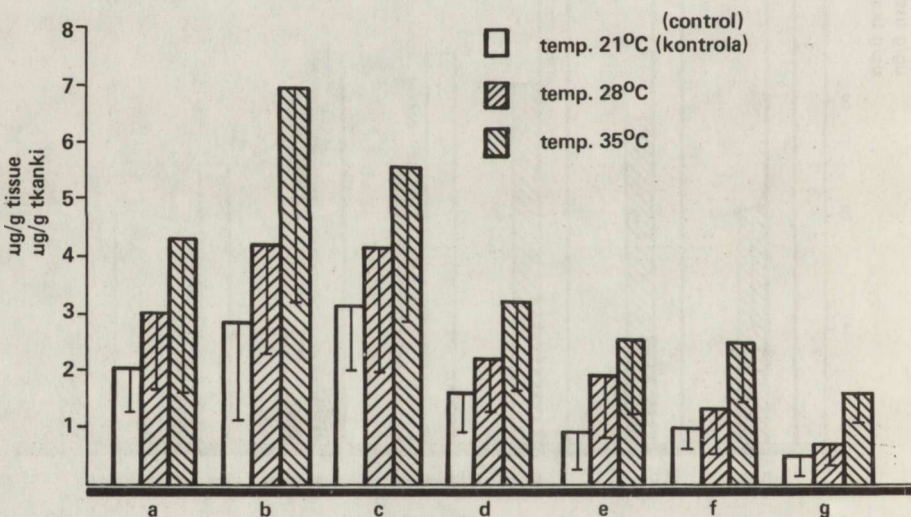


Fig. 3. 10,11-epoxycarbamazepine levels in various rat brain regions after single exposure to high ambient temperature. Data represent mean values from 6 experiments  $\pm$  SD. a – hippocampus, b – striatum, c – thalamus, d – hypothalamus, e – cerebellum, f – medulla oblongata, g – cerebral hemisphere

Ryc. 3. Poziomy 10,11-epoksykarbamazepiny w różnych strukturach anatomicznych mózgu poddawanych ekspozycji na działanie podwyższonej temperatury otoczenia. Wyniki stanowią średnią z 6 zwierząt  $\pm$  SD. a – hipokamp, b – prążkowie, c – wzgórze, d – podwzgórze, e – mózdzek, f – rdzeń przedłużony, g – półkule mózgu

Statistical analysis of these data indicates that these differences are not significant.

Another pattern of distribution was observed in the case of 10,11-epoxy-carbamazepine. The highest concentration of this metabolite was observed in the thalamus ( $3.1 \pm 0.5$   $\mu\text{g/g}$  fresh tissue), the lowest in the hemispheres ( $0.5 \pm 0.2$   $\mu\text{g/g}$  tissue). The exposure of rats to higher ambient temperatures caused an increase of 10,11-epoxycarbamazepine concentration in different brain areas (Fig. 3). The mean level of the parent drug in the thalamus of rats exposed to  $35^\circ\text{C}$  or  $28^\circ\text{C}$  was  $5.5 \pm 1.1$   $\mu\text{g/g}$  tissue or  $4.0 \pm 1.0$   $\mu\text{g/g}$  tissue, respectively. These differences were statistically significant.

The results presented in this paper suggest, that exposure of rats to  $35^\circ\text{C}$  changes the concentration of 10,11-epoxycarbamazepine, but not that of the parent drug, in some areas of rat brain. The mechanism of these changes as well as the clinical significance of these findings are not known.

DOI: 10.1007/s12017-012-9121-1

TRM-0 10.1007/s12017-012-9121-1

#### WPLYW PODWYŻSZONEJ TEMPERATURY OTOCZENIA NA ZAWARTOŚĆ KARBAMAZEPINY I JEJ GŁÓWNEGO METABOLITU 10,11-EPOKSY-KARBAMAZEPINY W MÓZGU SZCZURA

##### Streszczenie

Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej oznaczano stężenie karbamazepiny i jej głównego metabolitu 10,11-epoksykarbamazepiny w 7 strukturach anatomicznych mózgu szczurów, które poddawano jednorazowej 6 godzinnej ekspozycji na działanie temperatury  $28^\circ\text{C}$  i  $35^\circ\text{C}$ .

Stwierdzono, że podwyższona temperatura otoczenia  $35^\circ\text{C}$  powoduje istotny statystycznie wzrost stężenia 10,11-epoksykarbamazepiny w podwzgórzu, półkulach mózgu, prążkowi, mózdzku i rdzeniu przedłużonym.

#### ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ TEMPERATURY СРЕДЫ НА РАЗМЕЩЕНИЕ КАРБАМАЗЕПИНЫ И ЕЕ ГЛАВНОГО МЕТАБОЛИТА 10,11-ЭПОКСИ КАРБАМА- ЗЕПИНЫ В АНАТОМИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ МОЗГА

##### Резюме

Методом высокоисправной ликворной хроматографии обозначалась концентрация карбамазепины и ее главного метаболита, 10,11-эпокси карбамазепины в 7 анатомических структурах мозга крыс, которые были подвергнуты однократной 6-ти часовой экспозиции на температуры  $28^\circ\text{C}$  и  $35^\circ\text{C}$ .

Обнаружено, что повышенная температура среды ( $35^\circ\text{C}$ ) вызывает статистически существенное увеличение концентрации 10,11-эпокси карбамазепины в мозговых полушариях гипоталамусе, стриарных ядрах, мозжечке и продолговатом мозге.

## REFERENCES

1. Farghali-Hassan, Assael B. M., Bossi J., Garattini S., Gerna M., Gomeni R., Morselli P. L.: Carbamazepine pharmacokinetics in young, adult and pregnant rats. Relation to pharmacological effects. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1976, 220, 125–139.
2. Frigerio A., Morselli P. L.: Carbamazepine: Biotransformation. *Advances Neurol. Sci.*, 1975, 11, 295–308.
3. Frigerio A., Cavo-Briones M., Belvedere G.: Formation of stable epoxides in the metabolism of tricyclic drug. *Drug Metab. Rev.*, 1976, 5, 197–218.
4. Morselli P. L., Gerna M., Gerattini S.: Carbamazepine plasma and tissue levels in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 1971, 20, 2043–2047.
5. Morselli P. L.: Carbamazepine: Absorption distribution and excretion. *Advances Neurol. Sci.* 1975, 11, 279–293.
6. Pantarotto C., Grunelli V., Lanzoni J., Frigerio A., Quattrone A.: Quantitative determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in rat brain areas by multiple ion detection mass fragmentography *Ann. Biochem.*, 1979, 93, 115–123.
7. Suria A., Killam E. K.: Antiepileptic drugs: Carbamazepine. In: *Antiepileptic drugs. Mechanism of action*. Eds. G. H. Glaser, J. K. Penry D. M. Woodburg, Raven Press, New York 1980, 563–575.

Authors' address: Dept. of Drug Metabolism, School of Medicine, 1 Banacha Str., 02-097 Warszawa.

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo, Wrocław 1988.  
Nakład: 600 egz. Objętość: ark. wyd. 10,80, ark. druk. 8,75+0,25 wkł.,  
ark. A1 — 12. Papier offset, kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do drukarni  
1988.03.09. Podpisano do druku 1988.08.26. Druk ukończono w paź-  
dzierniku 1988. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3164/88. K-4.  
Cena zł 200,—

**SPIS PRAC ZAMIESZCZONYCH  
W KWARTALNIKU „NEUROLOGIA POLSKA”  
TOM XXV – 1987**

Barcikowska-Litwin Maria, Krajewski Stanisław, Dolińska Ewa, Rafałowska Janina: Lymphocytes within the infarct area in human brain . . . . .	551
Bugera-Piecuch Teresa E., Kosicka Barbara, Kittel Marek, Śmiałek Mieczysław: Synteza GABA w ośrodkowym układzie nerwowym szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu octanem kobaltowym w warunkach niedokrwienia mózgu . . . . .	59
Cruz-Sanchez Felix, Lafuente Jose V., Vogel Hans, Gosztanyi Georg: Morphological changes in the skeletal muscles in a case of Kearns-Sayre syndrome . . . . .	337
Domżał Teofan, Renkawek Krystyna, Zaleska Bożena: A case of Meige's disease. Clinical and morphological study . . . . .	197
Drac Hanna, Rafałowska Janina: Brodawczak złośliwy spłotu naczyńkowego imitujący zespół Guiliain-Barré . . . . .	603
Gajkowska Barbara: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura . . . . .	131
Gajkowska Barbara, Kosicka Barbara, Śmiałek Mieczysław: Zmiany strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym u szczura w wyniku zatrucia chlorkiem man- ganawym (MnCl <sub>2</sub> ) . . . . .	623
Gonczewicz Andrzej: The role of astroglia in pathological processes characterized by myelin disintegration. I. Morphology of astroglia in experimental injury of white matter . . . . .	469
Iwanowski Lech: Badania ultrastruktury włóściczek mózgu królika w okresie około- porodowym . . . . .	163
Kapuściński Andrzej: Mózgowy przepływ krwi w doświadczalnym modelu śmierci kli- nicznej u szczurów . . . . .	287
Kraszpułski Michał, Wrzółkowa Teresa: Blood-brain exchange in various regions of the limbic system, Morphometric studies . . . . .	265
Kroh Halina, Walencik Sławomir, Mossakowski Mieczysław J., Weinrauder Halina: Spontaneous astrocytoma in the Mongolian gerbil ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) . . . . .	329
Kroh Halina: Meningioma with pseudopapillary pattern. Case report . . . . .	615
Kuchna Izabela: Zespół paranowotworowego zapalenia mózgu . . . . .	211
Kunicki Adam: Phenomenon of tumor regression in the central nervous system . . . . .	1
Liberski Paweł P.: The brain fine structure in experimental scrapie. The 263K strain in golden syrian hamsters . . . . .	35
Liberski Paweł P.: The nature of spiroplasma-like inclusions in experimental scrapie . . . . .	53
Loesch Andrzej: Zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego oraz spłotu Auerbach jelita krętego szczura w doświadczalnej cukrzycy insulinozależnej . . . . .	99
Loesch Andrzej: Aksony sekrecyjne przysadki nerwowej szczura po reanimacji w związku z incydemem śmierci klinicznej . . . . .	147
Łazarewicz Jerzy W., Noremborg Krystyna: Pentobarbital a homeostaza wapnia w sy- naptosomach mózgu szczura: wpływ chronicznego dawkowania i stosowania in vitro . . . . .	589
Łukaszuk Irena, Wrzółkowa Teresa: Relation between nerve terminals and components of terminal vessels of the cat amygdaloid body . . . . .	275
Mossakowski Mirosław J., Gadamski Roman: Wpływ prostacykliny PGI <sub>2</sub> i indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie CA <sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich . . . . .	21
Mossakowski Mirosław J., Gadamski Roman: Wpływ blokowania błonowych kanałów	



wejścia wapnia na rozwój niedokrwienne uszkodzeń neuronów sektora CA <sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich . . . . .	539
Mossakowski Mirosław J., Renkawek Krystyna: Amyotrophic lateral sclerosis with generalized neuroaxonal degeneration and selective involvement of the nigro-pallidal system . . . . .	639
Müller W., Reifferscheidt I., Firsching R.: Oncocytic transformation in choroid plexus papilloma. Lightmicroscopic study of two cases . . . . .	205
Nowacki Przemysław: Pochodzenie i lokalizacji komórek białaczkowych w ośrodkowym układzie nerwowym w białaczkach nielifoblastycznych u dorosłych . . . . .	7
Nowacki Przemysław, Honczarenko Krystyna, Szecherew Grażyna: Przypadek przewlekłego zapalenia wielokorzeniowo-nerwowego o szczególnie ciężkim przebiegu klinicznym i rozległych zmianach neuropatologicznych . . . . .	93
Nowacki Przemysław: W sprawie mechanizmu powstawania rozległych nacieków białaczkowych w mózgowiu . . . . .	219
Nowacki Przemysław: Udział komórek białaczkowych w powstawaniu krwotoków do ośrodkowego układu nerwowego w białaczkach nielifoblastycznych u dorosłych . . . . .	227
Pluta Ryszard, Ostrowska Barbara: Zmiany ECoG i EKG w ostrym zatruciu trójetylkiem cyny u szczurów . . . . .	71
Pluta Ryszard: Wpływ prostacykliny na ultrastrukturę kory mózgu królika po całkowitym 20 minutowym niedokrwieniu mózgowia. I. Neurony i neuropil . . . . .	507
Pluta Ryszard: Wpływ prostacykliny na ultrastrukturę kory mózgu królika po całkowitym 20 minutowym niedokrwieniu mózgowia. II. Astrocyty i naczynia krwionośne . . . . .	525
Renkawek Krystyna, Majkowska Joanna: Effect of hyperthermia on the structural and enzymatic properties of rat cerebellum cultured in vitro . . . . .	81
Skonieczna Maria, Kruszewska Joanna, Bicz Włodzimierz: Oxidation in brain mitochondria of rats exposed to heat . . . . .	177
Stryjecka-Zimmer Marta, Zelman Irmina B.: Białka niehistonowe różnych obszarów mózgu u królika zdrowego i królika pt . . . . .	253
Suliński Andrzej R., Berlińska Elżbieta, Bicz Włodzimierz: Effect of high ambient temperature and exercise on lipid peroxidation and phospholipid content in microsomes of rat brain and liver . . . . .	187
Szczech Józef: Comparative appraisal of oligodendroglia in various brain structures in rats exposed to hypoxia. Karyometric and cytophotometric studies . . . . .	573
Szymaś Janusz, Biczysko Wiesława, Gabryel Przemysław: Obecność kwaśnego włóknikowego białka glejowego (GFAP) jako wykładnik różnicowania komórek rdzeniaka . . . . .	313
Śmiałek Mieczysław, Bugera-Piecuch Teresa E., Kosicka Barbara: Effect of ascorbic acid on dopamine level in the mouse brain after intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) . . . . .	299
Śmiałek Mieczysław, Kosicka Barbara, Bugera-Piecuch Teresa E.: Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the respiratory activity of dipaminergic neurons in the mouse brain . . . . .	305
Taraszevska Anna, Zelman Irmina B.: Electron microscopic study of glia in pt rabbit during myelination . . . . .	451
Tarnowska-Dziduszko Eugenia, Bertrand Ewa, Markiewicz Danuta: Analiza zmian morfologicznych w moście w przebiegu przewlekłego alkoholizmu ze szczególnym uwzględnieniem mielinolizy środkowej mostu . . . . .	489
Weinrauder Hafina, Gannuszkin Irina W.: Oddziaływanie surowic chorych na stwardnienie zanikowe boczne na organotypową hodowlę mózdzku . . . . .	343
Wender Mieczysław, Adamczewska-Gonczewicz Zofia, Stanisławska Janina, Pankrac Jadwiga, Talkowska Danuta, Grochowalska Alina: Effect of acute hypoxia on myelin lipids . . . . .	107
Wender Mieczysław, Adamczewska-Gonczewicz Zofia, Stanisławska Janina, Szczech Józef, Godlewski Antoni: Pattern of myelin lipids in the ageing brain . . . . .	235
Wender Mieczysław, Gonczewicz Andrzej: Susceptibility of Wistar rats to encephalitogenic antigen derived from anged animals . . . . .	249
Wender Mieczysław, Godlewski Antoni, Szczech Józef: Oligodendroglia of the ageing human brain. Karyometric and cytophotometric studies . . . . .	561
Zaręba-Kowalska Anna, Borowicz Jerzy: Effect of transient cerebral ischemia on the ultrastructure of the gigantocellular region of the medullary reticular formation in rat . . . . .	117

## INDEKS NAZWISK AUTORÓW

- Adamczewska-Goncerzewicz Z. 107, 235
- Barcikowska-Litwin M. 551
- Berlińska E. 187
- Bertrand E. 489
- Bicz W. 177, 187
- Biczysko W. 313
- Borowicz J. 117
- Bugera-Piecuch T. 59, 299, 305
- Cruz-Sanchez F. 337
- Dolińska E. 551
- Domżał T. 197
- Drac H. 603
- Firsching R. 205
- Gabryel P. 313
- Gadamski R. 21, 539
- Gajkowska B. 131, 623
- Gannuszkina I.V. 343
- Godlewski A. 235, 561
- Goncerzewicz A. 249, 469
- Gosztonyi G. 337
- Grochowalska A. 107
- Honczarenko K. 93
- Iwanowski L. 163
- Kapuściński A. 287
- Kittel M. 59
- Kosicka B. 59, 299, 305, 623
- Krajewski S. 551
- Kraszpułski M. 265
- Kroh H. 329, 615
- Kruszewska J. 177
- Kuchna I. 211
- Kunicki A. 1
- Lafuente J. V. 377
- Liberski P.P. 35, 53
- Loesch A. 99, 147
- Łazarewicz J. 589
- Łukaszyk I. 275
- Majkowski J. 81
- Markiewicz D. 489
- Mossakowski M. J. 21, 329, 539, 639
- Müller W. 205
- Noremborg K. 589
- Nowacki P. 7, 93, 219, 227
- Ostrowska B. 71
- Pankrac J. 107
- Pluta R. 71, 507, 525
- Rafałowska J. 551, 603
- Reifferscheidt I. 205
- Renkawek K. 81, 197, 639
- Skonieczna M. 177
- Stanisławska J. 107 235
- Stryjecka-Zimmer M. 253
- Sulińska A. R. 187
- Szczech J. 235, 561, 573
- Szecherew G. 93
- Szymaś J. 313
- Śmiałek M. 59, 299, 305, 623
- Talkowski D. 107
- Taraszewski A. 451
- Tarnowska-Dziduszko E. 489
- Vogel H. 337
- Walencik S. 329
- Weinrauder H. 329, 343
- Wender M. 107, 235, 249, 561
- Wrzołkowska T. 265, 275
- Zaleska B. 197
- Zaręba-Kowalska A. 117
- Zelman I. B. 253, 451

Janina Rafałowska, Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Maria Barcikowska-Litwin: On modification of the histopathological picture of multiple sclerosis in advanced age . . . . .	211
Krystyna Kowalczyk, Danuta Jesionek, Ewa Nowosadzka, Irena Borkowska: Dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in the brain and suprarenal glands of the pt rabbit . . . . .	225
Michał Walski, Jerzy Borowicz: Electron microscopic investigation of cytoskeletal elements in hypothalamic endocrine neurons . . . . .	233
Maria Skonieczna, Urszula Dorsz-Drożdż, Małgorzata Siwicka, Włodzimierz Bicz: Oxidative phosphorylation and activity of some chosen oxidoreductases in mitochondria of rat brain subjected to severe environmental hyperthermia . . . . .	245
Jan Pachecka, Jerzy Podleśny, Wiesław Gaździk, Katarzyna Zaremba, Włodzimierz Bicz: Effect of high ambient temperature on distribution of carbamazepine and its main metabolite 10,11-epoxy-carbamazepine in rat brain . . . . .	259

### СОДЕРЖАНИЕ

Андржей Гонджевич: Роль астроглии в болезненных процессах, протекающих с распадом миелины. II. Цитохимия энзимов и иммуноцитохимия астроглии в экспериментальном повреждении белого вещества . . . . .	127
Ирмина Б. Зельман, Мирослав Я. Моссаковски: Поздние патоморфологические изменения в мозгах крыс после перенесенной 15-минутной клинической смерти . . . . .	151
Мирослав Я. Моссаковски, Станислав Краевски: Противоневрональные антитела в сыворотке крови крыс, подвергнутых общей мозговой ишемии . . . . .	163
Андржей Капустинский: Барьер кров—мозг в модели клинической смерти крыс. . . . .	175
Мечислав Вендер, Ханна Хейдук-Хантке, Анжей Гонджевич, Халина Выглондальска-Ернас: Морфометрические исследования нервных волокон мозолистого тела крыс, подвергнутых слабой гипоксии . . . . .	185
Эльжбета Кида, Кристина Ренкавек: Морфологические изменения черного вещества крысы подвергнутой кратковременной гипоксии в органотипичной тканевой культуре . . . . .	193
Барбара Гайковска, Анне Вирон: Иммунологическая реакция Леу-энкефалина с употреблением золота в невросекреторных ядрах гипоталамуса крысы . . . . .	203
Янина Рафаловска, Станислав Краевски, Эва Долинска, Маря Барциковска-Литвин: К модификации гистопатологической картины рассеяного склероза в старческом возрасте . . . . .	211
Кристина Ковальчук, Данута Есенек, Эва Ховосадзка, Ирена Борковска: Исследование активности дофаминовой $\beta$ -монооксигеназы в мозгу и надпочечниках кролика ПТ . . . . .	225
Михал Вальски, Ежы Борович: Ультраструктурные исследования элементов клеточного скелета нейронов невросекреторных ядер гипоталамуса крысы . . . . .	235
Маря Сконачна, Уршула Дорш-Дрождж, М. Сивицка, В. Бич: Оксидативная фосфорилиция и активность избранных оксидоредуктаз мозговых митохондрий крысы подвергнутой действию острой гипертермии среды . . . . .	245
Ян Пахецка, Ежы Подлесьны, Веслав Газдзик, Катажина Заремба, Влодзимеж Бич: Влияние повышенной температуры среды на размещение карбамазепины и ее главного метаболита 10,11-эпокси карбамазепины в анатомических структурах мозга . . . . .	259

### SPIS TREŚCI

Andrzej Goncerzewicz: Rola astrogleju w procesach chorobowych przebiegających z rozpadem mieliny. II. Cytochemia enzymów i immunocytochemia astrogleju w doświadczalnym uszkodzeniu istoty białej . . . . .	127
Irmina B. Zelman, Mirosław J. Mossakowski: Późne zmiany patomorfologiczne w mózgach szczurów po przebytej śmierci klinicznej . . . . .	151
Mirosław J. Mossakowski, Stanisław Krajewski: Przeciwciała antyneuronalne w surowicy krwi szczurów poddanych całkowitemu niedokrwieniu mózgowia . . . . .	163
Andrzej Kapuściński: Bariera krew — mózg w modelu śmierci klinicznej u szczurów . . . . .	175
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Andrzej Goncerzewicz, Halina Wyglądalska-Jernas: Badania morfometryczne włókien nerwowych spoidła wielkiego szczurów poddanych działaniu łagodnego niedotlenienia . . . . .	185
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek: Zmiany morfologiczne istoty czarnej szczura poddanej krótkotrwałemu niedotlenieniu w warunkach organotypowej hodowli tkankowej . . . . .	193
Barbara Gajkowska, Annie Viron: Barwienie immunologiczne z użyciem złota Leu-enkefalin w neurosekrecyjnych jądrach podwzgórza szczura . . . . .	203
Janina Rafałowska, Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Maria Barcikowska-Litwin: W sprawie modyfikacji obrazu histopatologicznego stwardnienia rozsianego w wieku starym . . . . .	211
Krystyna Kowalczyk, Danuta Jesionek, Ewa Nowosadzka, Irena Borkowska: Badania aktywności $\beta$ -monooksygenazy depaminowej w mózgu i nadnerczach królika pt . . . . .	225
Michał Walski, Jerzy Borowicz: Badania mikroskopowo-elektronowe elementów szkieletu komórkowego neuronów jąder neurosekrecyjnych podwzgórza szczura . . . . .	233
Maria Skonieczna, Urszula Dorsz-Drożdż, Małgorzata Siwicka, Włodzimierz Bicz: Oksydacyjna fosforylacja i aktywność wybranych oksydoreduktaz mitochondriów mózgu szczura poddanego działaniu ostrej hipertermii środkowiskowej . . . . .	245
Jan Pachecka, Jerzy Podleśny, Wiesław Gaździk, Katarzyna Zaremba, Włodzimierz Bicz: Wpływ podwyższonej temperatury otoczenia na zawartość karbamazepiny i jej głównego metabolitu 10,11-epoksy-karbamazepiny w mózgu szczura . . . . .	259

### CONTENTS

Andrzej Goncerzewicz: The role of astroglia in pathological processes characterized by myelin disintegration. II. Electron enzyme and immunocytochemistry of the astroglia in experimental white matter injury . . . . .	127
Irmina B. Zelman, Mirosław J. Mossakowski: Remote pathological brain changes in rats following experimentally induced clinical death . . . . .	151
Mirosław J. Mossakowski, Stanisław Krajewski: Antineural antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia . . . . .	163
Andrzej Kapuściński: Blood — brain barrier in the experimental model of clinical death in rats . . . . .	175
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Andrzej Goncerzewicz, Halina Wyglądalska-Jernas: Morphometric studies of the nerve fibers in corpus callosum of rats exposed to mild hypoxia . . . . .	185
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek: Morphological alterations of rats substantia nigra induced by short-lasting anoxia <i>in vitro</i> . . . . .	193
Barbara Gajkowska, Annie Viron: Immuno-gold staining of Leu-enkephalin in the rat hypothalamic neurosecretory nuclei . . . . .	203