

CMDIK 3ciem

2 pr. 2008

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATHOLOGÓW POLSKICH



NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 26

1988

ZESZYT 4

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 26

1988

ZESZYT 4

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, 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, 49-82-79

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy 30 czerwca 1988

Zakład Narodowy im. Ossalińskich – Wydawnictwo. Wrocław 1989.
Nakład: 600 egz. Objętość ark. wyd. 11,20, ark. druk. 10, ark.A₁-13.
Papier offset. kl. III, 80 g, 70×100. Oddano do składania 1988.07.25.
Podpisano do druku 1989.02.20. Druk ukończono w marcu 1989.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3441/88 Cena zł 200. –

EWA MATYJA, ELŻBIETA KIDA

DYNAMICS OF RAT HIPPOCAMPUS DEVELOPMENT
IN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE.
LIGHT AND ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY

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

The hippocampal formation represents a peculiar CNS structure exhibiting a characteristic polar orientation and laminar arrangement of nerve cells achieved during development in both *in vivo* and *in vitro* conditions (Purpura, Pappas 1968; DeLong 1970; Gähwiler 1981a). The extrinsic afferent fibres to particular fields of the hippocampal formation, originating from several sources, especially from the septum and contralateral hippocampus involve restricted areas of termination on the dendritic tree (Gottlieb, Cowan 1972).

The interest in hippocampal morphology arises from the particularly high vulnerability of this structure to certain noxious factors such as ischemia, anoxia, senile changes or excitotoxins (Meldrum, Brierley 1972, 1973; Dam 1980; Ekström, Diemer 1982; Perkins, Stone 1985). Moreover, some areas of the hippocampal pyramidal fields, especially CA₁ neurons are found to be more sensitive to various injurious factors such as ischemic stress or epilepsy. The reason of this high sensitivity to various pathological conditions and the selective vulnerability of particular neuronal populations of the hippocampus are as yet not fully understood. Pre- and postnatal development of hippocampal neurons has been studied in recent years, but the morphology of synapses and the process of synaptogenesis does not seem to be sufficiently elucidated.

A few studies have been done in tissue culture conditions so far (Kim 1973; Gähwiler 1981a, b; Bartlett, Banker 1984a, b). Since the organotypic tissue culture model represents a very suitable tool for study of morphology and development, we have used this model to investigate the ultrastructural characteristics and dynamics of differentiation of the hippocampal formation during development *in vitro*. This model provides a basis for further studies of particular morphological properties of the hippocampus in various pathological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Organotypic cultures of the hippocampal formation were prepared from 2–3-day-old Wistar rats. The hippocampus was dissected out under sterile conditions from both cerebral hemispheres. The blocks of tissue were placed into dishes containing Eagle Minimal Essential Medium (MEM) and then cut coronally into thin slices, put on collagen-coated glass coverslips and covered with two drops of nutrient medium. The medium consisted of 25% human serum and 75% MEM supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg%. The cultures were maintained in Maximow double coverslip assemblies at 36.5°C. The nutrient medium was renewed twice weekly. The cultures were observed regularly in living state in the light microscope.

After 3, 6, 8, 11, 15 and 21 days of cultivation *in vitro* the cultures were fixed for light microscopy and stained with cresyl violet and Klüver-Barrera method. The selected cultures were processed for electron microscopy. They were rinsed in cacodylate buffer pH 7.2, fixed in 1.5% glutaraldehyde for 1/2 h, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEM 100B electron microscope.

RESULTS

Light microscopic observation:

Typical laminar arrangement of the pyramidal and granule cells was well preserved in the explants of hippocampal cultures until the end of the first week *in vitro* (Fig. 1). During the following weeks the explant became thinner, particular nerve cells could be recognized but the laminar pattern of the structure was not so distinct as in the first week in the living state. After histological staining, however, typical lamination of the structure was still present. During the first days of cultivation, the outgrowth zone was characterized by numerous processes sprouting from the explant. Thin neuronal processes appeared as early as on the 2-nd day *in vitro* (Fig. 2a, b). At this time only a few glial processes were visible in the outgrowth zone. In older cultures a dense mesh of processes developed, so it became impossible to distinguish particular axonal and glial cell processes.

Electron-microscopic observation:

Electron-microscopic examination revealed that in young, 3-day-old hippocampal cultures particular nerve cells could be easily identified, whereas the neuropil displayed marked signs of immaturity. Most of the synapses were immature with irregular outlines of pre- and postsynaptic profiles, a small number of synaptic vesicles and poorly defined membrane densities. A few growth cones filled with a great number of large, round, clear vesicles were encountered.

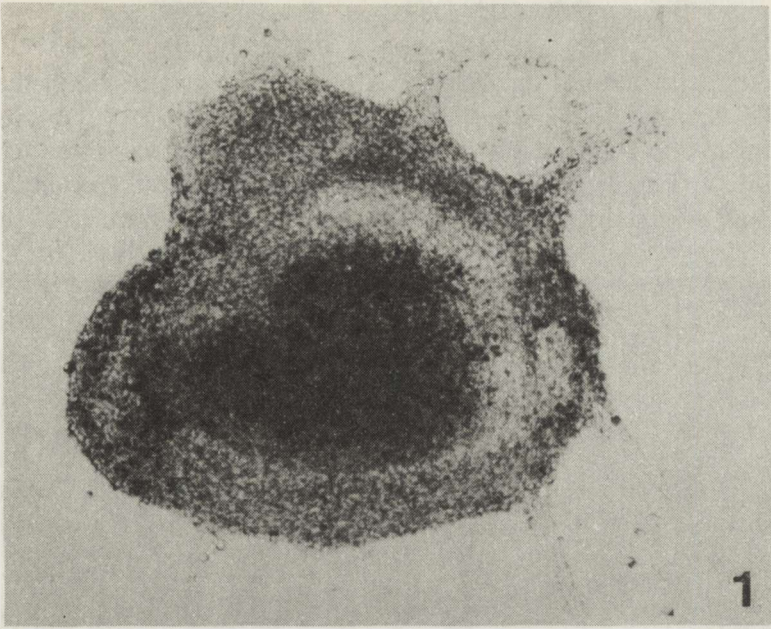


Fig. 1. Culture of hippocampal formation in living state, 2 days *in vitro* (DIV). Typical laminar arrangement of particular cell layers. $\times 60$

Ryc. 1. Hodowla hipokampa — obserwacje przyżyciowe, 2 dni *in vitro* (DIV). Charakterystyczny warstwowy układ komórek nerwowych. Pow. $60\times$

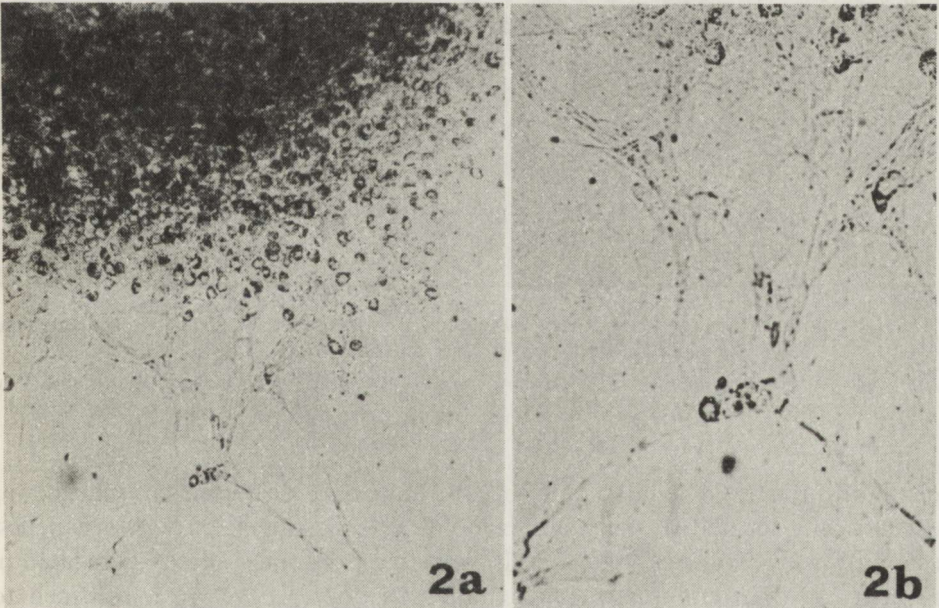


Fig. 2. Culture of hippocampal formation in living state, 3 DIV. *a* — numerous neuronal and glial processes proliferating from the explant. $\times 200$. *b* — fragment of the outgrowth zone revealing a delicate network of thin neuronal processes and a few thick glial processes. $\times 400$

Ryc. 2. Hodowla hipokampa — obserwacje przyżyciowe, 3 DIV. *a* — liczne wypustki glikalne i neuronalne wokół eksplantatu. Pow. $200\times$. *b* — fragment strefy wzrostu. Delikatna siateczka cienkich wypustek neuronalnych oraz grube wypustki glikalne. Pow. $400\times$

In 6-day-old cultures different types of neurons were found in the loosely arranged neuropil composed of neuronal and glial cell processes. Pyramidal cells appeared to be in clusters separated by thin glial processes or attached to one another (Fig. 3). Prominent cytoplasmic membrane thickening could be sometimes observed in the neuronal contact zone. The nucleus of these cells

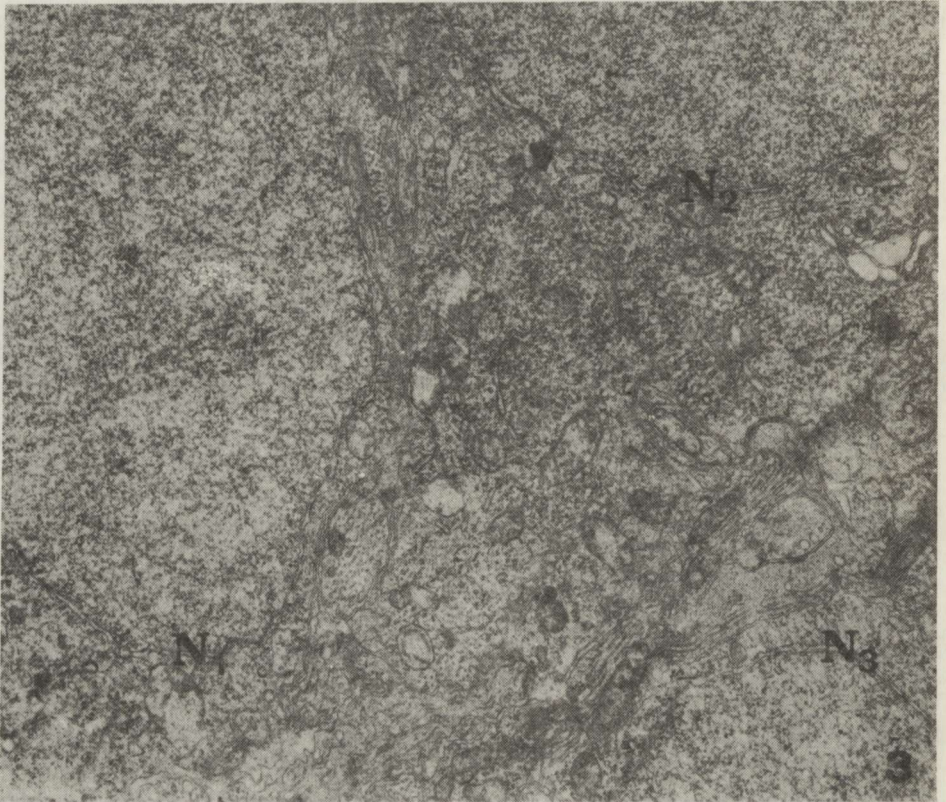


Fig. 3. Hippocampal culture, 6 DIV. Several pyramidal neurons (N_1 , N_2 , N_3) compactly arranged in clusters, separated by thin rim of neuropil. $\times 16\,000$

Ryc. 3. Hodowla hipokampa, 6DIV. Neurony piramidowe (N_1 , N_2 , N_3) leżące obok siebie. Pow. $16\,000\times$

exhibiting relatively regular outlines and uniformly dispersed chromatin was excentrically located in the cell soma. The cytoplasm was rich in organelles, especially mitochondria, neurotubules and free ribosomes, often aggregated in rosettes. Smooth endoplasmic reticulum was poorly developed, confined to a few short cisternae and vacuoles. The granule cells exhibited an oval or round nucleus surrounded by a thin rim of cytoplasm poor in organelles. Among pyramidal and granule cells a few neurons with large, often deeply invaginated, nucleus and abundant cytoplasm were found. The cytoplasm of these cells showed long channels of granular endoplasmic reticulum scattered throughout the cytoplasm or arranged in parallel arrays (Fig. 4). In some of

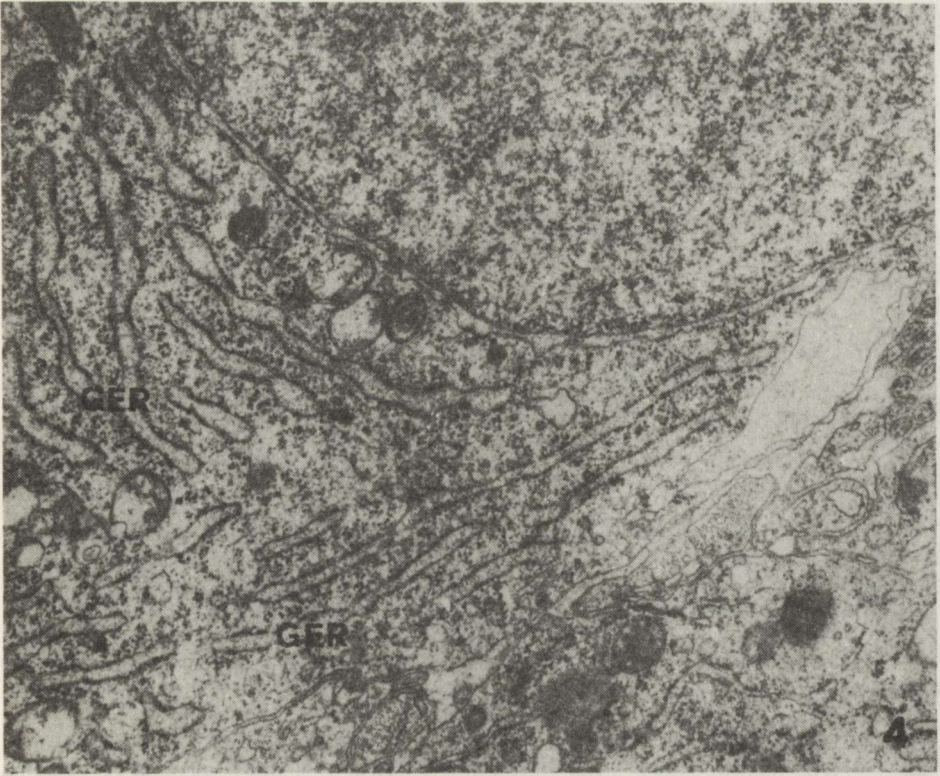


Fig. 4. Hippocampal culture, 6 DIV. Fragment of basket cell showing numerous cisternae of granular endoplasmic reticulum (GER) arranged in parallel arrays or scattered throughout the cytoplasm. $\times 48\,000$

Ryc. 4. Hodowla hipokampa, 6 DIV. Fragment komórki piramidowej wstawkowej z licznymi równoległymi lub rozproszonymi w cytoplazmie kanałami ziarnistej siatki śródplazmatycznej (GER). Pow. $48\,000\times$

these cells, the nucleus revealed a conspicuous nucleolus and intranuclear rods composed of parallelly oriented thin filaments. The morphological characteristics of these cells allow to identify them as basket cells. Synaptic contacts in the neuropil were rarely observed. Growth cones filled with large vesicles were observed only occasionally. The most common interneuronal connections appeared as axo-dendritic junctions. The maturation stage of particular synapses varied markedly including a number of synaptic vesicles in the terminal boutons, the appearance of synaptic membrane densities and a number of organelles in the pre- and postsynaptic elements. The axon terminals contacted usually large, primary dendrites (Fig. 5). Only sporadically contacts on dendritic spines could be detected. Numerous terminals contained only a few vesicles located closely to the presynaptic membrane or in the centre of boutons. Others, filled with a large number of small, round vesicles were seen infrequently. The majority of synapses displayed symmetric densities of the pre- and postsynaptic membranes (Fig. 6). Dendritic shafts contained nume-

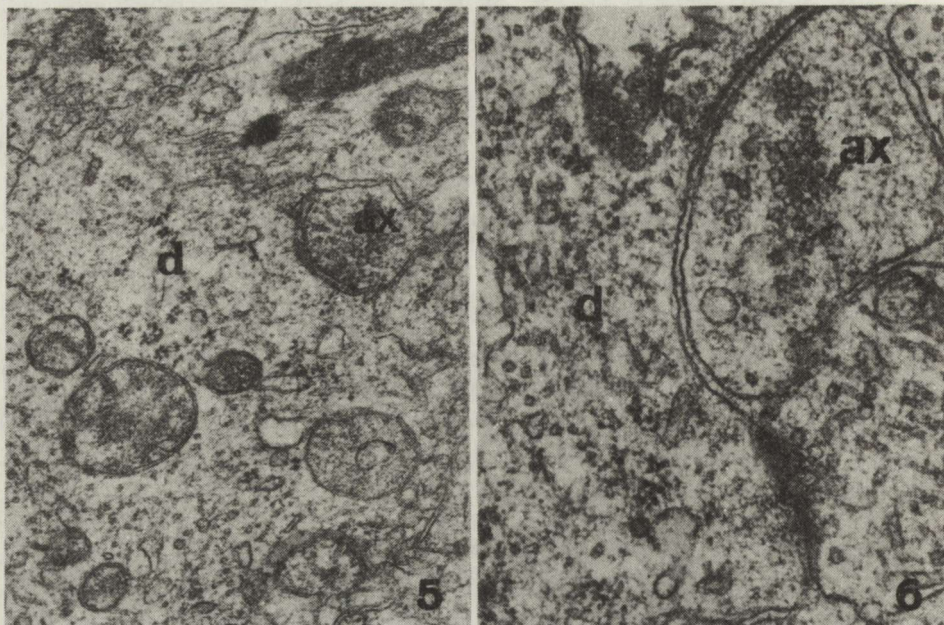


Fig. 5 Hippocampal culture, 6 DIV. Axon terminal (ax) filled with numerous synaptic vesicles terminating on a primary dendrite (d). Slightly pronounced symmetric densities on pre- and post-synaptic membranes. $\times 24\,000$

Ryc. 5. Hodowla hipokampa, 6 DIV. Zakończenie aksonalne (ax) wypełnione licznymi pęcherzykami synaptycznymi, tworzące połączenie z dużym dendrytem (d). Słabo zaznaczone zagęszczenia pre- i post-synaptyczne. Pow. $24\,000\times$

Fig. 6. Hippocampal culture, 6 DIV. Axo-dendritic connection with distinct symmetric thickenings on presynaptic bouton (ax) and primary dendrite (d). Synaptic vesicles located in the centre of the bouton. $\times 45\,000$

Ryc. 6. Hodowla hipokampa, 6 DIV. Połączenie akso-dendrytyczne z wyraźnymi symetrycznymi pogrubieniami błon w obrębie kolbki presynaptycznej (ax) i dendrytu (d). Pęcherzyki synaptyczne zgromadzone w centralnej części kolbki. Pow. $45\,000\times$

rous neurotubules parallelly arranged in arrays, sparse mitochondria, vacuoles, short granular endoplasmic reticulum channels and free ribosomes. Mature axo-somatic synapses were absent. In some places the axon terminals with numerous vesicles were closely attached to the cell soma, but there were no clear pre- and postsynaptic membrane densities (Fig. 7).

In 8-day-old hippocampal cultures different types of nerve cells could be distinguished. The majority of pyramidal neurons exhibited an oval or round nucleus with dispersed euchromatin. The abundant cell cytoplasm of these neurons contained numerous organelles such as channels of granular endoplasmic reticulum, ribosomes free or in rosettes, neurotubules, mitochondria and occasionally multivesicular bodies or dense core vesicles. The Golgi complex at this stage of development was well organized and consisted of many cisternae and vacuoles forming distinct stacks situated in different regions of the

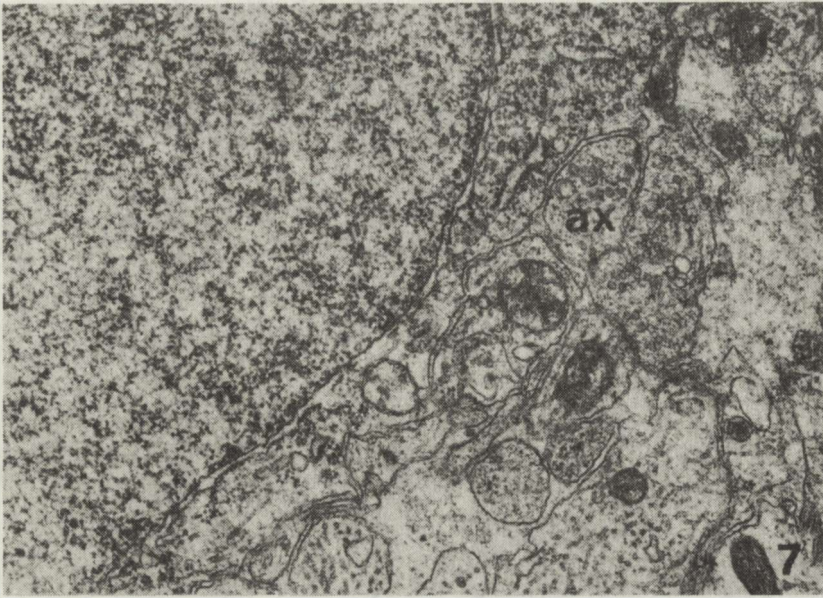


Fig. 7. Hippocampal culture, 6 DIV. Axon terminal (ax), closely attached to the cell soma, containing synaptic vesicles of various size. Lack of pre- and post-synaptic densities. $\times 24\,000$
Ryc. 7. Hodowla hipokampa, 6 DIV. Zakończenie aksonalne (ax), ściśle przylegające do ciała komórkowego, zawierające różnej wielkości pęcherzyki synaptyczne. Brak zagęszczeń pre- i post-synaptycznych. Pow. $24\,000\times$

cytoplasm (Fig. 8). Occasionally, in the proximity of pyramidal neurons, satellite glial cells were visible (Fig. 9). The synapses increased in number and generally contained more vesicles than in younger cultures. The majority of synapses represented axo-dendritic connections, but synaptic contacts on dendritic spines were also quite frequent. Many axon terminals contacting dendritic shafts were filled with numerous small, round vesicles. Nevertheless, some of the axon terminals were relatively empty and contained only a few vesicles, accumulated near the presynaptic membrane or scattered throughout the boutons (Fig. 10). Occasionally dense core vesicles were observed at some distance from the synaptic membrane. Some of the axonal boutons, however, forming an asymmetric contact on dendritic spines were densely packed with a large number of small, round or large, clear vesicles. Both symmetric and asymmetric types of synaptic junctions could be found at this stage of development *in vitro*, but the asymmetric type distinctly predominated (Fig. 11). Synapses onto nerve cells somata were encountered infrequently and pre- and post-synaptic membrane densities were still poorly defined.

In 11-day-old cultures the neuropil appeared as a dense network of neuronal and glial cell processes (Fig. 12). Glial cells, mainly fibrous astrocytes were rarely seen. The majority of pyramidal cells displayed a large, slightly oval nucleus and abundant cytoplasm rich in organelles, especially in well

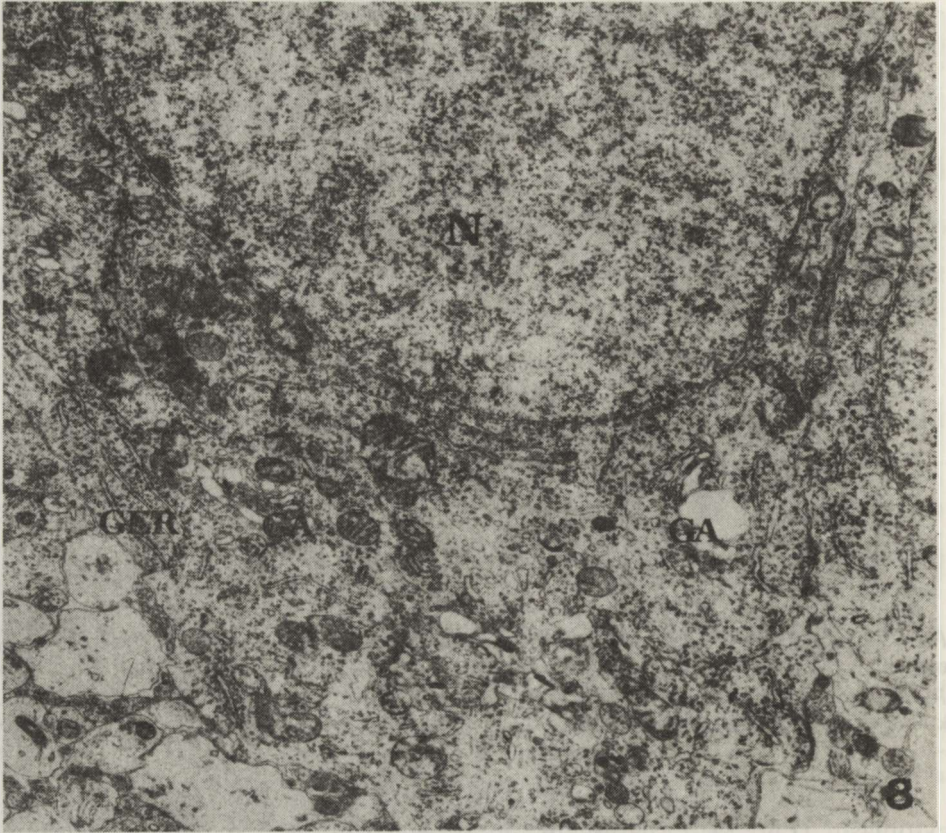


Fig. 8. Hippocampal culture, 8 DIV. Pyramidal neuron with round nucleus (N) and abundant cytoplasm containing many channels of granular endoplasmic reticulum (GER), numerous free ribosomes, neurotubules and well-developed Golgi complex (GA). $\times 13\,000$

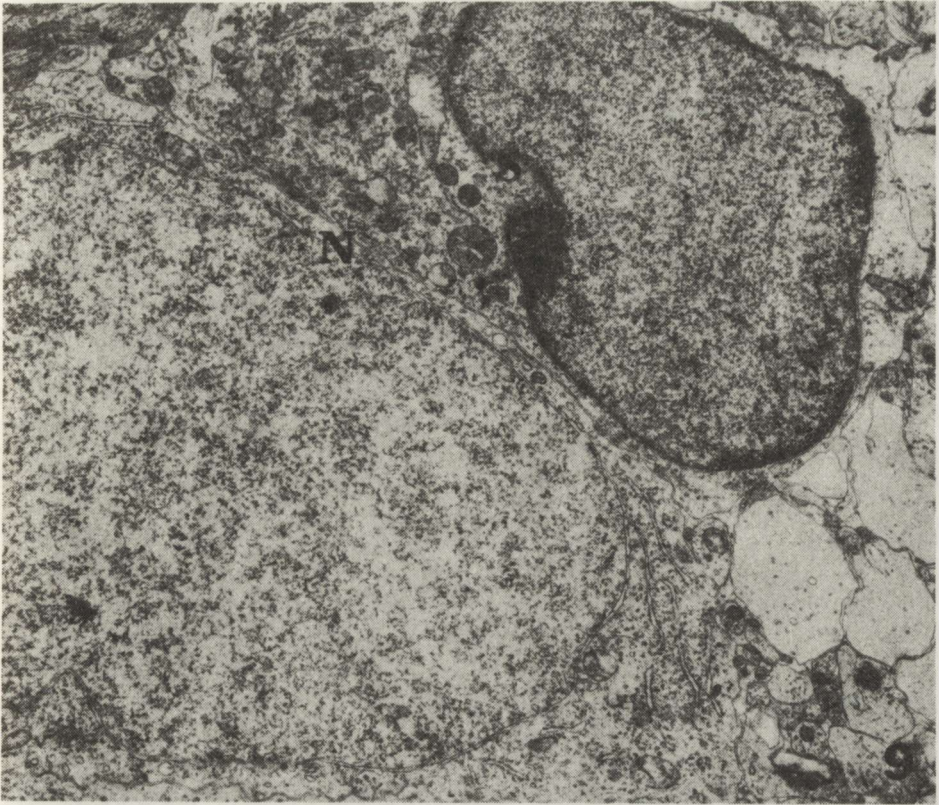
Ryc. 8. Hodowla hipokampa, 8 DIV. Neuron piramidowy z okrągłym jądrem (N) i obfitą cytoplazmą zawierającą liczne kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), liczne wolne rybosomy, neurotubule oraz dobrze rozwinięty aparat Golgiego (GA). Pow. 13 000 \times

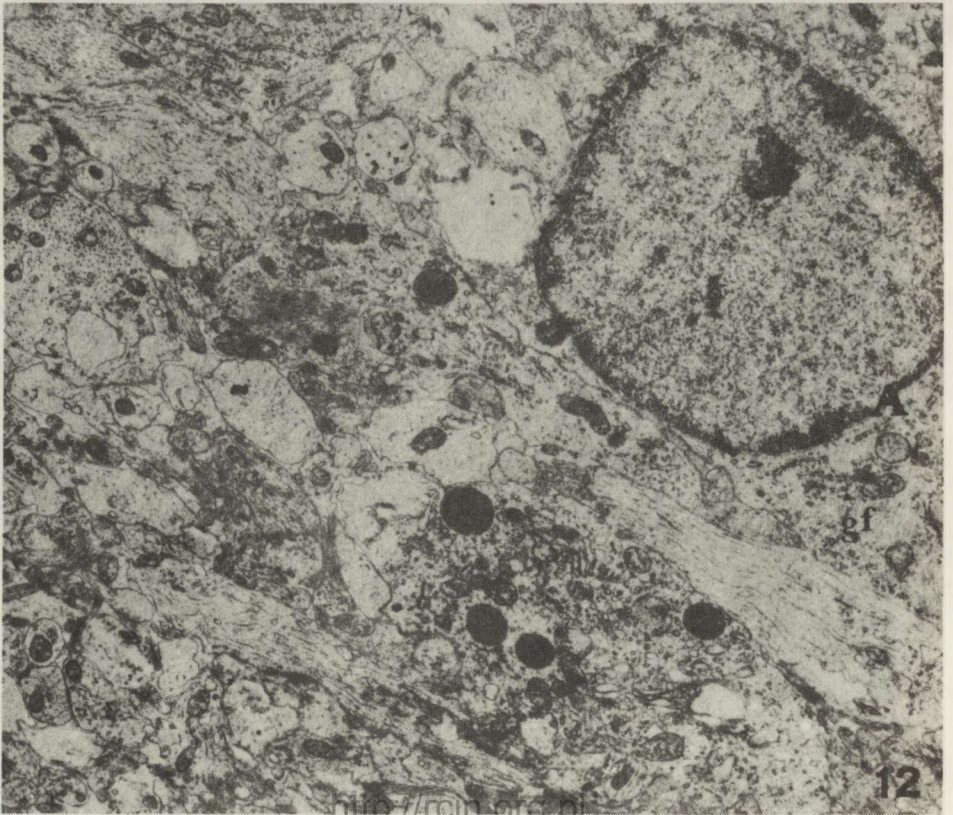
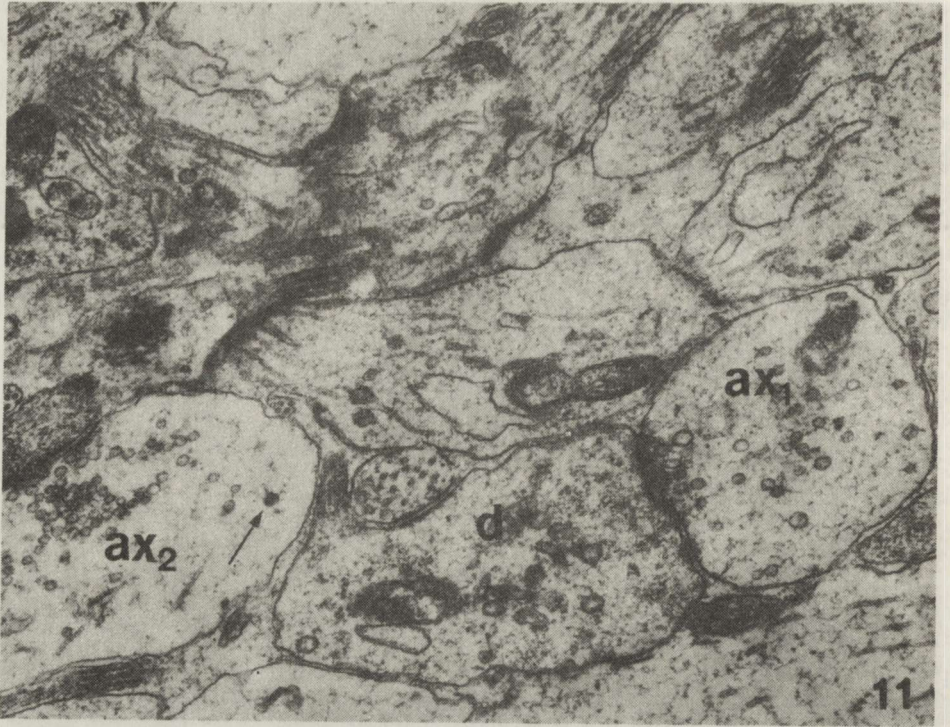
Fig. 9. Hippocampal culture, 8 DIV. Satellite glial cell (S) localized in the vicinity of a neuron (N). $\times 9\,700$

Ryc. 9. Hodowla hipokampa, 8 DIV. Komórka gleju satelitarnego (S) położona w pobliżu neuronu (N). Pow. 9 700 \times

Fig. 10. Hippocampal culture, 8 DIV. Several synaptic contacts on dendritic shaft (d). Electron-lucent bouton (ax_1) contains small number of vesicles scattered throughout the terminal and accumulated near the presynaptic membrane. Other axon terminal (ax_2) filled with numerous vesicles of various size. $\times 24\,300$

Ryc. 10. Hodowla hipokampa, 8 DIV. Kilka zakończeń synaptycznych na dendrycie (d). Elektronowo jasna kolbka (ax_1) z niewielką ilością pęcherzyków rozproszonych w obrębie zakończenia oraz zgromadzonych w pobliżu błony presynaptycznej. Zakończenie aksonalne (ax_2) wypełnione licznymi pęcherzykami różniącymi się wielkością. Pow. 24 300 \times





developed Golgi complex and numerous cisternae of granular endoplasmic reticulum arranged in parallel arrays of the Nissl body. The neurons were often closely attached to one another (Fig. 13). The granule cells were usually also tightly packed in clusters. These cells displayed a typical round or oval nucleus surrounded by a narrow rim of cytoplasm containing a few channels of granular endoplasmic reticulum, small mitochondria and numerous ribosomes. The Golgi apparatus was poorly developed with a few cisternae and vacuoles (Fig. 14). Occasionally nerve cells with a large, deeply invaginated nucleus and cytoplasm rich in organelles could be found. These cells resembling basket neurons were characterized by a well developed granular endoplasmic reticulum and abundant other cytoorganelles (Fig. 15).

In the neuropil axo-dendritic synapses contacting large dendrites were frequently seen, but numerous axo-spinous synapses terminating on dendritic spines were also found (Fig. 16). The spines were filled with floccular material, sacs of smooth endoplasmic reticulum and occasionally spine apparatus. Sometimes several presynaptic boutons contacted the same dendritic process (Fig. 17). The majority of axo-spinous synapses displayed asymmetric membrane densities, whereas axo-dendritic ones were characterized by a both symmetric and asymmetric type of junctions. Occasionally the same axon terminals formed several axo-spinous connections with a few dendritic spines (Fig. 18). The presynaptic endings contained still a variable number of synaptic vesicles. Most of synaptic vesicles were small, round with electron-lucent content. Some of the terminals contained additionally a few large, pleomorphic or dense core vesicles. The synaptic vesicles were usually accumulated in the vicinity of the presynaptic membrane, whereas the remaining part of the bouton was empty (Fig. 19). The extent of membrane thickenings varied. In some synapses thickening of the membranes was limited to a small fragment of the area of the contact zone, while in others the membrane densities involved the whole length of the junction. Moreover, two types of axo-dendritic synapses could be distinguished: the most commonly observed "boutons terminaux" type and the rarely seen "bouton en passant" type (Fig. 20). Very

Fig. 11. Hippocampal culture, 8 DIV. Axo-dendritic synapse which seems to represent symmetric type with delicate thickenings on axonal bouton (ax_1) and dendrite (d). Axo-spinous synapse with large axon terminal (ax_2) containing both small, clear vesicles and a few dense core vesicles (arrow). $\times 32\ 000$

Ryc. 11. Hodowla hipokampa, 8 DIV. Synapsa akso-dendrytyczna z delikatnymi pogrubieniami w obrębie kolbki aksonalnej (ax_1) i dendrytu (d). Synapsa axo-kolcowa z zakończeniem aksonalnym (ax_2) zawierającym małe, jasne pęcherzyki oraz pojedyncze pęcherzyki z elektronowo gęstym rdzeniem (strzałka). Pow. $32\ 000 \times$

Fig. 12. Hippocampal culture, 11 DIV. Compact neuropil composed of neuronal and glial processes. Glial cell (A) with numerous thin gliofilaments (gf) in the cytoplasm. $\times 11\ 400$

Ryc. 12. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Zbity neuropil złożony z wypustek neuronalnych i glejowych. Komórka glejowa (A) z licznymi włókienkami glejowymi (gf) w cytoplazmie. Pow. $11\ 400 \times$

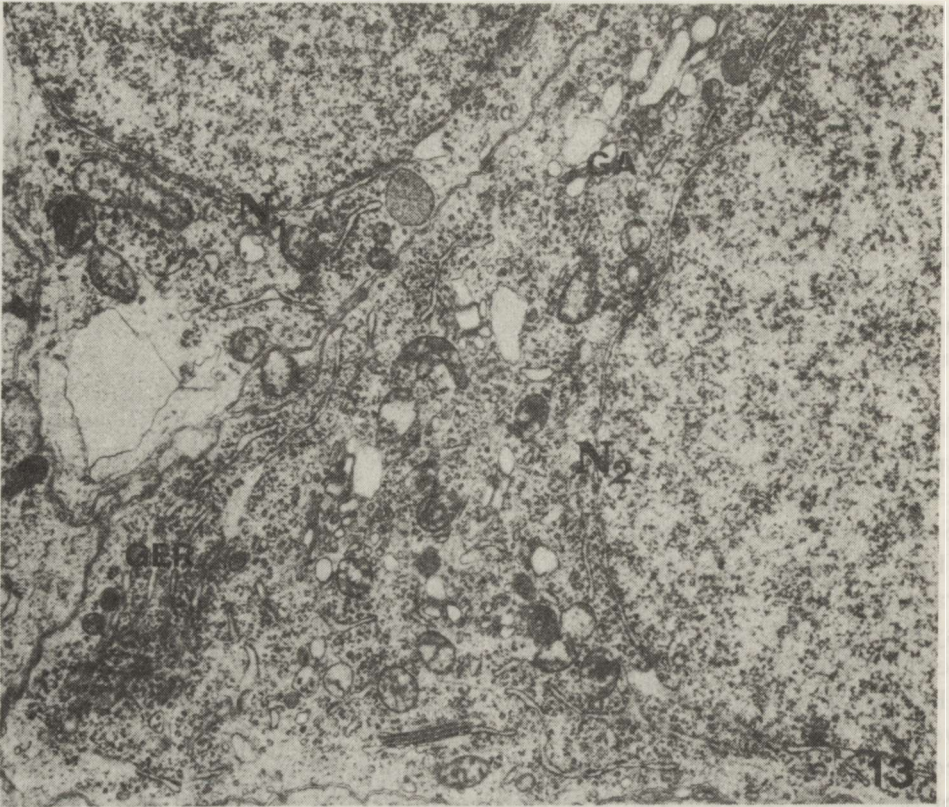


Fig. 13. Hippocampal culture, 11 DIV. Two neurons (N_1 , N_2) attached to one another. Abundant cytoplasm is rich in organelles such as well-developed Golgi apparatus (GA), many channels of granular endoplasmic reticulum (GER), mitochondria and ribosomes. $\times 16\,000$

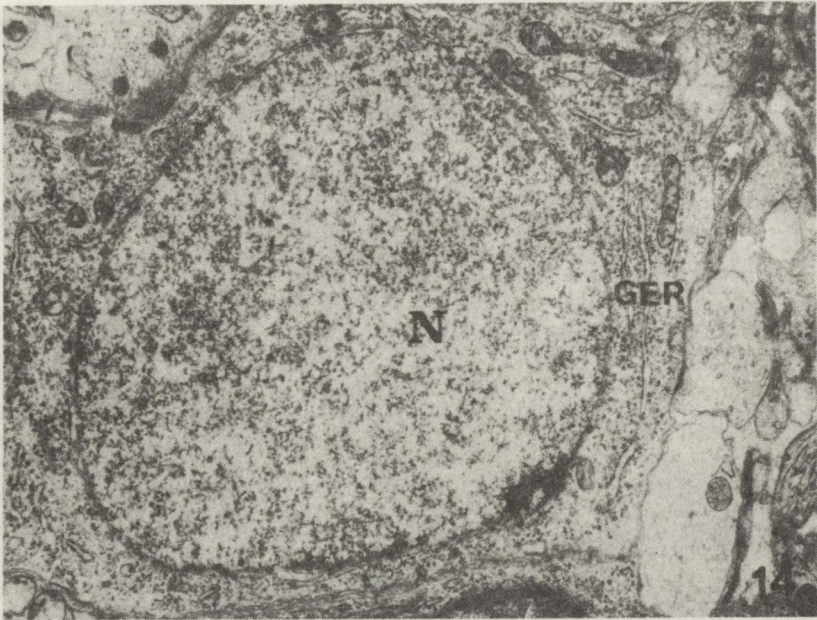
Ryc. 13. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Dwa przylegające do siebie neurony (N_1 , N_2). Obfita cytoplazma bogata w organelle: dobrze rozwinięty aparat Golgiego (GA), liczne kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), mitochondria i rybosomy. Pow. $16\,000\times$

Fig. 14. Hippocampal culture, 11 DIV. Granule cell with relatively large nucleus (N) surrounded by narrow rim of cytoplasm containing short channels of granular endoplasmic reticulum (GER), mitochondria and ribosomes. $\times 10\,000$

Ryc. 14. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Komórka ziarnista ze stosunkowo dużym jądrem (N) otoczonym przez wąski rąbek cytoplazmy, zawierającej krótkie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), mitochondria i rybosomy. Pow. $10\,000\times$

Fig. 15. Hippocampal culture, 11 DIV. A nerve cell with numerous channels of granular endoplasmic reticulum (GER), well-developed Golgi complex (GA) and mitochondria. $\times 11\,400$

Ryc. 15. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Komórka nerwowa z licznymi kanałami siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego (GER) i mitochondriami. Pow. $11\,400\times$



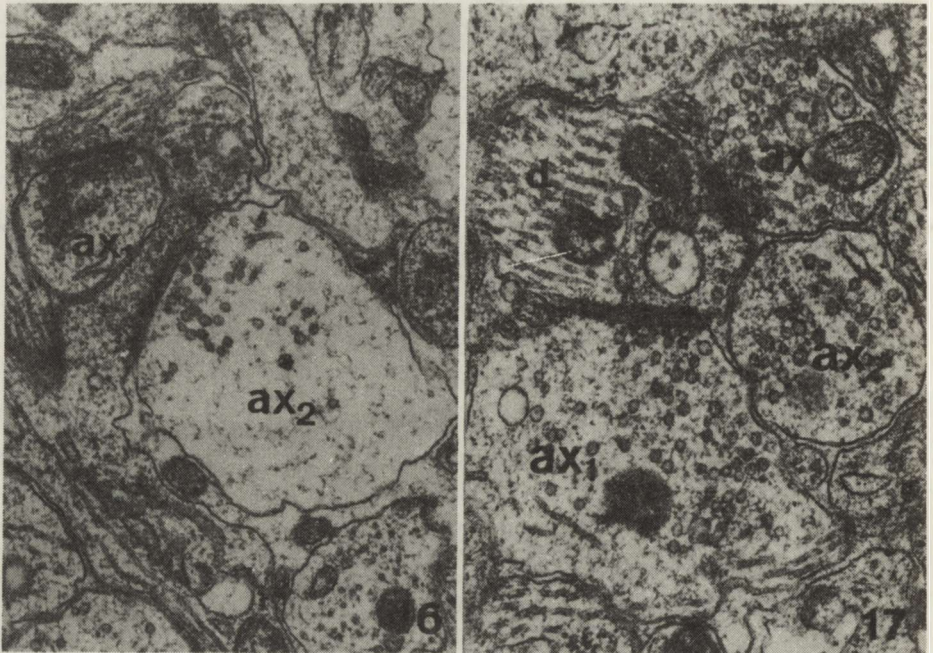


Fig. 16. Hippocampal culture, 11 DIV. Axo-spinous synapses. One of axonal boutons (ax_1) filled with numerous synaptic vesicles. The other one (ax_2) contains some vesicles in the vicinity of presynaptic membrane. $\times 24\ 300$

Ryc. 16. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Synapsy akso-kolcowe. Kolbka aksonalna (ax_1) wypełniona licznymi pęcherzykami synaptycznymi. Inna kolbka (ax_2) zawiera niewielką ilość pęcherzyków w pobliżu błony presynaptycznej. Pow. $24\ 300 \times$

Fig. 17. Hippocampal culture, 11 DIV. Single dendrite (d) surrounded by several axonal boutons (ax_1 , ax_2 , ax_3) filled with numerous synaptic vesicles. Two of these terminals form synaptic connections with distinct densities on pre- and post-synaptic membranes. $\times 32\ 000$

Ryc. 17. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Dendryt otoczony kilkoma kolbkami aksonalnymi (ax_1 , ax_2 , ax_3) wypełnionymi licznymi pęcherzykami synaptycznymi. Dwa zakończenia presynaptyczne tworzą synapsy odznaczające się wyraźnymi zagęszczeniami pre- i post-synaptycznymi. Pow. $32\ 000 \times$

Fig. 18. Hippocampal culture, 11 DIV. Numerous synapses visible in the neuropil. One of the axon terminals (ax_1) forms asymmetric axo-spinous synapses with two dendritic spines (s_1 , s_2). Some of the boutons contain both small, round, clear and dense core vesicles (arrow). $\times 24\ 300$

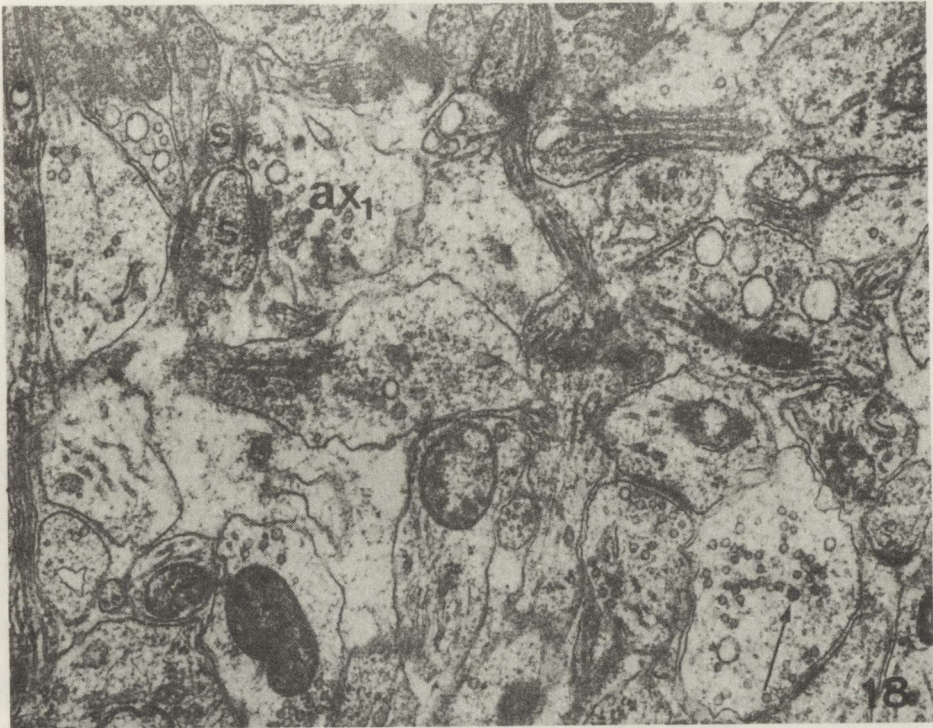
Ryc. 18. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Liczne synapsy widoczne w neuropilu. Zakończenie aksonalne (ax_1) tworzy asymetryczną synapsę akso-kolcową z dwoma kolcami dendrytycznymi (s_1 , s_2). Niektóre kolbki synaptyczne zawierają zarówno małe, jasne, okrągłe pęcherzyki, jak i pęcherzyki z elektronowo gęstym rdzeniem (strzałka). Pow. $24\ 300 \times$

Fig. 19. Hippocampal culture, 11 DIV. Axo-dendritic synapse. Small number of synaptic vesicles located close to presynaptic membrane or dispersed in relatively empty, electron-lucent bouton (ax). Dendrite (d) contains numerous neurotubules. $\times 32\ 400$

Ryc. 19. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Synapsa akso-dendrytyczna. Mała ilość pęcherzyków synaptycznych zlokalizowanych w pobliżu błony presynaptycznej oraz rozproszonych w stosunkowo pustej, elektronowo-jasnej aksoplazmie (ax). Dendryt (d) z licznymi neurotubulami. Pow. $32\ 400 \times$

Fig. 20. Hippocampal culture, 11 DIV. Axo-dendritic synapse of bouton "en passant" type (b). $\times 24\ 000$

Ryc. 20. Hodowla hipokampa, 11 DIV. Synapsa akso-dendrytyczna z kolbką typu "en passant"



few symmetric axo-somatic contacts were observed exhibiting small number of round, clear vesicles tightly packed closely to the presynaptic membrane.

In 15- and 21-day-old, well differentiated cultures characteristic, mature hippocampal neurons were present. The pyramidal cells were increased in size and showed well developed granular endoplasmic reticulum and Golgi complex, more prominent than in younger cultures (Fig. 21). Granule cells

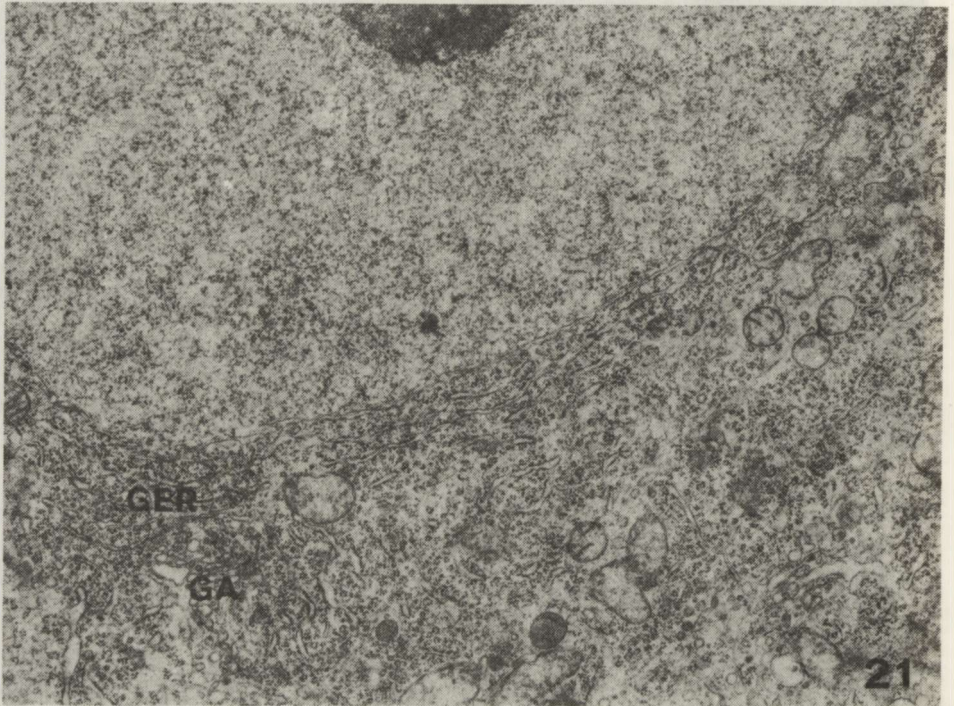


Fig. 21. Hippocampal culture, 15 DIV. Mature pyramidal cell exhibiting abundant cytoplasm with numerous channels of granular endoplasmic reticulum (GER), well-developed Golgi complex (GA) and mitochondria. $\times 13000$

Ryc. 21. Hodowla hipokampa, 15 DIV. Dojrzała komórka piramidowa z obfitą cytoplazmą zawierającą liczne kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), dobrze rozwinięty aparat Gołgiego (GA) oraz mitochondria. Pow. 13000 \times

revealed typical for adult tissue ultrastructural characteristics. The neuropil was composed of densely packed neuronal and glial cell processes with numerous synapses. The axo-adendritic and axo-spinous synapses formed still the most common type, but axo-somatic junctions were also frequent. The synaptic vesicles in the presynaptic endings were usually round, small and clear (Fig. 22). Among them a few large, electron-lucent or dense core vesicles could

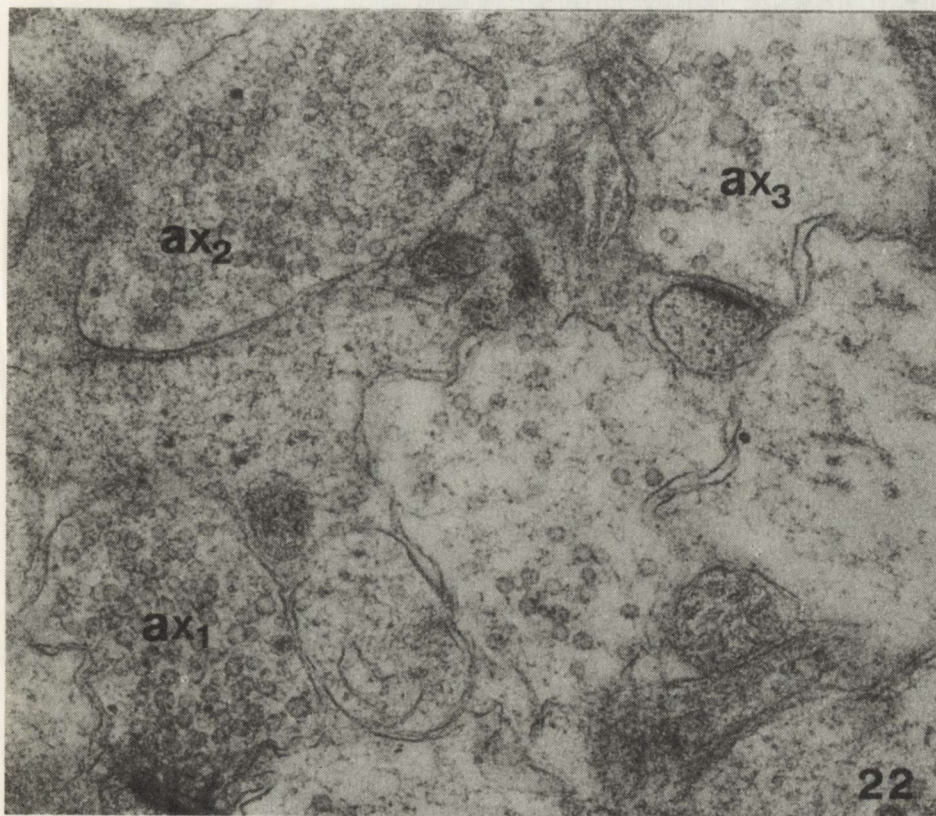
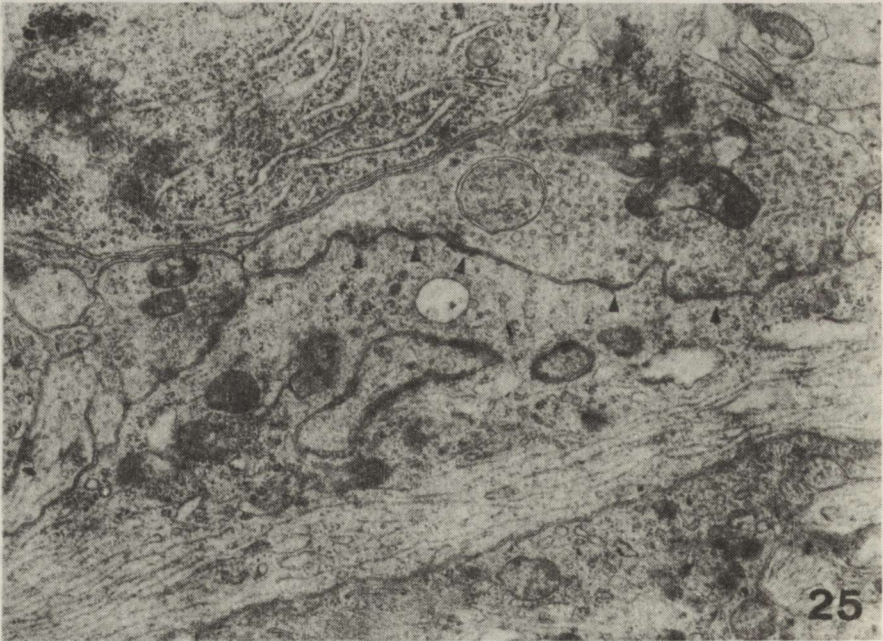
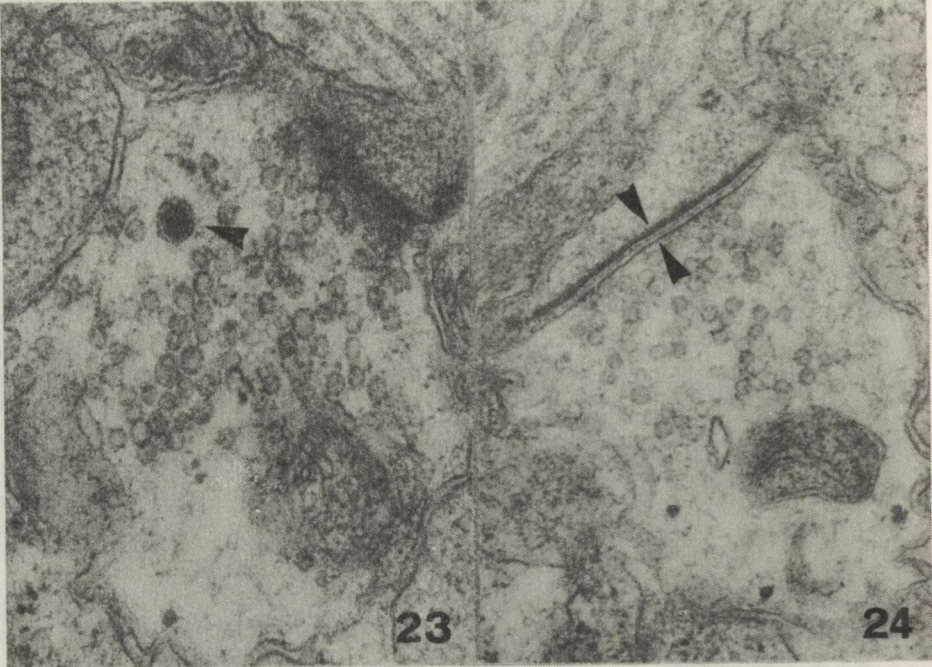


Fig. 22. Hippocampal culture, 15 DIV. Axon terminals (ax_1 , ax_2) filled with numerous small, round and clear synaptic vesicles. One of the boutons (ax_3) contains a few large, pleomorphic vesicles. $\times 48\ 000$

Ryc. 22. Hodowla hipokampa, 15 DIV. Zakończenia aksonalne (ax_1 , ax_2) wypełnione licznymi małymi okrągłymi, jasnymi pęcherzykami synaptycznymi. Jedna kolbka (ax_3) zawiera pojedyncze duże, pleomorficzne pęcherzyki. Pow. $48\ 000 \times$

be observed (Fig. 23). Both symmetric and asymmetric junctions were distinguished, although asymmetric axo-spinous contacts predominated. The synaptic cleft in the synapses became relatively large, postsynaptic densities were thick, but the length of the synaptic contact zone still varied (Fig. 24). A few mossy fiber terminals were also found. These large presynaptic profiles were densely packed with numerous small or large round vesicles and formed multiple asymmetric synaptic connections (Fig. 25). Axo-axonal synapses were observed only occasionally. No distinct dendro-dendritic junctions could be found.



DISCUSSION

The present study demonstrated that organotypic cultures of the hippocampus, devoid of all afferent fibres including inputs from septum and contralateral hippocampus, were capable of developing and forming different types of neuronal connections similarly as in normal postnatal development *in vivo*. During the first days *in vitro* two principal types of nerve cells corresponding to pyramidal and granule cells could be observed. On the following days nerve cells increased in volume and contained more abundant organelles revealing ultrastructural characteristics of mature neurons described previously in studies performed both *in vivo* and *in vitro* (Hamlyn 1962; De Boni et al. 1984). Synaptic junctions in the early cultures seemed immature displaying irregular shapes of pre and postsynaptic profiles, slightly pronounced membrane densities, thin synaptic clefts and a paucity of synaptic vesicles. These features were also observed in other developing neocortical areas during the first few days of postnatal life (Blue, Parnavelas 1983). It is noteworthy that in our youngest cultures growth cones were seen very rarely so they could not represent the earliest sign of synaptogenesis as was previously suggested (Zhabotinski et al. 1979). During the following stages of development *in vitro* synaptic contacts were characterized by prominent thickenings of membrane densities and an increasing number of synaptic vesicles. In well differentiated cultures, after 2 weeks of cultivation the ultrastructural picture of synapses faithfully corresponded to that of mature synapses described both *in vivo* and *in vitro* (Laatsch, Cowan 1966; LaVail, Wolf 1973; Gähwiler 1981b; Gähwiler, Dreifuss 1982; De Boni et al. 1984). Axonal and dendritic shafts also exhibited normal morphological characteristics as was observed in previously performed studies (Gähwiler 1984; Zimmer, Gähwiler 1984). Nevertheless, some differences as compared with the earlier ultrastructural studies have been noticed, concerning mainly the synaptic organization of the hippocampal formation. The most common type of synapses found in our hippocampal cultures at early

Fig. 23. Hippocampal culture, 15 DIV. Axo-spinous synapse. Synaptic vesicles are mostly small and clear. A few granular, dense core vesicles are also seen (arrowhead). $\times 48\ 000$

Ryc. 23. Hodowla hipokampa, 15 DIV. Synapsa akso-kolcowa. Widoczne liczne małe, jasne pęcherzyki oraz pojedyncze pęcherzyki z elektronowo gęstym rdzeniem (strzałka). Pow. $48\ 000 \times$

Fig. 24. Hippocampal culture, 21 DIV. Mature axo-spinous synapse with long area of synaptic contact and wide synaptic cleft (arrowhead). $\times 36\ 000$

Ryc. 24. Hodowla hipokampa, 21 DIV. Dojrzała synapsa akso-kolcowa z rozbudowaną strefą kontaktu synaptycznego oraz szeroką szczeliną synaptyczną (strzałka). Pow. $36\ 000 \times$

Fig. 25. Hippocampal culture, 21 DIV. Large, mossy fiber terminal filled with numerous small and large, clear, round synaptic vesicles. Several synaptic contacts with dendrite (arrowheads). $\times 10\ 000$

Ryc. 25. Hodowla hipokampa, 21 DIV. Zakończenie aksonalne włókna kiciastego wypełnione licznymi małymi i dużymi, jasnymi okrągłymi pęcherzykami synaptycznymi. Kilka połączeń synaptycznych z dendrytem (strzałki). Pow. $10\ 000 \times$

stages of growth *in vitro* was represented by axo-dendritic symmetric contacts, contrary to other studies *in vitro* (Bartlett, Banker 1984b; De Boni et al. 1984). However, it was suggested that some of the symmetric connections could develop asymmetric densities in later stages of maturation (Adinolfi 1972). The symmetric type of synaptic junctions corresponding to Gray's type II (Gray 1959) of synapses was most often associated with inhibitory functions (Andersen 1979; Ribak, Seress 1983). In agreement with other authors, in mature cultures, axo-spinous asymmetric synapses distinctly predominated and the number of axo-spinous synapses increased markedly during the 2-nd and 3-rd week *in vitro*. It seems that this could be related to the formation of spines on dendritic branches during morphological maturation (Westrum et al. 1980; Miller, Peters 1981). Axo-somatic synapses were observed more often in older cultures and they were exclusively of symmetric character. The distribution of synaptic contacts in older cultures forming symmetric junctions on cell somata and predominating asymmetric contacts on dendritic spines or trunks demonstrated in the present study, corresponded to those seen in the hippocampus *in situ* and in long-term dissociated or organotypic cultures performed in roller tubes (DeLong 1970; Gottlieb, Cowan 1972; Kim 1973; Bartlett, Banker 1984a, b). It was also demonstrated in the present study that sometimes individual presynaptic boutons formed synaptic connections with several dendritic processes or spines, moreover, typical mossy fiber terminals were found, which are especially abundant in hippocampal transplants and slice cultures which lost afferent contacts (Blackstad 1961; Hamlyn 1962; Goldowitz et al. 1982; Zimmer, Gähwiler 1984, Frotscher, Zimmer 1986). The variety of synaptic junctions developing in tissue culture conditions suggests a possibility that these synapses may be formed by axons of intrinsic hippocampal neurons. It was furthermore previously documented that after intracerebral transplantation of newborn rat *fascia dentata*, granule cells also developed dendritic and axonal processes corresponding to those present *in situ* and intrinsic connections appeared in the absence of extrinsic afferents (Zimmer et al. 1983; Frotscher, Zimmer 1986).

The present study evidenced that the development of the neonate rat hippocampal formation in organotypic tissue culture mimics the neuronal and synaptic maturation *in vivo*. An exceptionally large number of synapses of various characteristics encountered in the hippocampal formation *in vitro*, compare to the other brain structures cultured, provides a useful model for further investigations.

DYNAMIKA ROZWOJU HIPOKAMPA W WARUNKACH ORGANOTYPOWEJ HODOWLI TKANKOWEJ

Streszczenie

Celem badań była charakterystyka obrazu ultrastrukturalnego komórek nerwowych oraz połączeń synaptycznych w procesie dojrzewania i różnicowania hipokampa szczura w hodowli organotypowej.

Wykazano, że hipokamp *in vitro*, pozbawiony włókien aferentnych, zachowuje zdolność do różnicowania neuronów na komórki piramidowe i ziarniste oraz do tworzenia różnego typu połączeń synaptycznych. Proces różnicowania i dojrzewania neuronów przebiega analogicznie do procesu dojrzewania tkanki *in situ*. W młodych hodowlach hipokampa obserwowano przede wszystkim niedojrzałe synapsy akso-dendrytyczne o słabo wykształconych, symetrycznych zagęszczeniach pre- i postsynaptycznych. W późniejszym okresie wzrostu *in vitro*, obok symetrycznych i asymetrycznych synaps akso-dendrytycznych, występowały bardzo liczne asymetryczne synapsy akso-kolcowe. Ponadto stwierdzono obecność pojedynczych połączeń akso-somatycznych. W miarę dojrzewania synaps obserwowano zwiększoną ilość pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach aksonalnych, wyraźne zagęszczenia błonowe oraz poszerzenia szczeliny synaptycznej.

Przedstawiona w pracy niezwykła różnorodność połączeń synaptycznych hipokampa *in vitro* pozwala na wykorzystanie modelu hodowli tkankowej do dalszych badań nad wpływem różnych czynników patologicznych na rozwój i obraz morfologiczny komórek nerwowych i ich połączeń.

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ГИППОКАМПА В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

Исследовалась ультраструктура нервных клеток и синаптических связей в процессе созревания и дифференцировки гиппокампа крысы в органотипической культуре. Обнаружено, что гиппокамп *in vitro*, лишенный афферентных волокон, сохраняет способность к дифференцировке нейронов на клетки-зерна и пирамидные, а также к образованию синаптических связей разного типа. Процесс дифференцировки и созревания нейронов и их связей *in vitro* протекает сходно с процессом созревания ткани *in situ*. В молодых культурах гиппокампа наблюдались прежде всего незрелые аксо-дендритические синапсы со слабо сформированными симметричными пре- и пост- синаптическими уплотнениями. В более позднем периоде роста *in vitro*, наряду с симметричными и несимметричными аксо-дендритическими синапсами, были видны многочисленные несимметричные аксо-шипи-ковские синапсы. Кроме того, обнаружены единичные аксо-соматические связи. По мере созревания синапсов наблюдалось увеличение количества синаптических пузырьков в аксональных окончаниях, отчетливые мембранные уплотнения и расширение синаптической щели.

Обнаруженное в настоящей работе необычайное разнообразие синаптических связей гиппокампа *in vitro*, позволяет использовать модель культуры ткани в дальнейших исследованиях влияния разных патологических факторов на развитие и морфологическую картину нервных клеток и их связей.

REFERENCES

1. Adinolfi A. M.: The organisation of paramembranous densities during postnatal maturation of synaptic junctions in the cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, 1972, 34, 383—393.
2. Andersen P.: Factors influencing functional connectivity during hippocampal development. *Prog. Brain Res.*, 1979, 51, 139—147.
3. Bartlett W. P., Banker G. A.: An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.*, 1984a, 4, 1944—1953.
4. Bartlett W. P., Banker G. A.: An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.*, 1984b, 4, 1954—1965.

5. Blackstad T. W.: Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibres. *J. Comp. Neurol.*, 1961, 117, 133–159.
6. Blue M. E., Parnavelas J. G.: The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J. Neurocytol.*, 1983, 12, 599–616.
7. Dam A. M.: Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia*, 1980, 21, 617–629.
8. De Long G. R.: Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures. *Dev. Biol.*, 1970, 22, 563–583.
9. De Boni V., Chong A. A., Hawthorn L. A.: Organotypic development of neonate rabbit hippocampus in roller tube culture. *Acta Neuropathol.*, (Berl.) 1984, 65, 53–61.
10. Ekström D. K. J., Diemer N. H.: Complete cerebral ischemia in the rat: an ultrastructural and stereological analysis of the distal stratum in the hippocampal CA₁ region. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1982, 8, 197–215.
11. Frotscher M., Zimmer J.: Intracerebral transplants of the rat fascia dentata: a Golgi/electron microscopic study of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 1986, 246, 181–190.
12. Gähwiler B. H.: Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci Methods.*, 1981a, 4, 329–342.
13. Gähwiler B. H.: Morphological differentiation of nerve cells in thin organotypic cultures derived from rat hippocampus and cerebellum. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)* 1981b, 211, 287–290.
14. Gähwiler B. H., Dreifuss J. J.: Multiple actions of acetylcholine on hippocampal pyramidal cells in organotypic explant cultures. *Neuroscience*, 1982, 7, 1243–1256.
15. Gähwiler B. H.: Development of the hippocampus *in vitro*. Cell types, synapses and receptors. *Neuroscience*, 1984, 11, 751–760.
16. Goldowitz D., Seiger A., Olson L.: Anatomy of the isolated area dentata grown in the rat anterior eye chamber. *J. Comp. Neurol.*, 1982, 208, 382–400.
17. Gottlieb D. J., Cowan W. M.: On the distribution of axonal terminals containing spheroidal and flattened synaptic vesicles in the hippocampus and dentate gyrus of the rat and cat. *Z. Zellforsch.*, 1972, 129, 413–429.
18. Gray E. G.: Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.*, 1959, 93, 420–433.
19. Hamlyn L. H.: The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J. Anat.*, 1962, 96, 112–126.
20. Kim S. V.: Morphological development of neonatal mouse hippocampus cultured *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 1973, 41, 150–162.
21. Laatsch R. H., Cowan W. M.: Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 128, 359–396.
22. LaVail J. H., Wolf M. K.: Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampal formation. *Am. J. Anat.*, 1973, 137, 47–66.
23. Meldrum B., Brierley J. B.: Neuronal loss and gliosis in the hippocampus following repetitive epileptic seizures induced in adolescent baboons by allylglycine. *Brain Res.*, 1972, 48, 361–365.
24. Meldrum B. S., Brierley J. B.: Prolonged epileptic seizures in primates: ischemic cell changes and its relation to ictal physiological events. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1973, 28, 10–47.
25. Miller M., Peters A.: Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi – electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.*, 1981, 203, 555–573.
26. Perkins M. N., Stone T. W.: Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Neurol.*, 1985, 88, 570–579.
27. Purpura D. P., Pappas G. D.: Structural characteristics of neurons in the feline hippocampus during postnatal ontogenesis. *Exp. Neurol.*, 1968, 22, 379–393.
28. Ribak Ch. E., Seress L.: Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J. Neurol.*, 1983, 12, 577–597.

29. Zhabotinski Y. M., Chumasov E. J., Chubakov A. R., Konovalov H. V.: Development of synaptic structure and function in organotypic cultures of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 1979, 4, 913–920.
30. Zimmer J., Laurberg S., Sunde N.: Neuroanatomical aspects of normal and transplanted hippocampal tissue. In: *Neurobiology of the hippocampus*. Ed. W. Seifert, Academic Press, London, New York. 1983, pp 39–64.
31. Zimmer J., Gähwiler B. H.: Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.*, 1984, 228, 432–446.
32. Westrum L. E., Hughjones D., Gray E. G., Barron J.: Microtubules, dendritic spines and spine apparatus. *Cell Tissue Res.*, 1980, 208, 171–181.

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

KOMUNIKATY

W dniach 1–2 czerwca 1989 r. odbędzie się w Reykjavíku (Islandia) Sympozjum na temat „Wirus a mózg”, zorganizowane przez Skandynawskie Towarzystwo Wirusologów oraz Skandynawskie Towarzystwo Neuropatologiczne.

Szczegółowe informacje zostaną przesłane osobom, które zgłoszą swoje uczestnictwo.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Virus and the Brain attn. Dr G. Georgsson, Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Box 8540, 128 Reykjavik, Iceland

*

W okresie od 25 do 29 czerwca 1989 r. odbędzie się w Pradze Kongres Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologii Dziecięcej.

Głównymi tematami Kongresu będą:

- leczenie padaczki wczesnego okresu dziecięcego,
- intensywne opiece w neurologii dziecięcej,
- leczenie urazów we wczesnym okresie dziecięcym,
- doniesienia wolne.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Association of Czechoslovak Medical Societies J. E. Purkyně, E.F.C.N.S., P.O. Box 88, CS – 120 26 PRAHA 2

*

W okresie od 9 do 13 października 1989 r. odbędzie się w New Delhi IX Międzynarodowy Kongres Neurochirurgii.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Prof. A. K. Banerji, Organizing Secretary, Post Office Box No. 4543 New Delhi, 110016, India

Kongres ten poprzedzi XVIII Międzynarodowy Kongres Padaczki (18–22 października 1989) oraz XIV Światowy Kongres Neurologii (22–27 października 1989). O obu tych kongresach, które odbędą się również w New Delhi, informowaliśmy uprzednio.

Jerzy Dymecki

BARBARA GAJKOWSKA, ROMAN GADAMSKI, ELŻBIETA WAWRZYNIAK

WPŁYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOKRWIENIA NA ULTRASTRUKTURĘ ZAKRĘTU HIPOKAMPA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH.

CZEŚĆ I. ULTRASTRUKTURALNA CHARAKTERYSTYKA ODCINKA CA₁ ROGU
AMONA ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM OBRAZU POŁĄCZEŃ SYNAPTY-
CZNYCH

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

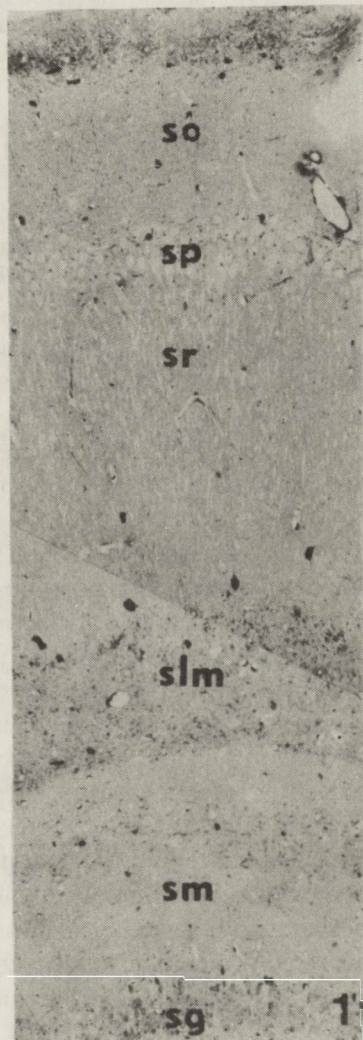
Krótkotrwały incydent niedokrwienny (5–7,5 min), wywołany obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych, prowadzi u chomików mongolskich do głębokich zmian patologicznych, których następstwem jest rozpad komórek piramidowych odcinka CA₁ rogu Amona (Suzuki i wsp. 1983 a; Mossakowski, Gadamski 1987a, b). Proces ten ujawniający się z kilkudniowym opóźnieniem, w stosunku do epizodu niedokrwiennego, poprzedzony jest względnie długim okresem bioelektrycznej hiperaktywności komórek piramidowych pola CA₁ (Suzuki i wsp. 1983b). Pobudzeniu tej grupy neuronów towarzyszą zmiany w zużyciu glukozy (Suzuki i wsp. 1983a) i tlenu (Śmiałek 1975).

Mimo nagromadzenia w piśmiennictwie danych pozwalających na lepsze rozumienie przyczyn poniedokrwiennego rozpadu komórek nerwowych odcinka CA₁, istota tego procesu nie została dotychczas dostatecznie poznana. Wydaje się, że w odmiennej reakcji neuronów CA₁ na niedokrwienie, istotną rolę mogą odgrywać szczególne właściwości ich połączeń synaptycznych. Opisana przez Suzuki i wsp. (1983b) zwiększona aktywność tych neuronów może wiązać się ze szczególnym rodzajem występujących tutaj synaps, a zwłaszcza z rodzajem zawartych w nich neuroprzekaźników. Z badań innych autorów (Westrum, Blackstad 1962; Hamlyn 1963; Andersen i wsp. 1966) wiadomo, że pobudzająca lub hamująca funkcja połączenia synaptycznego znajduje swoje odbicie w morfologicznej budowie kolbki synaptycznej. Podobnie, kształt i wielkość pęcherzyków synaptycznych mogą stanowić pośrednią informację o rodzaju zawartego w nich neuroprzekaźnika. Wychodząc z powyższych danych w niniejszej pracy postanowiono ocenić ultrastrukturę połączeń

w poszczególnych, wyróżnianych anatomicznie warstwach hipokampa leżących na wysokości odcinka CA₁ tj. w *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiale*, *stratum lacunosum-moleculare* i *stratum moleculare*.

MATERIAŁ I METODA

Do badań użyto 5 zdrowych, około 3-miesięcznych chomików mongolskich, którym w narkozie eterowej wykonywano przezsercową perfuzję aldehydem glutarowym. Wyjęte mózgi krojono w płaszczyźnie czołowej na bloczki grubości około 2 mm. Z grzbietowej części formacji hipokampalnej pobierano wycinki tkanki, kształtem zbliżone do prostopadłościanu opartego



z jednej strony o komorę boczną mózgu, a z drugiej o *stratum polimorphum* zawoju zębatego. Następnie bloczki te, cały czas zanurzone w glutaraldehydzie, sekcjonowano za pomocą mikroskopu operacyjnego na mniejsze fragmenty zwracając baczna uwagę, ażeby każdy z tych fragmentów zawierał wszystkie warstwy hipokampa łącznie z warstwą komórek ziarnistych (*stratum granulosum*) zawoju zębatego.

Tak pobrany materiał utrwalano dodatkowo przez 1 godz. w 2,5% aldehydzie glutarowym, płukano w buforze kakodylanowym (1 godz.), utrwalano w OsO₄ (1 godz.) i odwadniano w roztworach alkoholu o wzrastającym stężeniu i w tlenku propylenu. Z każdego bloczka tkankowego, zatopionego w Eponie 812, cięto skrawki półciemkie i barwiono je błękitem toluidyny. Na podstawie analizy struktury morfologicznej skrawków w mikroskopie świetlnym, bloczki odpowiednio trymowano i krojono je na ultramikrotomie LKB „NOVA” uzyskując tym sposobem siatki z 5 kolejnych warstw zakrętu hipokampa tj. *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiale*, *stratum lacunosum moleculare* i *stratum moleculare* (ryc. 1). Skrawki kontrastowano w wodnym roztworze octanu uranylu i cytrynianu ołowiu. Materiał oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEOL 100 C.

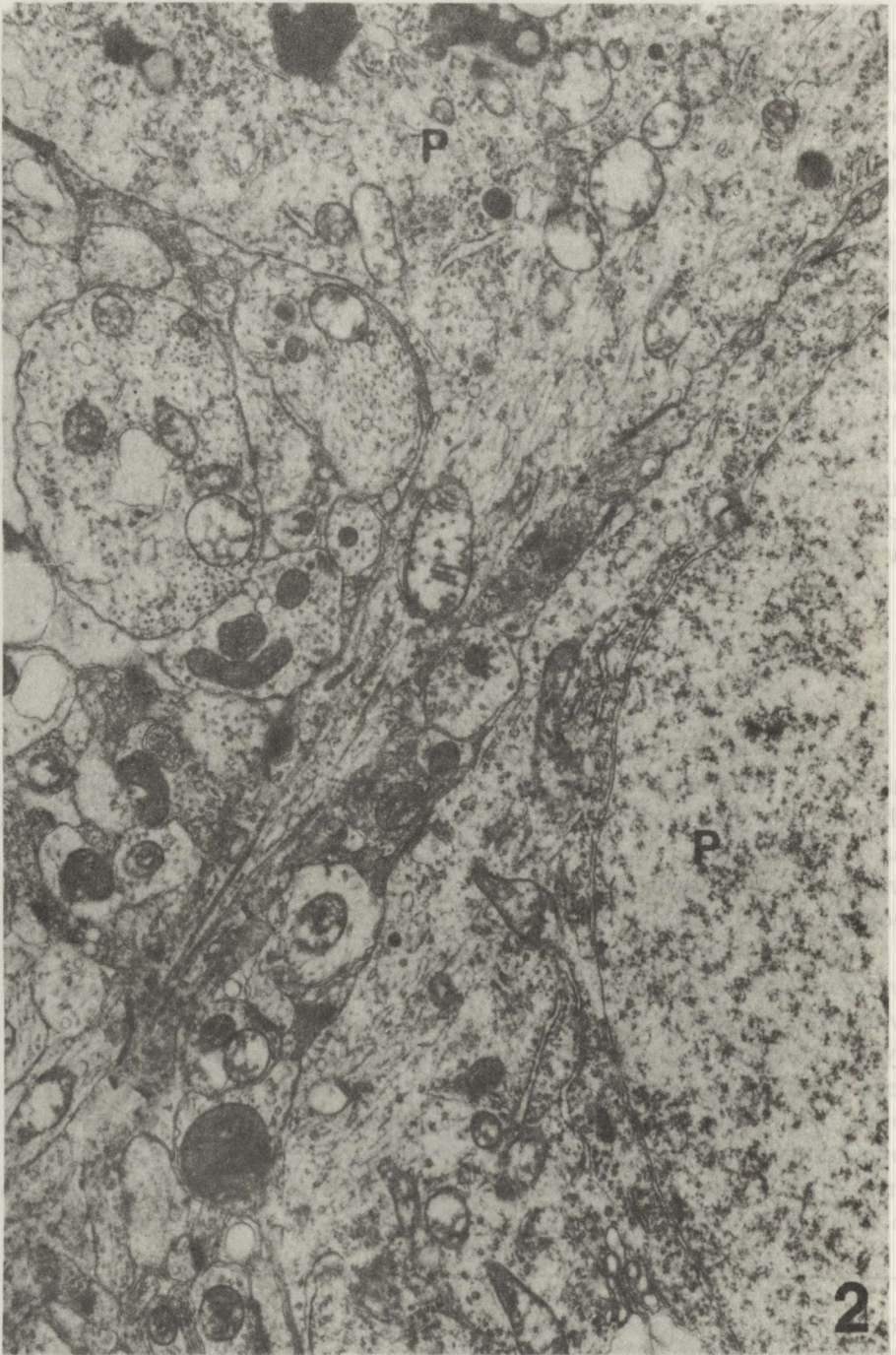
WYNIKI

Stratum pyramidale. Warstwa ta jest zbudowana z gęsto obok siebie ułożonych owalnych neuronów z dużym, okrągłym jądrem wypełnionym chromatyną. Cytoplazma tych neuronów ma obfitą siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą oraz cytoskeleton (ryc. 2). Powierzchnia komórek nerwowych warstwy piramidowej, a także przykomórkowe części dendrytów są gęsto pokryte synapsami, w przeważającej mierze typu symetrycznego (ryc. 3, 4).

Wśród synaps typu symetrycznego pokrywających ciała neuronów, można wyróżnić powtarzające się postacie morfologiczne. Stosunkowo najczęściej widywane są synapsy o kształcie owalnym lub nieregularnym z ciemną cytoplazmą, zawierającą liczne, drobne pęcherzyki synaptyczne kształtu okrągłego i owalnego, wypełnione substancją elektronowo-przezierną (ryc. 3, 4, 5) oraz synapsy okrągłe lub owalne zawierające mniejszą ilość okrągłych, przeziernych pęcherzyków synaptycznych, nieregularnie rozmieszczonych w jasnej cytoplazmie. Towarzyszą im także pojedyncze obłonione ziarnistości o elektronowo gęstym rdzeniu oraz mitochondria (ryc. 3, 5); większe od

Ryc. 1. Przekrój czołowy grzbietowej części hipokampa. Widoczna budowa warstwowa: so — *str. oriens*, sp — *str. pyramidale*, sr — *str. radiale*, slm — *str. lacunosum moleculare*, sm — *str. moleculare*, sg — *str. granulare*. Skrawek półciemki. Błękiet toluidyny. Pow. 60 ×

Fig. 1. Frontal section of dorsal part of hippocampus. Layered structure is visible: so — *stratum oriens*, sp — *str. pyramidale*, sr — *str. radiale*, slm — *str. lacunosum moleculare*, sm — *str. moleculare*, sg — *str. granulare*. Semithin section. Toluidine blue. × 60



Ryc. 2. *Str. pyramidale*. Fragmenty dwóch blisko siebie położonych komórek piramidowych (P). Zwraca uwagę obfita ilość elementów cytoskeletonu i organelli w cytoplazmie. Pow. 15 300 ×
 Fig. 2. *Str. pyramidale*. Fragments of two close-lying pyramidal cells (P). Note abundance of cytoskeleton elements and organelles in cytoplasm. × 15 300



Ryc. 3. *Str. pyramidale*. Pomiędzy fragmentami dwóch komórek piramidowych (P) obecne są dwa typy synaps symetrycznych (S): o ciemnej cytoplazmie i o jasnej cytoplazmie z pojedynczymi ziarnistościami elektronowo-gęstymi. Pow. 49 470 ×

Fig. 3. *Str. pyramidale*. Between fragments of 2 pyramidal cells (P) two types of symmetric synapses (S) are visible. One of them with electron-dense cytoplasm, another one with electron-lucent cytoplasm with singular granule with electron-dense core. × 49 470

poprzednich synapsy owalne o jasnej cytoplazmie, zawierają równomiernie rozmieszczone okrągłe, elektronowo-przeziernie pęcherzyki synaptyczne oraz pęcherzyki większe, elektronowo-przeziernie (ryc. 4, 5). W synapsach tych widoczne są liczne mitochondria. Cechą charakterystyczną wszystkich postaci synaps symetrycznych jest występowanie w nich kłaczkowatych włókienek, stanowiących elementy cytoskeletonu.

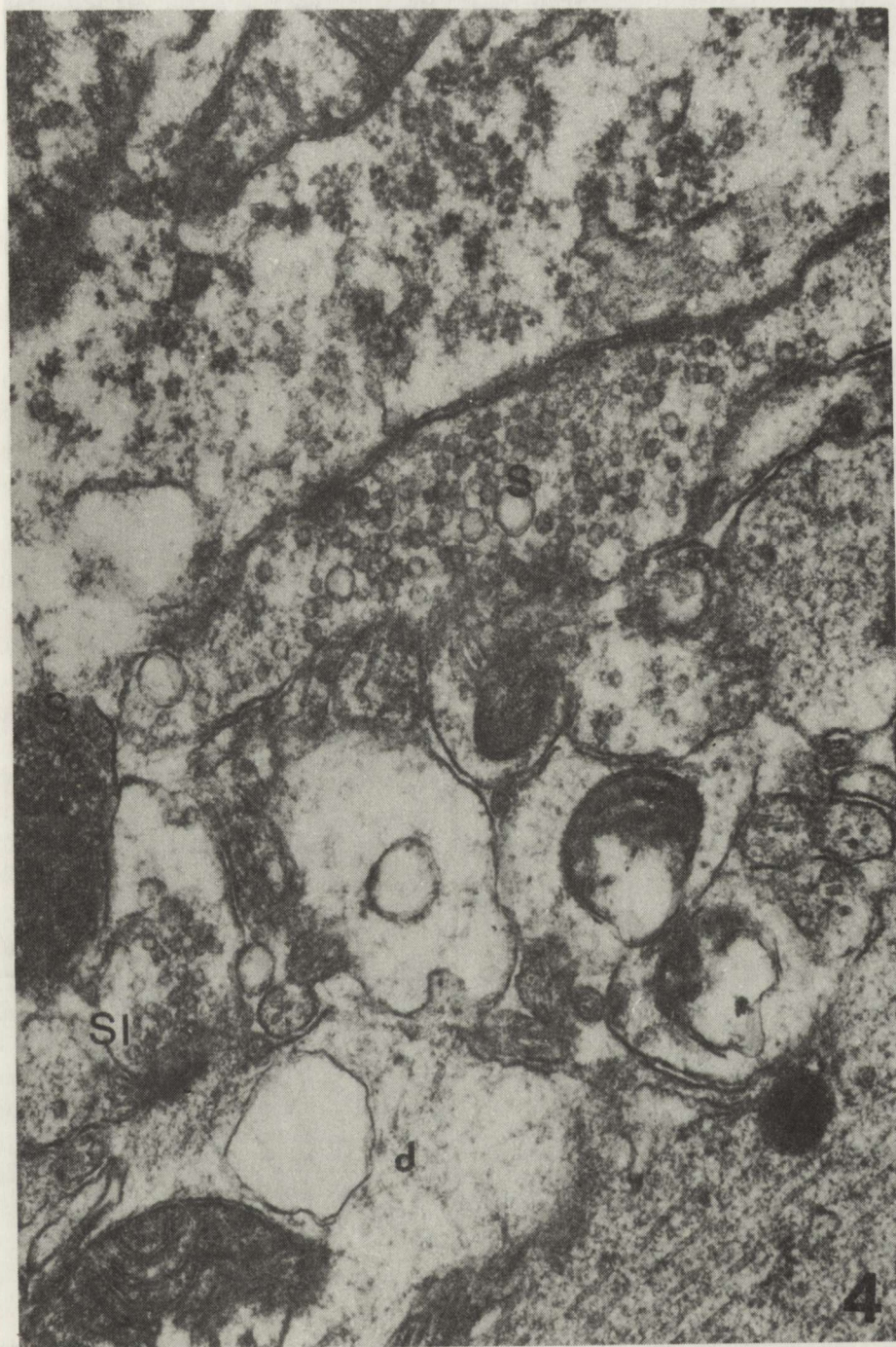
Synapsy typu asymetrycznego leżą zazwyczaj w pewnym oddaleniu od perykarionów neuronów, najliczniej przylegają do kolców dendrytycznych. Podobnie, duża ilość synaps asymetrycznych jest rozszana ponad drzewkowato rozgałęziającymi się dendrytami (ryc. 5, 6). Synapsy typu asymetrycznego mają kształt nieregularny. Zawierają one jasną cytoplazmę oraz liczne, elektronowo-przeziernie, dość równomiernie rozmieszczone pęcherzyki synaptyczne. W synapsach asymetrycznych, zawierających mniej liczne i nierównomiernie rozmieszczone pęcherzyki widoczne są również delikatne włókienka cytoskeletonu (ryc. 5, 6). Występują one w części presynaptycznej tworząc zagęszczenie w pobliżu szczeliny synaptycznej.

Wśród populacji neuronów warstwy piramidowej spotyka się mniejsze od nich interneurony, posiadające jądra komórkowe nieregularnego kształtu. Rozmieszczenie synaps oraz ich budowa, a także ilość i rozmieszczenie organelli w interneuronach jest podobne do spotykanych w pozostałych komórkach nerwowych warstwy piramidowej (ryc. 7).

Stratum oriens. Warstwa ta zawiera aksony i duże dendryty podstawne komórek piramidowych, aksony komórek ziarnistych oraz zakończenia włókien nerwowych pochodzących ze spoidła zakrętu hipokampa. Znajdują się tutaj także pojedyncze interneurony, których wypustki wchodzi we wzajemne między sobą połączenia, a także tworzą synaptyczne zakończenia na dendrytach komórek piramidowych. Dendryty podstawne tych komórek (ryc. 8) pokryte są dużą ilością synaps typu symetrycznego i asymetrycznego wykazujących identyczną budowę ultrastrukturalną jak synapsy w warstwie piramidowej (ryc. 9).

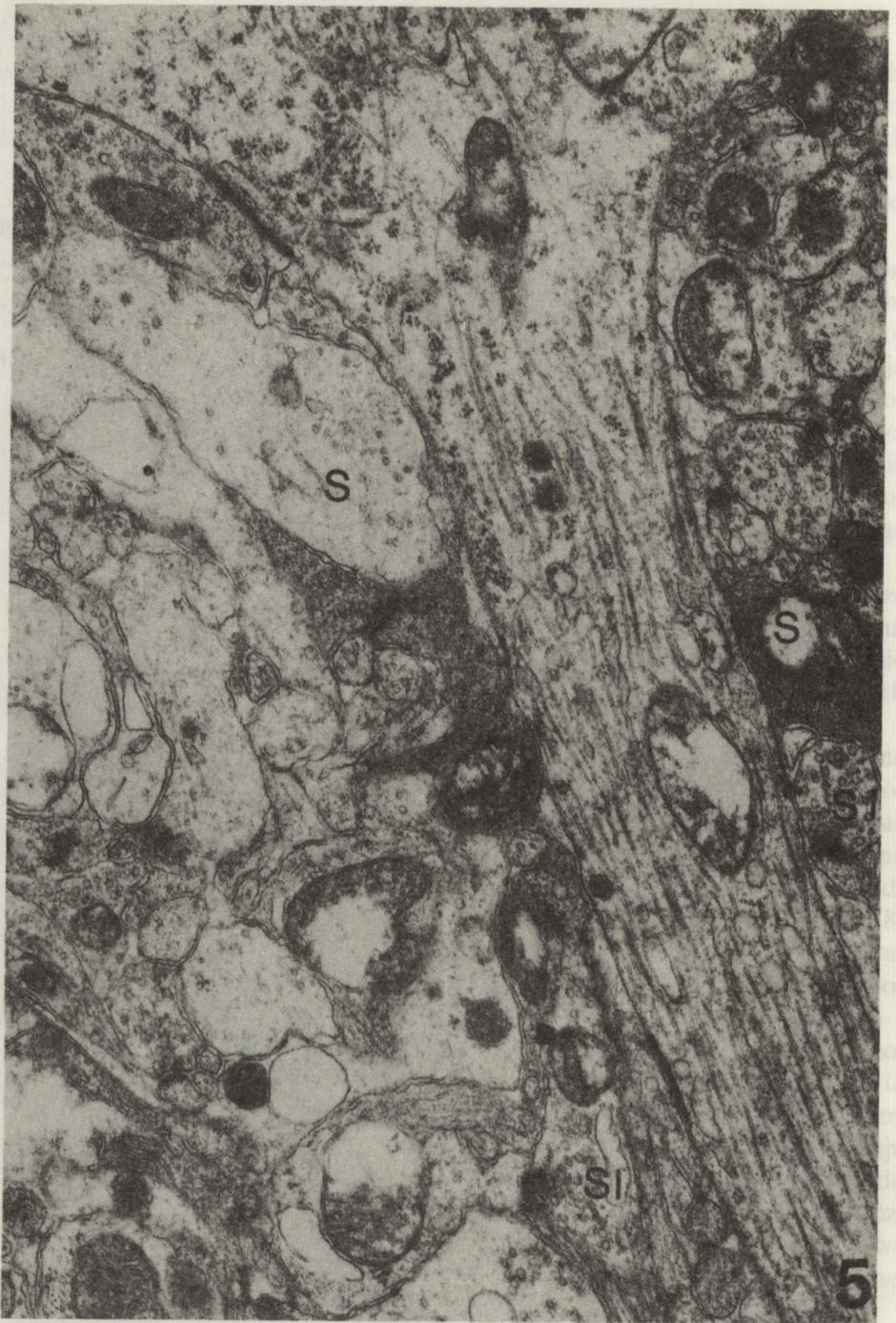
Stratum radiale utworzone jest głównie ze szczytowych dendrytów neuronów warstwy piramidowej oraz z włókien kolaterali Schaffera. Warstwa ta zawiera również synapsy należące do pojedynczo występujących tu interneuronów oraz synaptyczne zakończenia włókien pochodzących z zwoju zębatego. Zdecydowana większość synaps spotykanych w *str. radiale* należy do typu asymetrycznego (ryc. 10), jednakże na dendrytach i kolcach dendrytycznych widoczne są także zakończenia typu symetrycznego (ryc. 11). Budowa morfologiczna synaps znajdujących się w *str. radiale* jest podobna do opisanej w warstwie piramidowej.

Stratum lacunosum moleculare mieści w sobie dendryty szczytowe komórek nerwowych warstwy piramidowej, zakończenia niesymetrycznych włókien spoidłowych, interneurony z ich wypustkami oraz zakończenia włókien kolaterali Schaffera. Interneurony tej warstwy łączą się między sobą za pomocą połączeń synaptycznych typu "en passage" (ryc. 12). Synapsy spotykane w *str.*



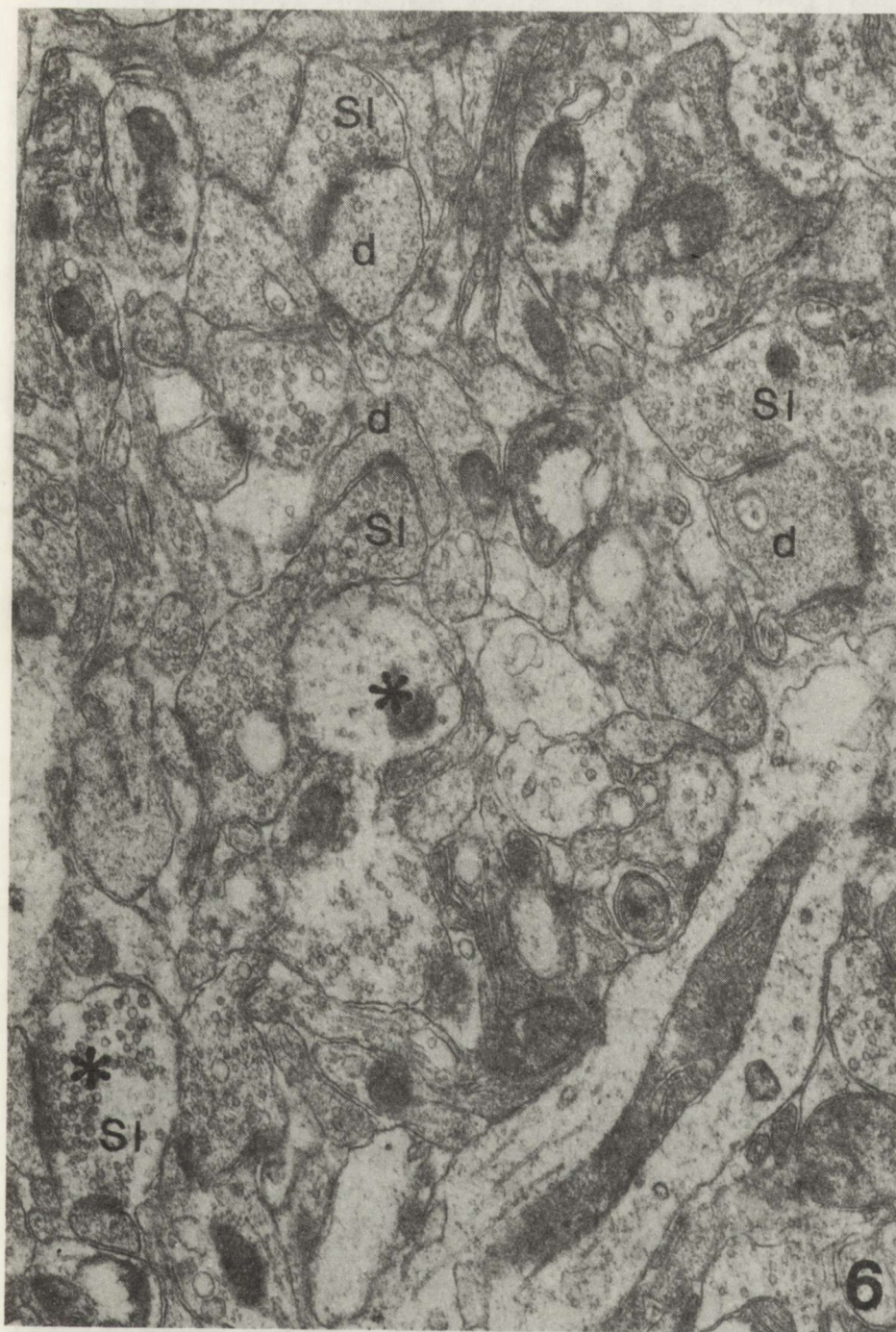
Ryc. 4. *Str. pyramidale*. Fragment komórki piramidowej z dwoma typami synaps symetrycznych (S) oraz synapsa asymetryczna (S₁) na trzonie dendrytycznym (d). Pow. 49 470 ×

Fig. 4. *Str. pyramidale*. Fragment of pyramidal cell with two types of symmetric synapses (S) and asymmetric (S₁) synapse on dendritic shafts (d). × 49 470



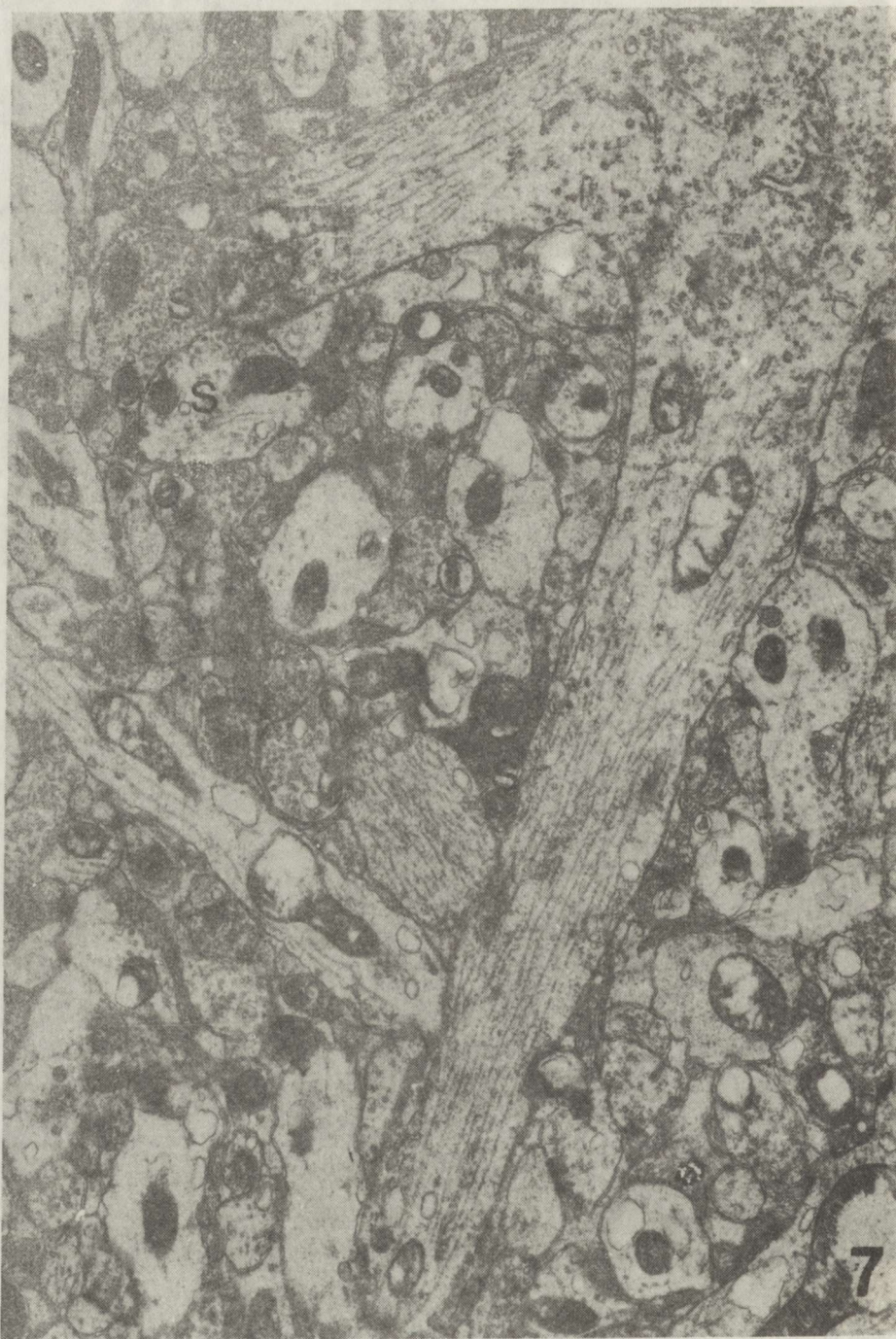
Ryc. 5. *Str. pyramidale*. Fragment wypustki dendrytycznej komórki piramidowej z dużą ilością kontaktów synaptycznych. Widoczne są różne rodzaje morfologiczne synaps symetrycznych (S) i synapsy asymetryczne (S₁). Pow. 30 000 ×

Fig. 5. *Str. pyramidale*. Dendritic sharfs of pyramidal cell densely covered with synapses. Various morphological forms of symmetric synapses (S) and asymmetric ones (S₁) are visible. × 30 000



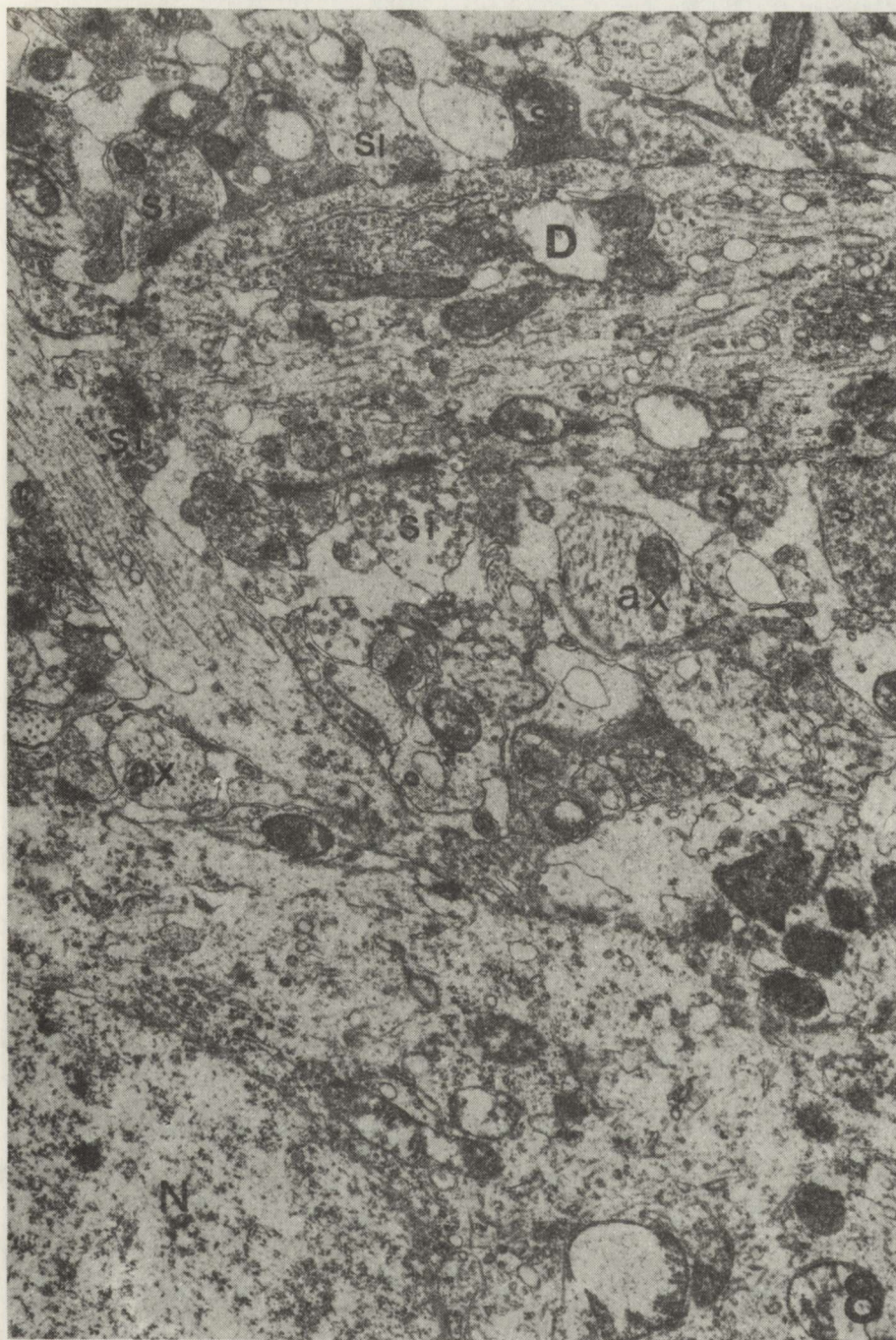
Ryc. 6. *Str. pyramidale*. We fragmencie neuropilu widoczne liczne synapsy asymetryczne (S_1) na kolcach dendrytycznych (d). W synapsach o jaśniejszej cytoplazmie widoczne włókienka cytoskeletonu (gwiazdki). Pow. 30 000 \times

Fig. 6. *Str. pyramidale*. In neuropil fragment numerous asymmetric (S_1) synapses are seen on dendritic spines (d). Synapses with electron-lucent cytoplasm contain filaments of cytoskeleton (asterisks). $\times 30\ 000$



Ryc. 7. *Str. pyramidale*. Dwie wypustki dendrytyczne interneuronu, na których widoczne są synapsy typu symetrycznego (S). Pow. 15 300 ×

Fig. 7. *Str. pyramidale*. Fragment of interneuron with two dendrites on which synapses of symmetric type (S) are seen. × 15 300



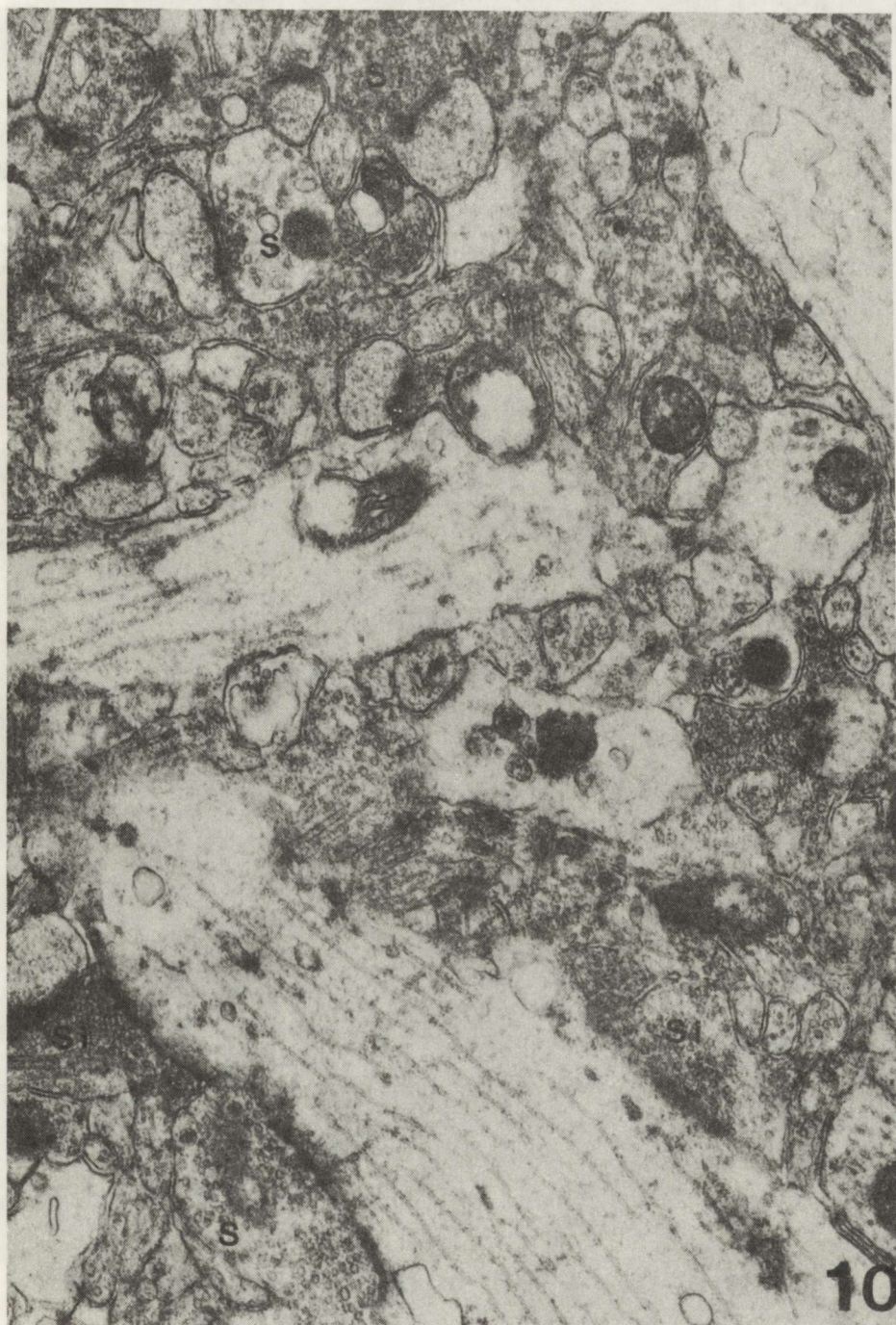
Ryc. 8. *Str. oriens*. Fragment interneuronu (N). Dendryty podstawne (D) komórek piramidowych gęsto pokryte synapsami symetrycznymi (S) i asymetrycznymi (S₁). Widoczne są także przekroje poprzeczne aksonów (ax). Pow. 15 300 ×

Fig. 8. *Str. oriens*. Interneuron fragment (N) and basal dendrites (D) of pyramidal cells densely covered with symmetric synapses (S) and asymmetric ones (S₁). Axon cross-sections profiles (ax) also visible. × 15 300



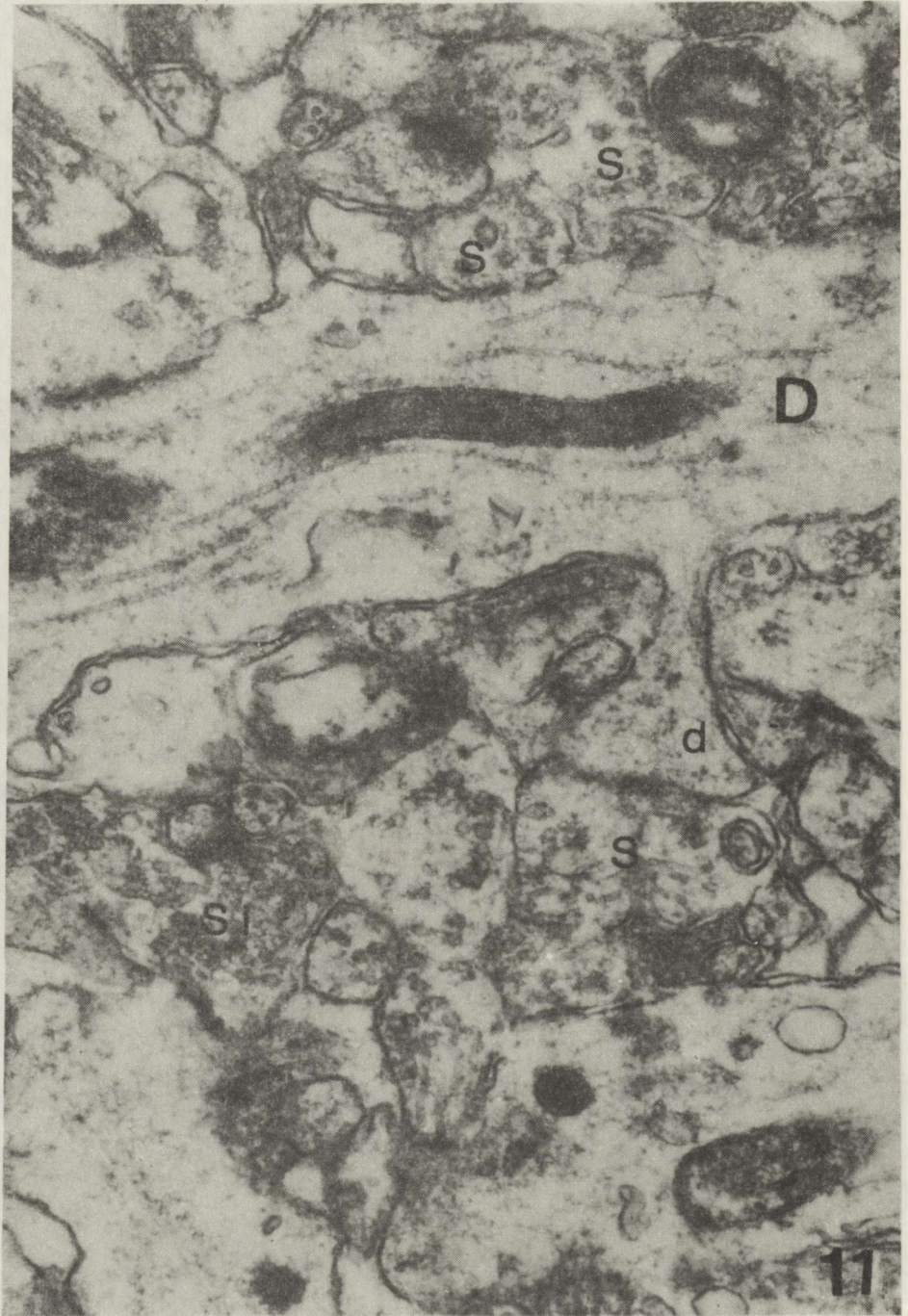
Ryc. 9. *Str. oriens*. Fragment dendrytu podstawnego komórki piramidowej pokrytego dużą ilością synaps symetrycznych (S) i asymetrycznych (S₁). Pow. 30 000 ×

Fig. 9. *Str. oriens*. Basal dendrite fragment of pyramidal cell, covered with large number of symmetric (S) and asymmetric (S₁) synapses. × 30 000



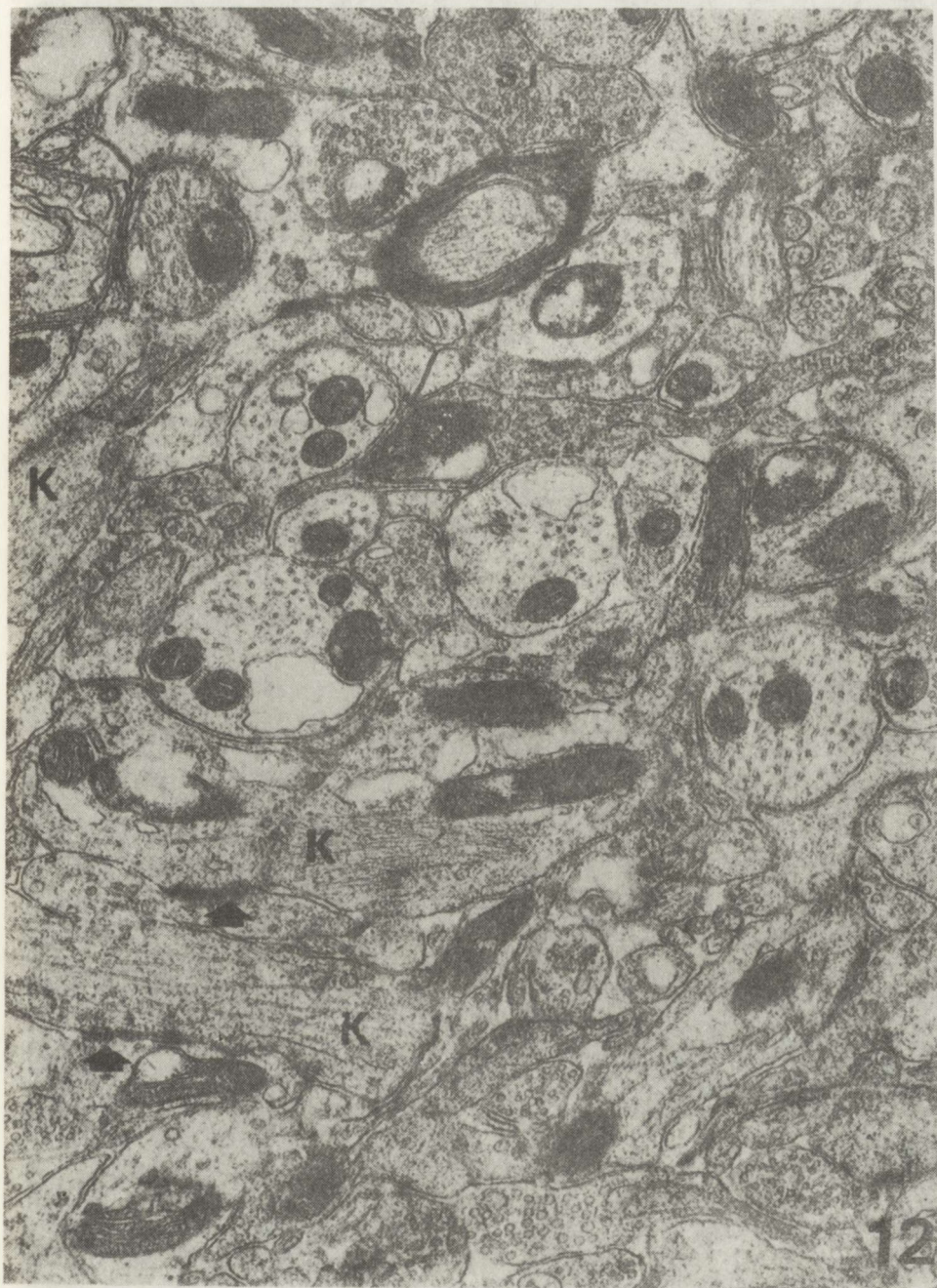
Ryc. 10. Str. radiale. Na dendrytach widoczne są synapsy symetryczne (S) i asymetryczne (S₁).
Pow. 30 000 ×

Fig. 10. Str. radiale. On dendrites symmetric (S) and asymmetric (S₁) synapses are seen. × 30 000



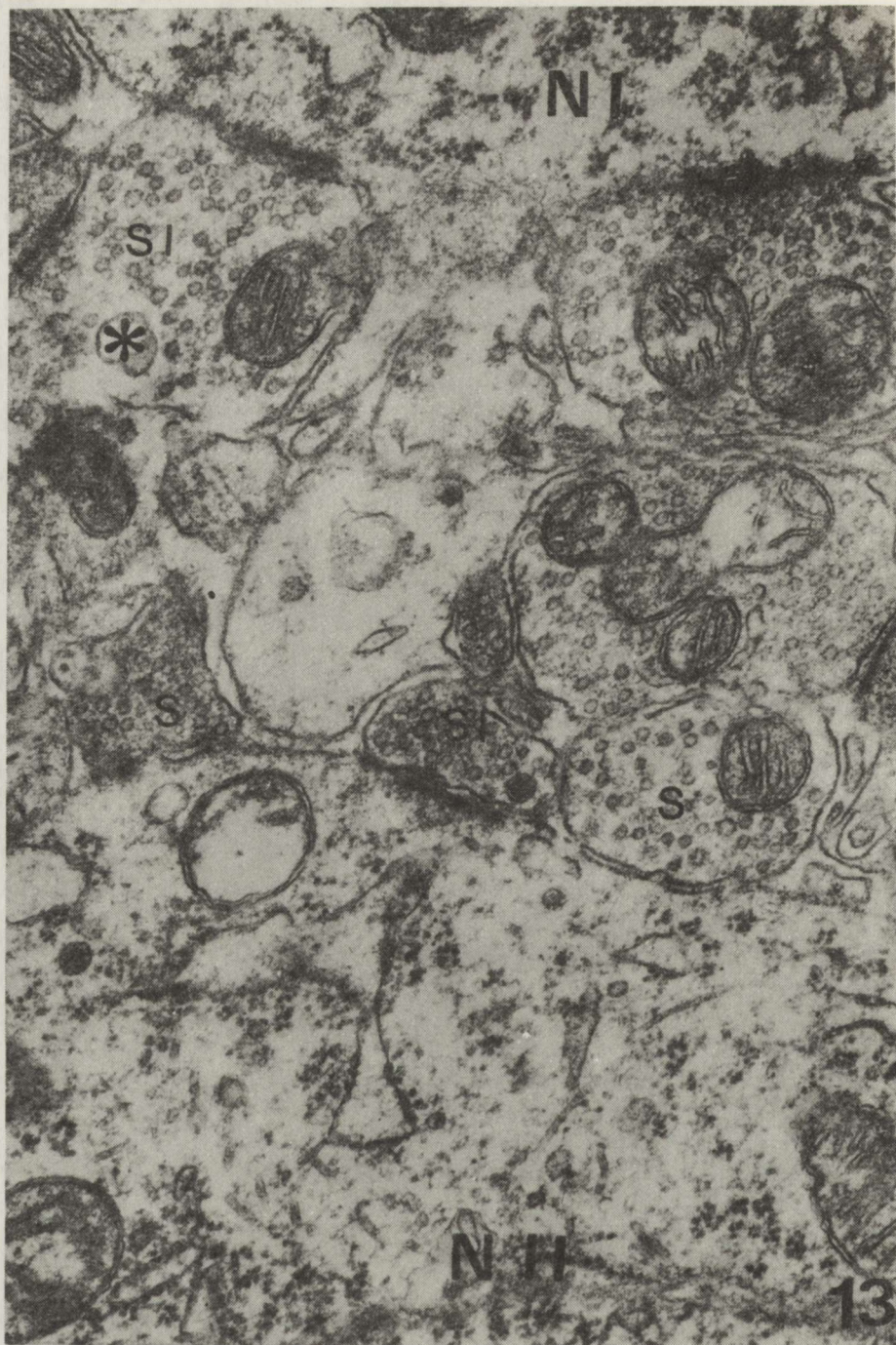
Ryc. 11. *Str. radiale*. Na trzonie (D) i kolcach dendrytycznych (d) widoczne synapsy symetryczne (S). Obecna również synapsa asymetryczna (S_1) na małym dendrycie. Pow. 49 470 ×

Fig. 11. *Str. radiale*. On dendritic sharfs (D) and spines (d) symmetric synapses (S) are visible. One asymmetric synapse (S_1) on small dendrite. × 49 470



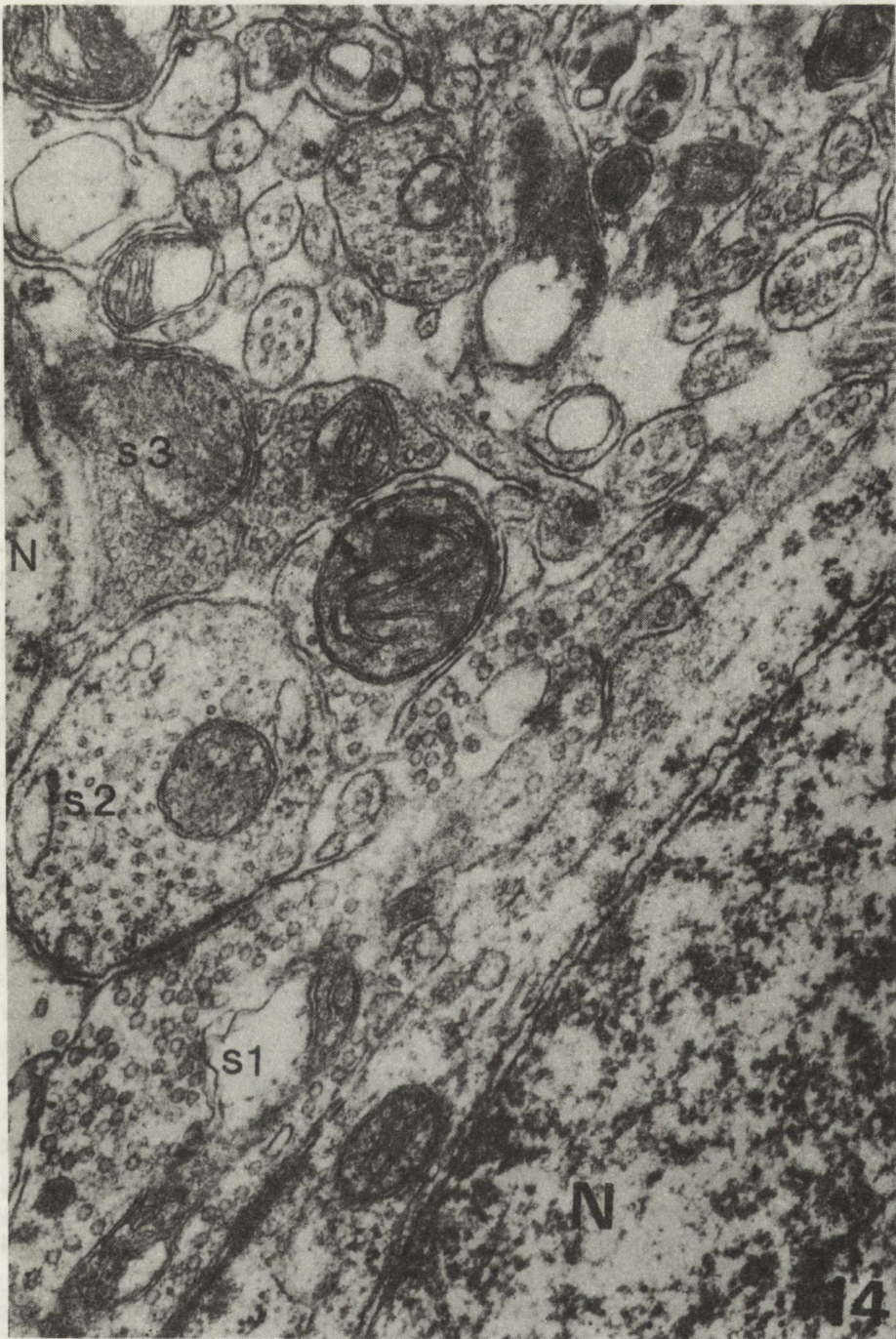
Ryc. 12. *Str. lacunosum moleculare*. Wśród licznych włókien należących do kolaterali Schaffera (K) widoczne są połączenia akso-dendryczne o typie asymetrycznym (S₁) oraz synapsa "en passage" między wypustkami interneuronów (strzałki). Pow. 30 000 ×

Fig. 12. *Str. lacunosum moleculare*. Numerous asymmetrical synaptic (S₁) contacts with axonal endings of Schaffer's collaterales (K), and synapses "en passage" (arrows) between interneuronal cells are present. × 30 000



Ryc. 13. *Str. moleculare*. Na perykarionach dwóch neuronów (N_1 , N_2) widoczne dwa rodzaje synaps — symetryczna (S) i asymetryczna (S_1). Synapsa S_1 zaznaczona gwiazdką posiada podwójny kontakt z perykarionem i dendrytem. Pow. 49470 \times

Fig. 13. *Str. moleculare*. Two kinds of synapses — symmetric (S) and asymmetric (S_1) are visible on perikarya (N_1 , N_2). Synapse marked with asterisk has a double contact with the perikaryon and a dendrite. $\times 49470$



Ryc. 14. *Str. moleculare*. Między dwoma interneuronami (N) widoczne trzy synapsy: S₁, S₂, S₃. Synapsy S₁ i S₃ reprezentują typ symetryczny, S₂ — asymetryczny. Pow. 49 470 ×

Fig. 14. *Str. moleculare*. Three synapses: S₁, S₂, S₃ are visible between two interneurons (N). Synapses S₁ and S₃ represent the symmetric type, S₂ — asymmetric type. × 49 470

lm. należą zarówno do typu symetrycznego, jak i asymetrycznego. Ich budowa morfologiczna nie różni się od opisanej w poprzednich warstwach.

Stratum moleculare. W tej warstwie między dendrytami pochodzącymi od neuronów leżących w *str. pyramidale* oraz innymi elementami morfologicznymi opisanymi poprzednio, znajdują się dodatkowo zakończenia synaptyczne włókien kory entorynalnej. Budowa morfologiczna synaps oraz ich lokalizacja są podobne, jak w warstwach opisanych wyżej (ryc. 13, 14).

OMÓWIENIE

W skład formacji hipokampalnej — *formatio hippocampi* (FH) wchodzi hipokamp właściwy zwany rogiem Amona — *corun Ammonis* (CA), zawój zębaty — *gyrus dentatus s. fascia dentata* (FD) i podpora — *subiculum* (Sub). U zwierząt w FH można wyróżnić część grzbietową leżącą w sąsiedztwie przegrody oraz część brzusznią zawartą w płacie skroniowym. Między nimi znajduje się część pośrodkowa, która bywa określana jako *pars posterior s. splenialis* (Witter 1986). Komórki nerwowe wchodzące w skład FH tworzą dwa, ściśle utkane, charakterystyczne skupiska. Jedno z nich złożone z tzw. neuronów piramidowych tworzy róg Amona, drugie zaś uformowane z komórek ziarnistych jest nazywane zawojem zębatym. W rogu Amona wyróżnia się 4 pola, które według Lorente de No (1934) są określane symbolami CA₁, CA₂, CA₃ i CA₄. Podział ten dokonany na podstawie cech morfologicznych neuronów piramidowych oraz gęstości ich utkania, nie zawsze pozwala na wyodrębnienie pola CA₂. U wielu gatunków zwierząt pole to jest pomijane w anatomicznym opisie struktury CA, aczkolwiek zawartym tutaj neuronom przypisuje się szczególną rolę jako domniemanemu siedlisku wzbudzenia rytmicznych impulsów (Miles i wsp. 1984). Charakterystyczny kształt rogu Amona i zawoju zębatego, a także orientacja wypustek komórek piramidowych i ziarnistych pozwalają na wyodrębnienie w formacji hipokampalnej kilku warstw. Na przekrojach czołowych grzbietowej części FH warstwy te są ułożone w następującej kolejności: *str. oriens*, *str. pyramidale*, *str. radiale*, *str. lacunosum moleculare*, *str. moleculare*, *str. granulare* i *str. polymorphum*. W niniejszej pracy ultrastrukturę połączeń synaptycznych 5 kolejnych warstw badano tylko w tych ich częściach, które swoim zasięgiem odpowiadały ściśle obszarowi pola CA₁. Obok zasadniczych skupisk neuronów piramidowych i ziarnistych w strukturze hipokampalnej występują również inne typy komórek nerwowych nazywanych powszechnie interneuronami. Ich morfologiczne, histochemiczne i fizjologiczne cechy zostały opisane przez Buzsaki (1984). Interneurony spotyka się wśród utkania komórkowego rogu Amona, zawoju zębatego, a także w innych warstwach formacji hipokampalnej, przy czym najliczniejszym ich siedliskiem jest *str. oriens* (Gasanow, Melikow 1986). Większość interneuronów należy prawdopodobnie do układu gabaergicznego aczkolwiek w FH odkryto także peptydoergiczne komórki nerwowe. Większość z nich ze względu na znaczne morfologiczne podobieństwo do neuronów

gabaergicznym jest zaliczana do klasy interneuronów (Leranth, Frotscher 1983; Nunzi i wsp. 1985). Dzięki zastosowaniu metod immunohistochemicznych określono ściśle lokalizację komórek peptydoergicznym, a także dokonano ich podziału na grupy w zależności od rodzaju posiadanego neuropeptydu. Takim sposobem stwierdzono, że neurony zawierające cholecystokininę (CCK) są zlokalizowane w *str. oriens*, *str. pyramidale* i *str. radiale* (Nunzi i wsp. 1985). Ich synaptyczne zakończenia są widoczne na perykarionach, na szczytowych i podstawnych dendrytach komórek piramidowych, a także na innych interneuronach. Oprócz CCK wykryto jeszcze takie neuropeptydy jak: wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), substancję P, neurotensynę, metioninę-enkefalinę i somatotensynę (Roberts i wsp. 1984). Interneurony zawierające VIP są zlokalizowane w *str. radiale* i *str. moleculare* pola CA₁, somatotensynę w *str. oriens*, natomiast neurotensynę, substancję P i metionino-enkefalinę w *str. moleculare*. Stwierdzono również, że wymienione wyżej neuropeptydy działają pobudzająco na komórki piramidowe (Emson 1979; Zieglgansberger i wsp. 1979; Kelly, Dodd 1981; Tielen i wsp. 1981).

Klasyczna kwalifikacja pęcherzyków synaptycznych oraz zakończeń nerwowych w układzie nerwowym kręgowców została przeprowadzona przez Uchizono (1965) i Bodiana (1966). Według tych autorów hamująca lub pobudzająca funkcja synaps jest ściśle związana z kształtem pęcherzyków synaptycznych wypełniających kolbkę synaptyczną. Zgodnie z tym poglądem obecność pęcherzyków okrągłych, elektronowo-przeziernych charakteryzowała synapsy pobudzające określane często symbolem „S”. Pęcherzyki spłaszczone również elektronowo-przeziernie wskazywały natomiast na hamujący charakter czynności synaptycznej. Synapsy te określano symbolem „F”. Wcześniejszy podział dokonany przez Gray'a (1959) wyróżniał synapsy asymetryczne — pobudzające — zaliczane do typu I i synapsy symetryczne — hamujące — zaliczane do typu II. Zgodnie z opisem struktury mikroskopowo-elektronowej pola CA₁ rogu Amona dokonany przez Westruma i Blackstada (1962), Hamlyna (1963) oraz Andersena i wsp. (1966) synapsy typu I Gray'a są zlokalizowane na kolcach i gładkich powierzchniach dendrytów podczas gdy synapsy typu II są rozmieszczone na perykarionach komórek piramidowych.

W przeprowadzonych przez nas badaniach we wszystkich warstwach formacji hipokampalnej leżących na poziomie odpowiadającym obszarowi pola CA₁ spotykano synapsy asymetryczne i symetryczne. Wśród tych ostatnich ze względu na odmienną budowę morfologiczną można było rozróżnić trzy postacie: synapsy posiadające kolbki wypełnione okrągłymi i owalnymi, elektronowo-przeziernymi pęcherzykami, należące prawdopodobnie do grupy synaps gabaergicznym. Przemawia za tym ich morfologiczne podobieństwo do synaps komórek koszyczkowych, w których przekąźnikiem jest kwas gamma-aminomasłowy. W drugiej wyróżnianej przez nas postaci kolbki synaptyczne zawierały elektronowo gęste ziarnistości sugerujące przynależność tych synaps do systemu cholinergicznym. Najliczniej spotykana

postacią synaps symetrycznych były zakończenia wypustek interneuronów peptydoergicznych. Tak więc mimo zachowania charakterystycznej budowy, synapsy symetryczne nie mogą być jednoznacznie rozpatrywane jako hamujące. Istotna funkcja tych synaps zależy od rodzaju zawartego w nich neuroprzekaźnika. Opisane przez nas postacie symetrycznych kolbek synaptycznych występują we wszystkich warstwach przynależnych polu CA₁. Przylegają one do perykarionu komórek piramidowych, a także dendrytów i kolców dendrytycznych. Podobną lokalizację wykazują również synapsy niesymetryczne.

Stwierdzona przez nas u chomika mongolskiego obecność zróżnicowanych morfologicznie postaci synaps symetrycznych nie była dotychczas opisywana w pracach innych autorów (Westrum, Blackstad 1962; Hamlyn 1963; Andersen i wsp. 1966), zajmujących się ultrastrukturalną budową pola CA₁ rogu Amona. Nasze spostrzeżenia uzupełniają też badania Andersena i wsp. (1966), którzy synapsy symetryczne stwierdzali tylko na somie neuronów, podczas gdy w naszym materiale znajdowano je także na powierzchni gładkiej dendrytów i na kolcach dendrytycznych.

EFFECT OF SHORT-TERM ISCHEMIA ON ULTRASTRUCTURE OF GYRUS HIPPOCAMPI

I. ULTRASTRUCTURE OF CA₁ SECTOR OF AMMON'S HORN WITH SPECIAL REFERENCE TO THE STATE OF ITS SYNAPTIC CONTACTS

Summary

Ultrastructure of synapses in hippocampus of normal Mongolian gerbil was studied. Investigations included the following layers of the CA₁ sector of Ammon's horn: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiale*, *stratum lacunosum moleculare*, *stratum moleculare*. In all layers studied synapses of symmetric and asymmetric type were observed. Occurrence of three morphological forms of synapses of symmetric type was found. These synapses were present both on somata as well as on dendrites shafts and dendritic spines. The function of synapses and hypothesis concerning inhibitory role of symmetric type synapses are discussed.

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ИЗВИЛИНЫ ГИППОКАМПА У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК

ЧАСТЬ I. УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКТОРА CA₁ АММОНОВА РОГА С ОСОБЫМ УЧЕТОМ КАРТИНЫ СИНАПТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ

Резюме

Исследовалась ультраструктура синаптических связей в гиппокампе интактных монгольских песчанок в отдельных слоях сектора CA₁: *stratum oriens*, *pyramidale*, *radiale*, *lacunosum-moleculare*, *moleculare*. Во всех исследованных слоях обнаружены симметричные и несимметричные синапсы. Существенным наблюдением является находка трех морфологических видов симметричных синапсов. Эти синапсы имеются как на перикорионе так и на дендритах и дендритических шипиках. Обсуждается также функция этих синапсов и гипотеза о тормозной функции симметричных синапсов.

PIŚMIENICTWO

1. Andersen P., Blackstad T. W., Liomo T.: Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.*, 1966, 1, 236–248.
2. Bodian D.: Electron microscopy two major synaptic types of spinal motoneurons. *Science*, 1966, 152, 1093–1094.
3. Buzsaki G.: Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.*, 1984, 22, 131–137.
4. Emson P.C.: Peptides as neurotransmitter candidates in mammalian CNS. W: *Progress in Neurobiology*. Red. J. Phillis, J. Kirkaert. Pergamon Press, New York, 1979, 13, 61–116.
5. Gasanow G. G., Melikow E. M.: *Nejrochemiczeskije mechanizmy gipokampa. Teta ritm i powiedjenje*. Izdatielstwo „Nauka”, Moskwa 1986.
6. Gray E. G.: Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. An electron microscopic study. *J. Anat.*, 1959, 93, 420–433.
7. Hamlyn C. H.: An electron microscope study of pyramidal neurons in the Ammon's horn of the rabbit. *J. Anat.*, 1963, 97, 189–201.
8. Kelly J. S., Dodd J.: Cholecystokinin and gastrin as transmitters in mammalian central nervous system. W: *Neurosecretion and brain peptides*. Red. J. B. Mortin, S. Reichlin, K. L. Bick. Raven Press, New York, 1981, 133–144.
9. Leranath Cs., Frotscher M.: Commissural afferents to the rat hippocampus terminate on vasoactive intestinal polypeptidelike immunoreactive non-pyramidal neurons. An EM immunocytochemical study. *Brain Res.*, 1983, 276, 357–361.
10. Lorente de No R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Physiol. Neurol.*, 1934, 46, 113–177.
11. Miles R., Wong R. K. S., Traub R. D.: Synchronized after-discharges in the hippocampus: contribution of local synaptic interactions. *Neuroscience*, 1984, 12, 1179.
12. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ indometacyny na niedokrwiennie uszkodzenia sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 493–506.
13. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ prostacykliny PGI₂ i indometacyny na niedokrwiennie uszkodzenie sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 21–34.
14. Nunzi M. G., Gorio A., Milan F., Freund T. F., Somogyi P., Smith A. D.: Cholecystokinin-immunoreactive cells from symmetrical synaptic contacts with pyramidal and non-pyramidal neurons in the hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 1985, 237, 485–489.
15. Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak J. M., Crow T. J.: Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*, 1984, 11, 35–77.
16. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo I.: The effect of 5 minute ischemia in Mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983a, 60, 217–222.
17. Suzuki R., Yamaguchi T., Chou-Luh Li, Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in spontaneous activity in cerebral cortex and CA₁ sector of hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983b, 60, 217–222.
18. Śmiałek M.: Aktywność oddechowa w układzie askorbinian-cytochrom C neuronów kory amonalnej chomika mongolskiego (*meriones unguiculatus*) w doświadczalnym niedokrweniu mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1977, 2, 169–181.
19. Tielen A. M., Lopes da Silva F. H., Mollevanyer W. J., de Jounge F. H.: Differential effects of enkephalin within hippocampal areas. *Exp. Brain Res.*, 1981, 44, 343–346.
20. Uchizono K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 1965, 207, 642–643.
21. Westrum L. E., Blackstad T. W.: An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior CA₁) with particular emphasis on synaptology. *J. Comp. Neurol.*, 1962, 119, 281–309.

22. Witter M. P.: A survey of the anatomy of the hippocampal formation with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. W: Excitatory amino acids and epilepsy. Red. R. Schwarcz, Yehezkel-Ari. Plenum Publishing Corporation, New York, 1986, 67–82.
23. Zieglansberger W., French E. D., Siggins G. R., Bloom R. E.: Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science*, 1979, 205, 415–417.

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

MIECZYŚLAW WENDER, DANUTA LENART-JANKOWSKA,
DANUTA PRUCHNIK-GRABOWSKA, PIOTR KOWAL

DIFFERENT TEMPORAL TRENDS IN STROKE TYPES IN THE LIGHT OF AUTOPTIC CASES

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Several epidemiological studies have revealed, that the mortality and incidence rates of cerebral stroke in the United States and in many European countries were markedly lower in 1966 and 1967, in comparison with the data from the previous decade (Lew 1973). Similar observations concern the comparison of years 1968 and 1978, showing the decline of mortality and incidence rates in the USA, especially in the age group between 65 and 85 years. Despite of this, cerebral stroke still remains the third most frequent cause of death in males at ages above 65 years (Posner et al. 1984). A similar decreasing trend in mortality and incidence rates of stroke was described in the last decades in Japan and in Israel (Ueda et al. 1981; Tanaka et al. 1982; Epstein, Zaaroor 1982).

Many probable explanations of the observed decrease in mortality caused by the cerebral vascular diseases are under discussion. One of the possible factors might involve change in the frequency of the particular types of stroke (cerebral infarct versus cerebral hemorrhage) (Kramer et al. 1982).

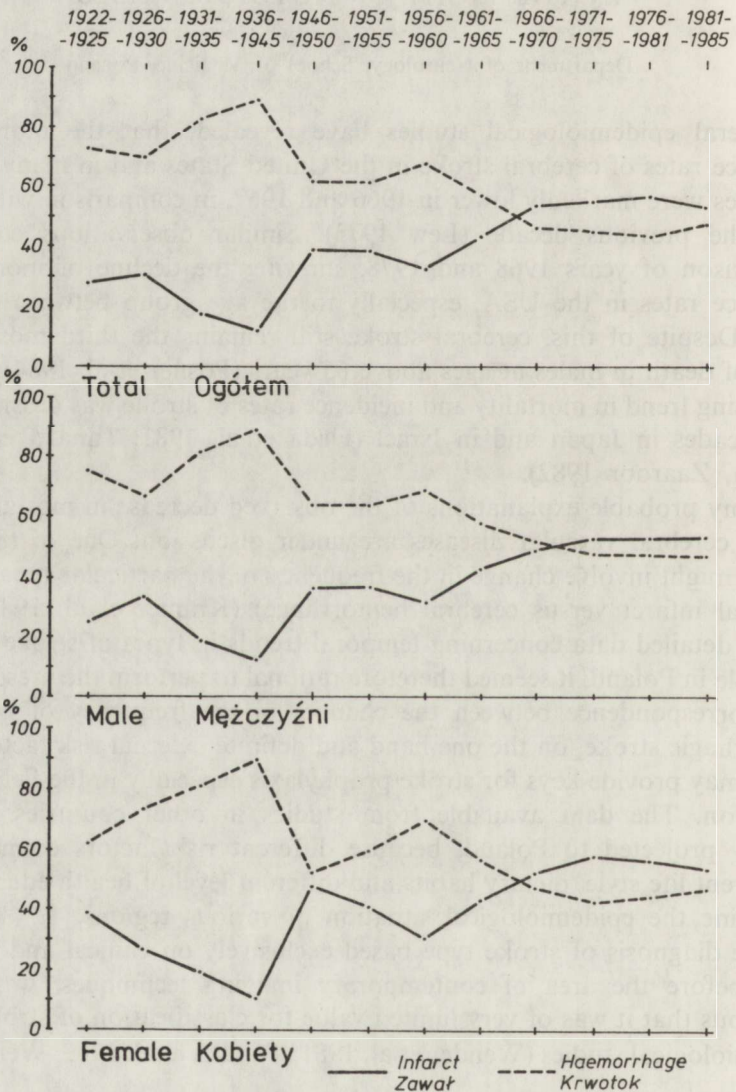
No detailed data concerning temporal trends in types of stroke have been available in Poland, it seemed therefore rational to perform the present studies. Any correspondence between the changes in the frequency of ischemic or hemorrhagic stroke, on the one hand and definite external risk factors, on the other, may provide keys for stroke prophylaxis especially in the field of health education. The data available from studies in other countries cannot be directly projected to Poland, because different risk factors connected with a different life style, dietary habits and different level of health education may determine the epidemiological situation in various regions.

The diagnosis of stroke type based exclusively on clinical and laboratory data, before the area of contemporary imaging techniques, was often so erroneous that it was of very limited value for classification of stroke types in epidemiological studies (Wender et al. 1981; Tanaka et al. 1982; Wender 1983).

The difficulties in study of trends in course of decades have been aggravated by changes in clinical terminology, which frequently even failed to consider the pathomorphology of stroke. Thus, current knowledge of temporal trends in the types of cerebral vascular diseases should be based on autoptic material, which provides the best possibility to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke.

MATERIAL AND METHODS

The investigation was conducted on the territory of Poznań district. All records, accessible in pathology and forensic medicine departments of the district, concerning persons who died at the age of more than 20 years between



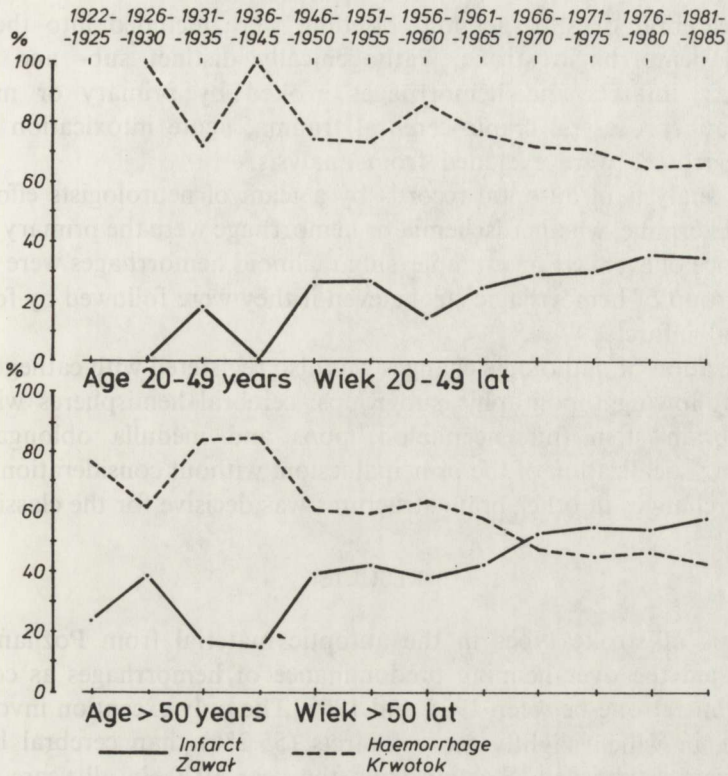


Fig. 2. Trends in types of stroke in autopsic material divided into subgroups: who died at an age exceeding 49 years and at age of 20-49 years

Ryc. 2. Trendy typów udarów mózgu w materiale autopsyjnym z podziałem na podgrupy wg wieku: zmarłych w wieku powyżej 49 lat i pomiędzy 20 i 49 rokiem życia

1922 and 1985 were analyzed. The material was investigated in two ways. Data obtained from records, starting from the year 1925 at 5-year intervals were evaluated statistically. Because of lacking records from the time of World War II the year 1939 was analyzed instead of 1940. The second approach, presented in Figs 1 and 2 concerns data taken jointly for 5 consecutive years.

In evaluation of autopsic records special attention was focused on differentiation of stroke into two categories: ischemic and hemorrhagic stroke. The cases in which the autopsic record indicated a pale infarct (*infarctus pallidus* v. *encephalomalacia pallida*), hemorrhagic infarct (*infarctus haemorrhagicus* v. *encephalomalacia haemorrhagica*) or mixed infarct (primarily pale, secondarily hemorrhagic one) were included in the first class. Cases with

Fig. 1. Trends in types of stroke in autopsic material on the territory of Poznań district

Ryc. 1. Trendy typów udarów mózgu w materiale autopsyjnym z terenu województwa poznańskiego

primary cerebral or subarachnoid bleeding were included into the second group of hemorrhagic stroke. Pathogenically distinct sub- and epidural hematomas, infarcts and hemorrhages evoked by primary or metastatic neoplastic processes, cranio-cerebral trauma, acute intoxication or post-shock syndromes were excluded from analysis.

Upon analysis of autoptic records by a team of neurologists efforts were made to determine, whether ischemia or hemorrhage were the primary lesion in the sequence of events. For example, subarachnoid hemorrhages were included into the group of hemorrhagic stroke even if they were followed by formation of cerebral infarcts.

Localization of pathologic changes was also registered with categorization into the following topographic subgroups: cerebral hemispheres with basal ganglia, brain stem (mesencephalon, pons and medulla oblongata) and cerebellum. Localization of the principal lesion, without consideration of small coexisting changes in other brain structures was decisive for the classification.

RESULTS

Analysis of stroke types in the autoptic material from Poznań district demonstrated the over helming predominance of hemorrhages as compared with ischemic stroke between 1925 and 1955. The only exception involved the year 1950, in which slightly more infarcts (55.2%) than cerebral bleedings (44.8%) were established. Starting from the year 1970, in all years ischemic prevailed over hemorrhagic stroke. The differences proved statistically significant at $p < 0.001$. The detailed results are presented in Table 1.

The presentation of stroke types in persons deceased at an age exceeding 49 years (Table 2) shows an almost identical temporal trend as in the total material. In years 1925 to 1965 hemorrhagic stroke was more frequent than infarcts, with the exception of years 1930 and 1950, in which the proportions of both types of cerebrovascular disease were almost identical. In the following years (1970 to 1985), infarcts were more frequent than hemorrhagic strokes. The differences proved statistically significant ($p < 0.001$).

The epidemiologic situation was different in persons, who died at the age of 20–49 years, in which with exception of one year only (1950) the percentage of cerebral hemorrhages was greater than that of infarcts. The results are presented in Table 3.

The ratio of ischemic to hemorrhagic stroke in males (Table 4) and in females (Table 5) resembled the respective ratio calculated for the total material. In both subgroups the ratio of infarct to hemorrhage frequencies underwent inversion in the year 1970. The differences are also significant ($p < 0.01$).

Localization of brain infarcts, showing a marked preference for the cerebral hemispheres including basal ganglia and a more rare occurrence in brain stem and in cerebellum showed no changes in the studied decades (Table 6).

Table 1. Trends in types of stroke in autoptic material on the territory of Poznań district (total)
 Tabela 1. Trendy czasowe typów udarów mózgu w materiale autopsyjnym na terenie województwa
 poznańskiego (ogółem)

Year	Total number of analysed autopsies	Number of autopsies in cerebral vascular diseases	Percentage of cerebral infarcts	Percentage of hemorrhages
Rok	Liczba analizowanych sekcji ogółem	Liczba sekcji w chorobach naczyniowych mózgu	Odsetek rozmiękań mózgu	Odsetek krwotoków
1925	420	14	28.6	71.4
1930	406	11	36.4	63.6
1935	545	11	18.2	81.8
1939	362	13	15.4	84.6
1945	381	5	20.0	80.0
1950	1114	29	55.2	44.8
1955	1618	71	32.4	67.6
1960	937	61	44.3	55.7
1965	1626	98	40.8	59.2
1970	2005	147	56.5	43.5
1975	2742	263	57.0	43.0
1980	2295	196	61.2	38.8
1985	1779	133	57.1	42.9
Total Razem	16230	1052	52.1	47.9

Test χ^2 (calc.) = 49.13
 (obl.)

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance – $p \leq 0.001$

Pozycja istotności

Table 2. Trends in types of stroke in autopsic material of persons who died at age exceeding 49 years on the territory of Poznań district

Tabela 2. Trendy czasowe typów udarów mózgu u osób zmarłych w wieku powyżej 49 lat w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Percentage of cerebral infarcts	Percentage of hemorrhages
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Odsetek rozmiękań mózgu	Odsetek krwotoków
1925	14	28.6	71.4
1930	8	50.0	50.0
1935	8	12.5	87.5
1939	11	18.2	81.8
1945	3	33.3	66.7
1950	24	50.0	50.0
1955	54	37.0	63.0
1960	44	47.7	52.3
1965	82	41.5	58.5
1970	116	63.8	36.2
1975	224	61.2	38.8
1980	163	66.3	33.7
1985	113	62.0	38.0
Total Razem	864	56.5	43.5

Test χ^2 (calc.) = 50.77
(obl.)

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance – $p \leq 0.001$

Pozycja istotności

Table 3. Trends in types of stroke in autopsic material of persons who died at age of 20–49 years on the territory of Poznań district

Tabela 3. Trendy czasowe typów udarów mózgu u osób zmarłych w wieku 20–49 lat w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Percentage of cerebral infarcts	Percentage of hemorrhages
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Odsetek rozmiękań mózgu	Odsetek krwotoków
1925	0	0.0	0.0
1930	3	0.0	100.0
1935	3	33.3	66.7
1939	2	0.0	100.0
1945	2	0.0	100.0
1950	5	80.0	20.0
1955	17	17.6	82.4
1960	17	35.3	64.7
1965	16	37.5	62.5
1970	31	29.0	71.0
1975	39	33.3	66.7
1980	33	36.4	63.6
1985	20	30.0	70.0
Total	188	31.9	68.1
Razem			

Test χ^2 (calc.) = 13.74
(obl.)

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance – $p \leq 0.05$

Pozycja istotności

Table 4. Trends in types of stroke in autopsic material of males on the territory of Poznań district
 Tabela 4. Trendy czasowe typów udarów mózgu u mężczyzn w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Percentage of cerebral infarcts	Percentage of hemorrhages
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Odsetek rozmiękań mózgu	Odsetek krwotoków
1925	1	0.0	100.0
1930	5	40.0	60.0
1935	8	25.0	75.0
1939	5	0.0	100.0
1945	3	33.3	66.7
1950	15	53.3	46.7
1955	38	28.9	71.1
1960	21	47.6	52.4
1965	40	35.0	65.0
1970	74	52.7	47.3
1975	132	54.5	45.5
1980	97	59.8	40.2
1985	79	53.2	46.8
Total Razem	518	50.0	50.0

Test χ^2 (calc.) = 28.45
 (obl.)

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance – $p \leq 0.01$

Pozycja istotności

Table 5. Trends in types of stroke in autoptic material of females on the territory of Poznań district
 Tabela 5. Trendy czasowe typów udarów mózgu u kobiet w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Percentage of cerebral infarcts	Percentage of hemorrhages
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Odsetek rozmiękań mózgu	Odsetek krwotoków
1925	11	36.4	63.6
1930	6	33.3	66.7
1935	3	0.0	100.0
1939	8	25.0	75.0
1945	2	0.0	100.0
1950	14	57.1	42.9
1955	33	36.4	63.6
1960	42	40.5	59.5
1965	58	44.8	55.2
1970	73	60.3	39.7
1975	131	59.5	40.5
1980	99	62.6	37.4
1985	54	63.0	37.0
Total Razem	534	54.1	45.9

Test χ^2 (calc.) = 31.16
 (obl).

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance: – $p \leq 0.01$

Pozycja istotności:

Table 6. Trends in localization of cerebral infarcts in autopsic material on the territory of Poznań district

Tabela 6. Trendy czasowe lokalizacji rozmiękań mózgu w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Brain hemispheres (in %)	Brain stem (in %)	Cerebellum (in %)
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Półkule mózgu (w %)	Pień mózgu (w %)	Móżdżek (w %)
1925	4	75.0	25.0	0.0
1930	4	100.0	0.0	0.0
1935	2	100.0	0.0	0.0
1939	2	100.0	0.0	0.0
1945	1	100.0	0.0	0.0
1950	16	93.8	6.3	0.0
1955	23	100.0	0.0	0.0
1960	27	100.0	0.0	0.0
1965	40	95.0	2.5	2.5
1970	83	96.4	3.6	0.0
1975	150	94.6	4.7	0.7
1980	120	90.8	6.7	2.5
1985	76	97.4	1.3	1.3
Total Razem	548	94.9	4.0	1.1

Test χ^2 (calc.) = 2.66
(obl.)

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance: – $p \leq 0.05$

Pozycja istotności:

Table 7. Trends in localization of hemorrhagic strokes in autoptic material on the territory of Poznań district

Tabela 7. Trendy czasowe lokalizacji udarów krwotocznych w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego

Year	Number of analysed autopsies	Brain hemispheres (in %)	Brain stem (in %)	Cerebellum (in %)	Subarachnoid space (in %)
Rok	Liczba sekcji analizowanych	Półkule mózgu (w %)	Pień mózgu (w %)	Mózdzek (w %)	Przestrzeń podpajęczynówkowa (w %)
1925	10	90.0	10.0	0.0	0.0
1930	7	28.6	14.3	42.9	14.3
1935	9	100.0	0.0	0.0	0.0
1939	11	63.6	18.2	0.0	18.2
1945	4	75.0	0.0	0.0	25.0
1950	13	92.3	7.7	0.0	0.0
1955	48	87.5	2.1	0.0	10.4
1960	34	76.5	5.9	2.9	14.7
1965	58	79.3	12.1	0.0	8.6
1970	64	85.9	3.1	1.6	9.4
1975	113	75.1	5.2	2.9	16.8
1980	76	75.0	7.9	3.9	13.2
1985	57	68.4	5.3	5.3	21.0
Total Razem	504	77.7	6.3	2.8	13.2

Test χ^2 (calc.) = 58.57
(obl).

Critical value of χ^2 distribution: χ^2 (0.05) – 21.03

Wartość krytyczna rozkładu χ^2 : χ^2 (0.01) – 26.22

Position of significance – $p \leq 0.01$

Pozycja istotności

Hemorrhagic stroke was also localized with highest frequency in cerebral hemispheres. On the other hand, the relative frequency of subarachnoid hemorrhage varied markedly in individual years. The variations showed no evident pattern in time (Table 7).

DISCUSSION

The attempt to clarify the causes of declining stroke incidence and mortality is a key issue in epidemiology of cerebral stroke and carries high practical significance. Its importance has been stressed by the results of epidemiological studies demonstrating that stroke mortality decreased in the USA by 37% between 1968 and 1978 (Posner et al. 1984). Solution of the problem, even if partial, might promote prophylaxis against acute vascular diseases of the brain. However, cerebral stroke represents a clinical syndrome, not a morbid entity of definite etiology and pathogenesis. Therefore, frequency determinations for more precisely defined, even if etiologically still diversified, principal classes of cerebral stroke, i.e. for ischemic and hemorrhagic stroke, may promote analysis of causes of these syndromes.

In monographs of the subject Wylis (1972) and Kuller (1978) express the view, that analysis of temporal trends in types of cerebral stroke has shown, that the relative ratio between hemorrhages and infarcts is changing with increasing frequency of the latter. The reviews included several clinical and pathological reports, of different objective value. It should be also added that even some, more recently published papers present results which are not fully compatible with the above presented conclusions.

The following reports of principal importance for the issue deserve attention. Yates (1964) established on grounds of autoptic data from three hospitals in Manchester and starting from the year 1955, a decreasing number of deaths caused by cerebral hemorrhages, with reciprocal increase in number of brain infarcts. In the period between 1949 and 1967, a decrease in mortality due to intracerebral hemorrhages and an increase in the number of death certificates with diagnosis — subarachnoid hemorrhage have been noted in Canada. This seems to have resulted only from changes in diagnostic terminology after recognition of different etiology of primary intracerebral and subarachnoid hemorrhages (Gordon 1966). Similarly, the decreases in the number of diagnoses of cerebral thrombosis in favour of unspecified cerebral vascular disease, noted by Kramer et al. (1982), seems to reflect only a change in diagnostic standards.

Garraway et al. (1983) have thoroughly studied trends in the epidemiological situation in the field of cerebral vascular diseases in Rochester, Minnesota. The authors found no striking differences in the proportion of various stroke types upon examination of clinical, CT-scan and autoptic data. The only exception involved the variable ratio of cerebral thrombosis to subarachnoid hemorrhage incidence, noted when comparing the data from years 1970–1974 and

1975–1979. Change in the ratio reflected mainly an increase in the number of subarachnoid hemorrhages.

In our own studies, performed in Poznań district and based exclusively on autoptic material, we noted an inversion of the ischemic to hemorrhagic stroke ratio at the beginning of the seventies, whereas in the earlier studied period, starting from the twenties, cerebral hemorrhages dominated, in the years 1970–1985 ischemic stroke has been noted more frequently.

Autopsies were performed only in some cases of death, and in a variable proportion of the cases in individual years. Therefore, the question may be raised as to the value of the analyzed material for understanding events concerning the total incidence and mortality in cerebral vascular diseases. We express the opinion that autoptic material is insufficient for conclusions as to the absolute number of cerebral hemorrhages and infarcts, but we see no reason to suggest that this limitation should influence the ratio of hemorrhagic to ischemic stroke in fatal cases of cerebrovascular diseases. However, we are aware of the fact, that, as regards the incidence of particular stroke types, the pathological data provide grounds to conclude only about the epidemiological situation concerning severe cases of cerebral stroke, in which the incidence is only twice as high as the mortality rate.

The basic question arises as to the cause of the decrease in mortality due to cerebral stroke. The positive correlation between the decrease in total mortality, on the one hand, and the relative diminution of hemorrhagic stroke, on the other, seems to provide an important clue. It is generally known, that in patients with cerebral hemorrhages the rate of fatal outcome is the highest among all types of cerebral stroke. Therefore, a decrease in incidence of hemorrhagic stroke should be followed by a decrease in total mortality due to cerebral vascular diseases.

Hypertension plays an important pathogenic role in both basic types of stroke: ischemic and hemorrhagic. However, its role is significantly greater in the pathomechanism of cerebral bleeding. Therefore, the assumption should be accepted that the growing efficacy of hypertension therapy may, at least in great part, explain the decreasing rate of intracerebral hemorrhages (Tanaka et al. 1982; Garraway et al. 1983; Whisnant 1984). This seems applicable both to Poland and to other countries in which similar time trends have been noted in the epidemiology of cerebral stroke. Nevertheless, it cannot be excluded that partial elimination of other risk factors by changes in life style including dietary habits, also play an important role in shaping positive trends observed in the epidemiology of cerebral stroke.

CONCLUSIONS

1. Ratios of cerebral stroke types, noted in autoptic material from Poznań district points to prevalence of hemorrhagic over ischemic stroke in 1922 to 1964.

2. Beginning with 1970 and in all subsequent years ischemic has been more frequent than hemorrhagic stroke.
3. Inversion of the ratio of ischemic to hemorrhagic stroke occurring in the early seventies has been noted in the total autoptic material, in the age group above 49 years, and also in the subgroups of males and females.
4. Brain infarcts and hemorrhages showing marked preference to cerebral hemispheres including basal ganglia, have not changed their localization in the analysed decades.
5. Effective therapy of arterial hypertension seems to constitute the principal factor responsible for the lower frequency of cerebral hemorrhages and this should orient the development of prophylactic measures.

TRENDY CZASOWE TYPÓW UDARÓW MÓZGU W MATERIALE AUTOPSYJNYM

Streszczenie

Przeprowadzono analizę stosunku typów udarów mózgu w materiale autopsyjnym na terenie województwa poznańskiego w przedziałach 5-letnich. Badania epidemiologiczne wykazały w latach od 1922 do 1965 przewagę odsetkową udarów krwotocznych nad udarami niedokrwiennymi. Poczynając od 1970 r. we wszystkich analizowanych latach występuje zdecydowanie wyższy odsetek udarów niedokrwiennych niż udarów krwotocznych.

Inwersja wzajemnego stosunku udarów niedokrwiennych i krwotocznych występująca w początkach lat siedemdziesiątych dotyczy tak ogółu udarów mózgu, grupy wiekowej powyżej 49 roku życia, podgrupy mężczyzn, jak i kobiet. U osób zmarłych w wieku 20–49 lat, z wyjątkiem dwóch analizowanych lat (1950 i 1981) we wszystkich innych wyraźnie przeważają krwotoki mózgowe nad zawałami.

Lokalizacja zawałów i krwotoków mózgu, wykazująca zdecydowaną przewagę liczbową w półkulach mózgu, łącznie z jądrami podstawy, nie wykazała uchwytnych zmian w analizowanych latach. W poszczególnych latach różny był stosunek procentowy krwotoków podopajęczynkowych do całości udarów krwotocznych. Nie można tu jednak uchwycić jakiegoś określonego trendu czasowego.

Podstawowym czynnikiem wpływającym na obniżenie liczby krwotoków mózgowych wydaje się być skuteczna terapia nadciśnienia tętniczego, co winno wyznaczać kierunek działań profilaktycznych.

ЗАВИСИМЫЕ ОТ ВРЕМЕНИ ТЕНДЕНЦИИ В ПОЯВЛЕНИИ РАЗНЫХ ТИПОВ МОЗГОВЫХ ИНСУЛЬТОВ В СЕКЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ

Резюме

Проведен анализ соотношения между типами инсультов мозга в секционном материале познаньской области за 5-летний период. Эпидемиологические исследования обнаружили, что в период с 1922 по 1965 гг. геморрагические инсульты преобладали над ишемическими. Начиная с 1970 года, во всех проанализированных годах найден существенно больший процент ишемических инсультов, чем геморрагических. Инверсия соотношения ишемических и геморрагических инсультов, проявившаяся в начале семидесятых годов, касается как всех инсультов мозга в возрастной группе людей старше 49 года, так и подгрупп мужчин и женщин. У умерших в возрасте 20–49 лет, за исключение

двух исследованных лет (1950 и 1981), во всех остальных мозговые кровоизлияния отчетливо преобладают над инфарктами. Локализация инфарктов мозга и кровоизлияний, проявляющаяся четкое количественное преобладание в полушариях мозга вместе с подкорковыми ганглиями, не обнаружила в исследованные годы выраженных изменений.

В отдельные годы процентное отношение субарахноидальных кровоизлияний ко всем геморрагическим инсультам было разным. Однако, какой-либо определенной тенденции связанной с периодом времени, не выявлено.

Основным фактором, влияющим на понижение количества мозговых кровоизлияний, является, по-видимому, эффективная терапия артериальной гипертензии, и это должно определять направление профилактических мероприятий.

REFERENCES

1. Epstein L., Zaaroor M.: Mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Israel 1969–1978. *Stroke*, 1982, 13, 570–573.
2. Garraway W., Whisnant J., Drury I.: The continuing decline in incidence of stroke. *Mayo Clin. Proc.*, 1983, 58, 520–523.
3. Gordon I.: The epidemiology of cerebral vascular disease in Canada: an analysis of mortality data. *Can. Med. Assoc. J.*, 1966, 95, 1004–1011.
4. Kramer S., Diamond K., Lilienfeld A.: Patterns of incidence and trends in diagnostic classification of cerebrovascular disease in Washington County, Maryland. 1969–1971 to 1974–1976. *Am. J. Epidemiol.*, 1982, 115, 398–411.
5. Kuller L.: Epidemiology of stroke. In: *Advances in Neurology*. Ed. B. Schoenberg. Raven Press, New York, 1978, 281–311.
6. Lew L.: Early phases of coronary heart diseases. Ed. J. Waldenstrom, Kungl. Boktryckerat, Stockholm, 1973, 87.
7. Posner J., German K., Waldow A.: Stroke in the elderly. I. Epidemiology. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1984, 32, 95–102.
8. Tanaka H., Tanaka Y., Hayashi M., Ueda Y., Date C., Baba T., Shaji H., Horimoto T., Owada K.: Secular trends in mortality for cerebrovascular diseases in Japan, 1969 to 1979. *Stroke*, 1982, 13, 574–581.
9. Ueda K., Ornae T., Hirota Y., Takeshito M., Katsuki S., Tanaka K., Enjoji M.: Decreasing trend in incidence and mortality from stroke in Hiroyama residents, Japan. *Stroke*, 1981, 12, 154–160.
10. Wender M.: Uwagi w sprawie diagnostyki różnicowej udaru mózgu. *Pol. Tyg. Lek.*, 1983, 38, 85–86.
11. Wender M., Mularek J., Wencel J., Marcinkowski J.: Uwagi na temat wartości diagnostyki neuropatologicznej dla kliniki chorób układu nerwowego. *Neuropatol. Pol.*, 1981, 19, 593–599.
12. Whisnant J.: The decline of stroke. *Stroke*, 1984, 15, 160–168.
13. Wylie Ch.: Epidemiology of cerebrovascular disease. In: *Vascular diseases of the nervous system*, p. I. Eds. P. Vinken, G. Bruyn. North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1972, pp. 183–207.

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

STANISŁAW KRAJEWSKI*, EWA DOLIŃSKA, JANINA RAFAŁOWSKA

KWAŚNE WŁÓKIENKOWE BIAŁKO GLEJOWE ORAZ ZNACZNIKI HISTIOCYTARNE W WYBRANYCH PRZYPADKACH ZAWAŁÓW MÓZGU CZŁOWIEKA**

Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, Warszawa

*Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Stosowane obecnie techniki immunocytochemiczne pozwalają, dzięki użyciu swoistych przeciwciał poli- i monoklonalnych, na ujawnienie określonych typów komórek, antygenów lub ich epitopów zarówno powierzchniowych, jak i śródcytoplazmatycznych. Umożliwia to dokładniejszą ocenę procesu patologicznego, weryfikację dotychczasowych informacji oraz ich znaczne poszerzenie. Wyniki badań nad rozbiórką martwicy i reakcją gleju astrocytarnego w zawałe mózgu należą do podstawowych wiadomości w klasycznej neuropatologii.

Możliwość przeprowadzenia badań immunocytochemicznych, na utrwalonym w formalinie materiale sekcyjnym, skłoniła nas do oceny immunoreaktywności antygenów tkanek nerwowych w wybranych przypadkach udarów niedokrwiennych mózgu człowieka. Wydawało się szczególnie interesujące określenie immunoreaktywności kwaśnego włókienkowego białka glejowego (GFAP) i zasadowego białka mieliny (MBP) oraz udziału w procesie rozbiórkowym zawału komórek krwiopochodnych na podstawie ich immunocytochemicznych znaczników takich jak, gamma-lizozym i alfa-1-antytrypsyna.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na mózgach 5 chorych zmarłych w przebiegu niedokrwiennego udaru mózgu, w wieku 50, 60, 83, 87 lat. Sekcję ogólną wykonywano do 24 godz. po zgonie. Dane kliniczne i wyniki badań podano w tabeli 1. Bloki tkankowe pobrane z ognisk zawałowych oraz z odpowiednich okolic przeciwległej półkuli, traktowanej jako kontrola, utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie i zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe barwiono rutynowo hematoxyliną i eozyną oraz według metod PAS, Klüve-

** Praca wykonana w ramach CPBP 06.02.

Tabela 1. Materiał
Table 1. Material

Numer przypadku Case number	Wiek lata Age years	Okres przeżycia Survival time	Nadciśnienie Hyper-tension	Przyczyna zgonu sekcja ogólna Cause of death postmortem exam.	Miażdżyca naczyń mózgu Brain vessels arteriosclerosis	Badanie makroskopowe mózgu Brain gross—examination
1	50	12 dni		zakrzepica tt. płucnych		Zawał krwotoczny w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej. Obrzęk
59/82		12 days	+	pulmonary arteries thromboses	++	Hemorrhagic infarct in vasculariz. area of right middle cerebral artery. Edema
2	60	3 lata		zawał m. serca		Liczne jamy poudarowe w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej lewej. Obrzęk
72/76		3 years	-	cardiac infarct	+++	Multiple postapoplectic cavities in vasculariz. area of left middle cerebral artery. Edema
3	87	11 dni		zawał m. serca		Zawał błady w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej.
112/73		11 days	+	cardiac infract	+++	Ischemic necrosis in vasculariz. area of right middle cerebral artery
4	87	15 dni		zator t. płucnej		Zawał błady w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej.
15/76		15 days	+	pulmonary embolism	+	Ischemic necrosis in vasculariz. area of right middle cerebral artery
5	83	35 dni		zapalenie płuc		Zakrzep t. szyjnej wew. lewej. Zawał krwotoczny w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej lewej. Obrzęk
63/78		35 days	-	pneumonia	+	Left internal carotid thrombosis. Hemorrhagic infarct-left middle artery. Edema

ra-Barrery oraz PTAH. Dodatkowo celem uwidocznienia kwaśnego włóknikowego białka glejowego (GFAP) i zasadowego białka mieliny (MBP) zastosowano technikę immunoperoksydazy pośredniej według Sternbergera i wsp. (1970). Nacieki krwiopochodne oceniano za pomocą przeciwciał przeciwko gamma-lizozymowi oraz alfa-1-antytrypsynie – znacznikom komórek histocytnych (McCombe i wsp. 1985; Kochi, Budka 1987).

Materiał przeznaczony do badań immunohistochemicznych poddawano kolejnym inkubacjom, początkowo z surowicą normalną świni (1:100) przez 1 godz. w celu wygaszenia nieswoistego tła, a następnie przez noc z niżej wymienionymi przeciwciałami pierwotnymi rozcieńczonymi odpowiednio: GFAP (1:3000, Dakopatts, Hamburg, RFN), MBP (1:1500, Sigma, St. Louis, USA), gamma-lizozym (1:1000, Dakopatts, Hamburg, RFN) i alfa-1-antytrypsyna (1:1000, Dakopatts, Dania). Następnie po płukaniu w PBS skrawki inkubowano po 45 min z przeciwciałami świni skierowanymi przeciwko globulinom królika (1:50, Dakopatts, Dania) oraz kompleksem peroksydazy-antyperoksydazy (1:200, Dakopatts, Dania). Reakcję immunohistochemiczną uwidocznilo, umieszczając preparaty w 0,05% roztworze diaminobenzyny (Sigma, USA) z dodatkiem 0,01% H_2O_2 . Po skontrastowaniu hematoksyliną i odwodnieniu w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu, preparaty zamykano za pomocą DePeX (Serva, RFN).

WYNIKI

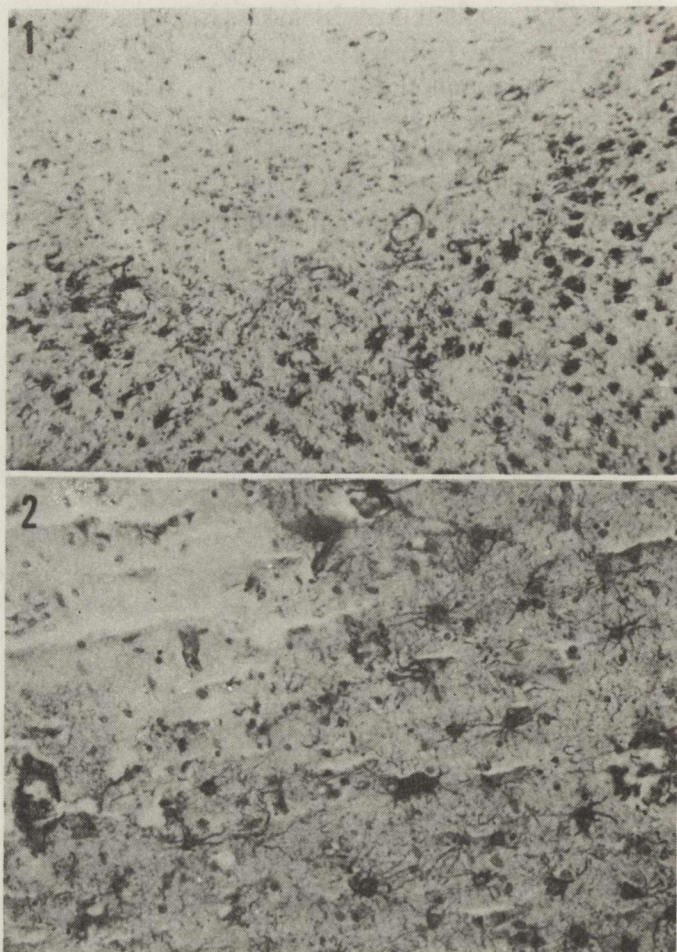
Badanie histopatologiczne

We wszystkich przypadkach w obszarach otaczających ogniska zarówno martwicy rozplywnej, znajdującej się w różnych fazach procesu rozbiórkowo-organizacyjnego, jak i nie wykazującej żadnego odczynu komórkowego (przyp. 59/82 i 63/78) stwierdzano pomnożenie gleju astrocytarnego z obecnością postaci przerosłych i gemistocytów. Na obrzeżu bezodczynowych ognisk martwicy i pół martwicy niezupełnej widoczny był niekiedy dość wąski obszar tkanki zawierający liczne makrofagi, proliferujące naczynia oraz pomnożone komórki astrogleju. Zmiany te odgraniczały pola niedokrwienia od tkanek otaczających. We względnie dobrze zachowanych obszarach tkanki, otaczających świeże ogniska niedokrwienia i wykazujących cechy martwicy niezupełnej, proliferacja gleju astrocytarnego była bardzo nasiloną. Jedynie w przypadku 72/76, w którym udar mózgowy miał miejsce 3 lata przed zgonem chorego, w bardzo znacznie rozluźnionych tkankach otaczających jamę po rozmiękaniu, reakcja glejowa była nieco mniejsza.

Badania immunocytochemiczne

Kwaśne włóknikowe białko glejowe.

We wszystkich przypadkach w pokrytych makrofagami obszarach martwicy rozplywnej (ryc. 1) i martwicy bezodczynowej (ryc. 2) oraz w polach przesięku (ryc. 3) nie stwierdzono reakcji GFAP. Ostra granica dodatniego



Ryc. 1. Przyp. 5. GFAP. Rozplem gleju astrocytarnego w obszarze martwicy niezupełnej, otaczającej ognisko rozplywnej martwicy warstwowej w korze mózgu. Pow. 125 ×

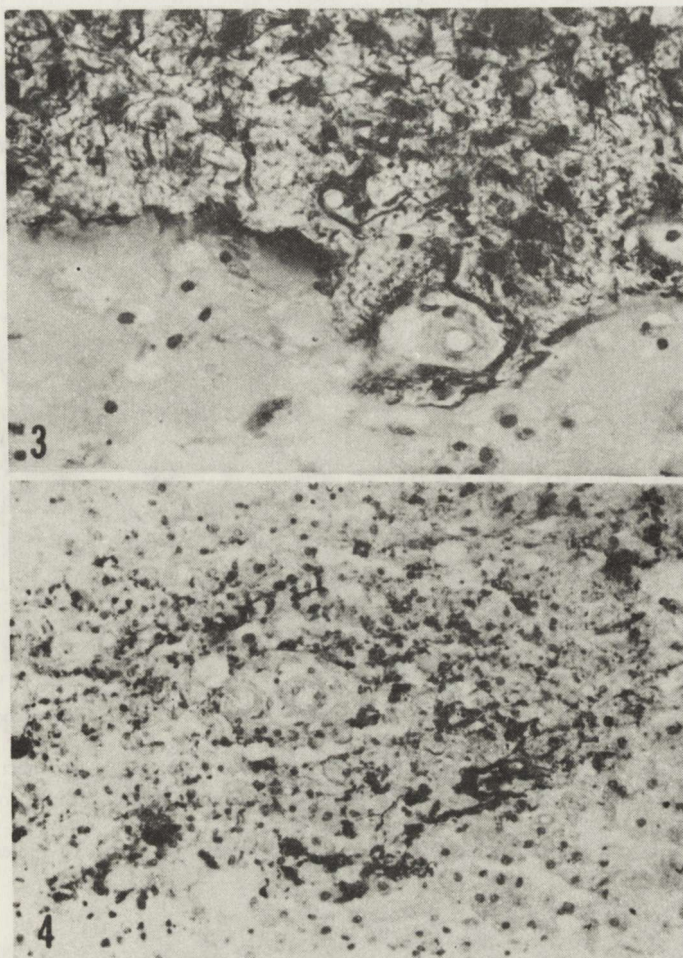
Fig. 1. Case 5. GFAP. Astroglial proliferation within an area of selective necrosis, surrounding colliquative laminar necrosis in the cerebral cortex. × 125

Ryc. 2. Przyp. 1. GFAP. Przerosłe astrocyty w tkankach otaczających obszar bezodczynowej martwicy w korze mózgu. Pow. 250 ×

Fig. 2. Case 1. GFAP. Reactive astrocytes within tissues, surrounding nonreactive necrotic cortical area. × 250

odczynu GFAP wyznaczała obszar mniej uszkodzonych tkanek. Niekiedy wśród bardzo licznych makrofagów widoczne były naczynia, otoczone resztkami zachowanego utkania mózgu, w którym widoczne były komórki astrogleju (ryc. 4).

W polach martwicy niezupełnej, otaczającej obszary martwicy rozplywnej, obserwowano liczne silnie wybarwione przerosłe astrocyty i gemistocyty. Dodatni odczyn immunocytoologiczny z kwaśnym białkiem włóknikowym gleju obserwowano zarówno w perykarionach astrocytów, jak i w ich



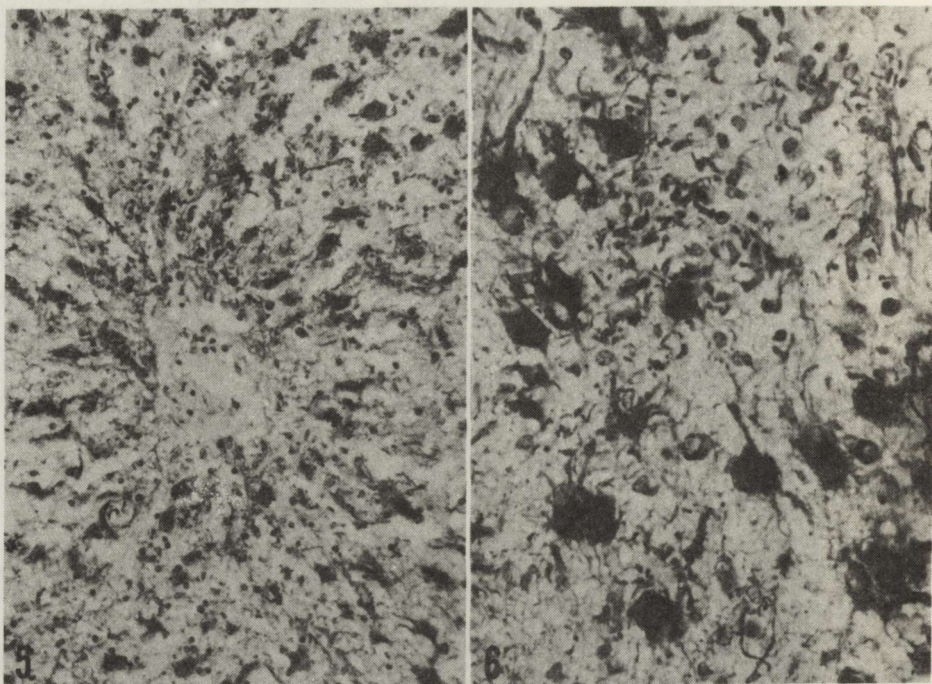
Ryc. 3. Przyp. 5. GFAP. Gemistocyty w warstwie drobinowej kory, przyległej do obszaru prześięku naczyniowego. Pow. 500 ×

Fig. 3. Case 5. GFAP. Gemistocytes within molecular cortical layer adjacent to accumulation of vascular transudate. × 500

Ryc. 4. Przyp. 4. GFAP. Gemistocyty w okołonaczyniowej wysepce zachowanej tkanki w obszarze martwicy rozplywnej. Pow. 250 ×

Fig. 4. Case 4. GFAP. Gemistocytes of perivascular "island" of preserved tissue within focus of colliquative necrosis. × 250

wypustkach. Proliferacja gleju gwiaździstego z tworzeniem postaci przerosłych, uwidocznioma w obrazach immunohistochemicznych, była szczególnie nasiloną w obszarach martwicy niezupełnej w przypadkach o krótkotrwałym przebiegu. Niekiedy stopień proliferacji i układ komórek gwiaździstych, zwłaszcza przy naczyniach, były podobne do spostrzeganych w nowotworach (ryc. 5). Szczególnie wydatna reakcja GFAP występowała w dużych okrągłych lub owalnych ciałach przerosłych astrocytów i gemistocytów (ryc. 6). Nierów-



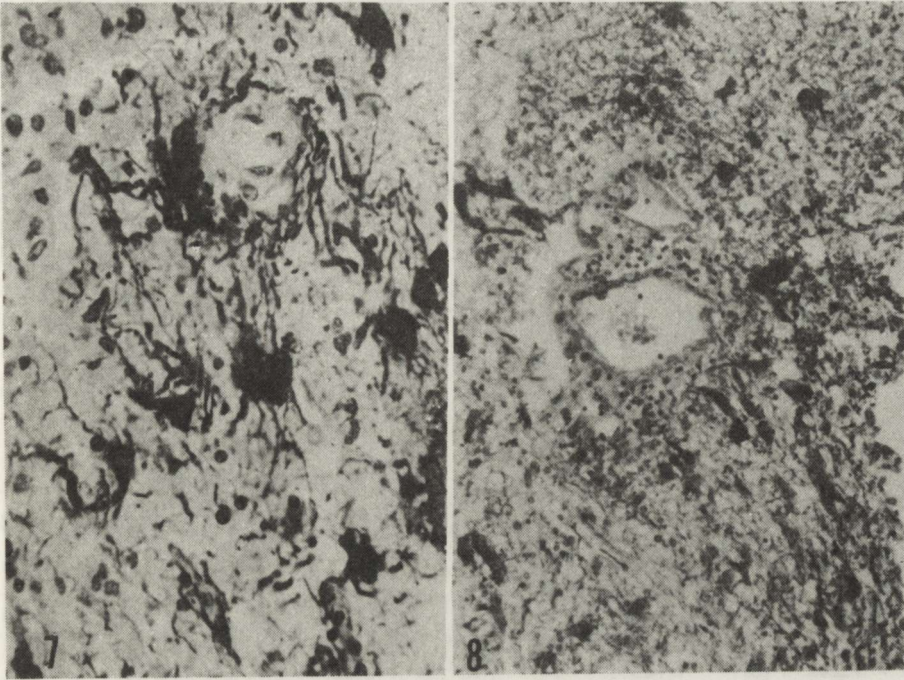
Ryc. 5. Przyp. 5. GFAP. Okołonaczyniowe nagromadzenie gemistocytów w polu martwicy niezupełnej. Pow. 250 ×

Fig. 5. Case 5. GFAP. Perivascular gemistocytes within a field of selective necrosis. × 250

Ryc. 6. Przyp. 6. GFAP. Gemistocyty w polu martwicy niezupełnej w warstwie drobinowej kory mózgu. Pow. 500 ×

Fig. 6. Case 6. GFAP. Gemistocytes within a field of selective necrosis of molecular cortical layer. × 500

nomiennie rozmieszczone, różnej grubości wypustki wykazywały cechy klazmatodendrozy (ryc. 6, 7). We wspomnianym uprzednio przypadku 72/76, z 3 letnim przeżyciem chorego po udarze mózgowym, w którym rozplem gleju w rozluźnionym otoczeniu jamy po rozmiękaniu był znacznie mniejszy (ryc. 8), występujące w tym obszarze astrocyty były małe, a ich obkurczone perykariony nierzadko wykazywały dziwaczne kształty (ryc. 8, 9). Ich bardzo nierównomiernie rozłożone grube wypustki nasuwały skojarzenie z włóknami Rosenthala (ryc. 9). Podobne wypustki obserwowano, zresztą także w innych przypadkach (ryc. 6). Zróznicowany obraz pól martwicy niezupełnej w poszczególnych przypadkach utrudniał porównanie rozplemu astrogleju i wyglądu przerosłych astrocytów w tych samych strukturach anatomicznych mózgu różnych przypadków. Zwraçała jednak uwagę szczególnie nasiloną proliferacją z wybitnym odczynem gemistocytarnym w warstwie drobinowej kory (ryc. 3, 10), przyległej do martwicy. W sąsiadującej z ogniskami martwicy istocie białej obserwowano dwa rodzaje reakcji: umiarkowaną proliferację astrocytów z bogatą populacją przerosłych komórek i nielicznymi gemis-



Ryc. 7. Przyp. 5. GFAP. Gemistocyty w obszarze martwicy niezupełnej kory. Objawy klasmatodendrozy. Pow. 500 ×

Fig. 7. Case 5. GFAP. Gemistocytes within an area of selective cortical partial necrosis. Evident features of gliosclerosis. × 500

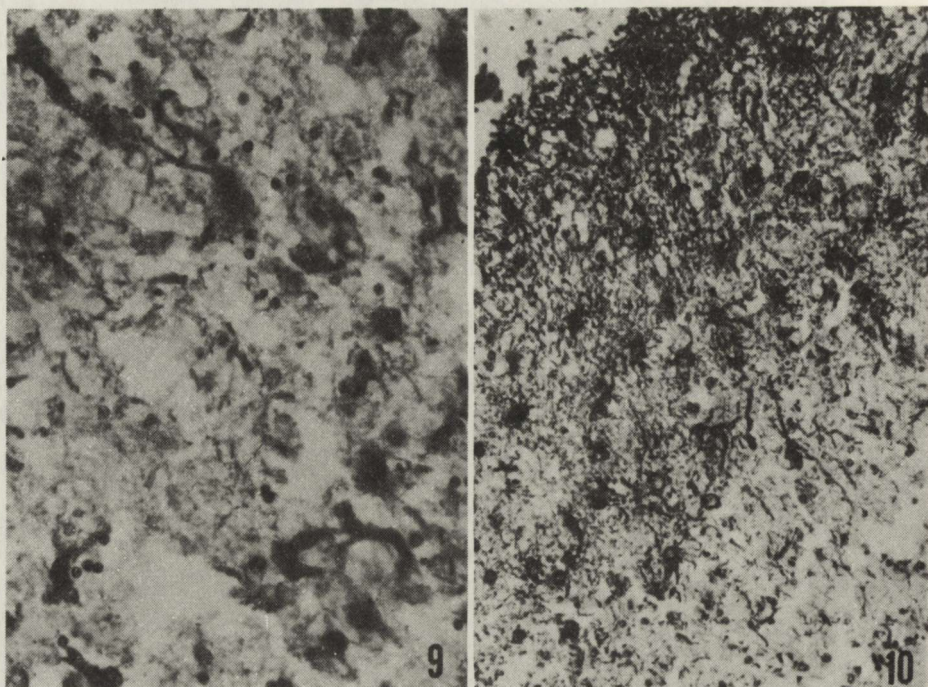
Ryc. 8. Przyp. 2. GFAP. Brzeg jamy poudarowej (istota biała), 3 lata po udarze. Niekły odczyn astrocytarny. Pow. 250 ×

Fig. 8. Case 2. GFAP. Margin of postapoplectic cavity (white matter), 3 years after ischemic stroke. Weak astrocytic reaction. × 250

tocytami (ryc. 11), lub też z bogatą reakcją gemistocytarną podobną do występującej w warstwie drobinowej kory. Występujące tu gemistocyty charakteryzowały się silnie wybarwionymi, dużymi perykarionami i nieregularnymi grubymi, często niesymetrycznie rozmieszczonymi wypustkami. Wśród nich widoczne były liczne jądra astrogleju, którym nie towarzyszyła cytoplazma z dodatnim odczynem immunocytochemicznym (ryc. 12). W korze oddalonej od ognisk martwicy reakcja GFAP miała niewielkie nasilenie. Przeważała ona w warstwie drobinowej i była wyraźnie zaakcentowana w granicznej błonie gлевой (ryc. 13).

Zasadowe białko mieliny.

W ogniskach martwicy immunoreaktywność zasadowego białka mieliny była wyraźnie zredukowana. Obszar ubytku aktywności był ostro odgraniczony od otaczających zachowanych tkanek (ryc. 14a). Niekiedy niewielka reakcja immunocytochemiczna widoczna była w makrofagach na granicy ogniska martwicy. W tkankach otaczających ognisko martwicy obraz odczynu MBP



Ryc. 9. Przyp. 2. GFAP. Martwica niezupełna istoty białej. Bardzo grube, nierównomiernie rozłożone wypustki gemistocytów. Pow. 500 ×

Fig. 9. Case 2. GFAP. Partial necrosis of the white matter. Very thick, irregularly spread gemistocytic processes. × 500

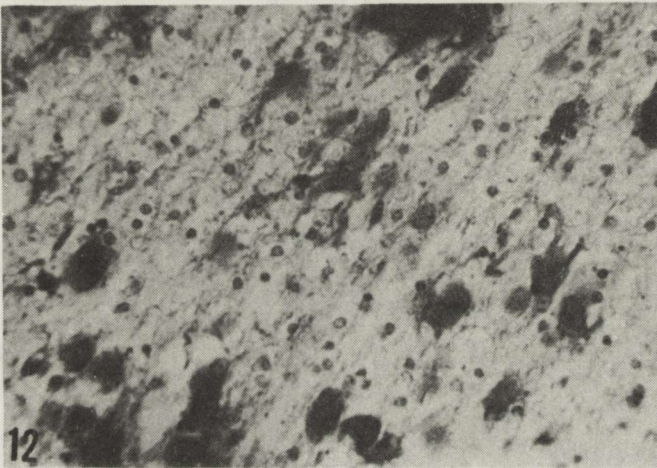
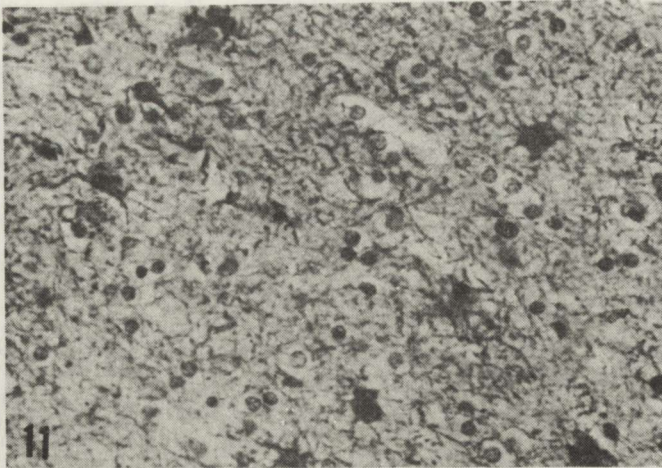
Ryc. 10. Przyp. 4. GFAP. Reakcja gemistocytarna w warstwie drobinowej kory przyległej do ogniska martwicy rozplywnej. Pow. 250 ×

Fig. 10. Case 4. GFAP. Gemistocytic reaction within molecular cortical layer adjacent to focus of colliquative necrosis. × 250

wskazywał na fragmentację włókien mielinowych. Rozkład immunoreaktywności MBP odpowiadał topografii reakcji GFAP.

Znaczniki histiocytarne.

W barwieniu z użyciem przeciwciał przeciwko gamma-lizozymowi oraz alfa-1-antytrypsynie intensywną, widoczną już makroskopowo, reakcję stwierdzono w obszarach, w których nie wykrywano antygenów GFAP i MBP (ryc. 14b). W tkankach, ocenionych w barwieniu hematoksyliną-eozyną jako niezmienione, i charakteryzujących się dodatnią reakcją na GFAP i MBP, odczyn ujawniający obecność znaczników histiocytarnych był ujemny. Alfa-1-antytrypsyna wybarwiła obszar niedokrwienia intensywniej (ryc. 14c) gamma-lizozym (ryc. 14d). Ocena mikroskopowa pozwalała na stwierdzenie, że intensywna reakcja immunocytochemiczna zwłaszcza z alfa-1-antytrypsyną występowała zarówno w licznych makrofagach, jak i w formie dyfuzyjnej w obszarach martwicy niezupełnej, wykazujących nikły lub całkowicie ujemny



Ryc. 11. Przyp. 4. GFAP. Gemistocyty istoty białej w pobliżu ogniska martwicy rozplywnej. Pow. 500 ×

Fig. 11. Case 4. GFAP. White matter gemistocytes in the neighborhood of focus colliquative necrosis. × 500

Ryc. 12. Przyp. 2. GFAP. Gemistocyty i liczne jądra astrocytów bez otaczającej cytoplazmy w obszarze martwicy niezupełnej istoty białej. Pow. 500 ×

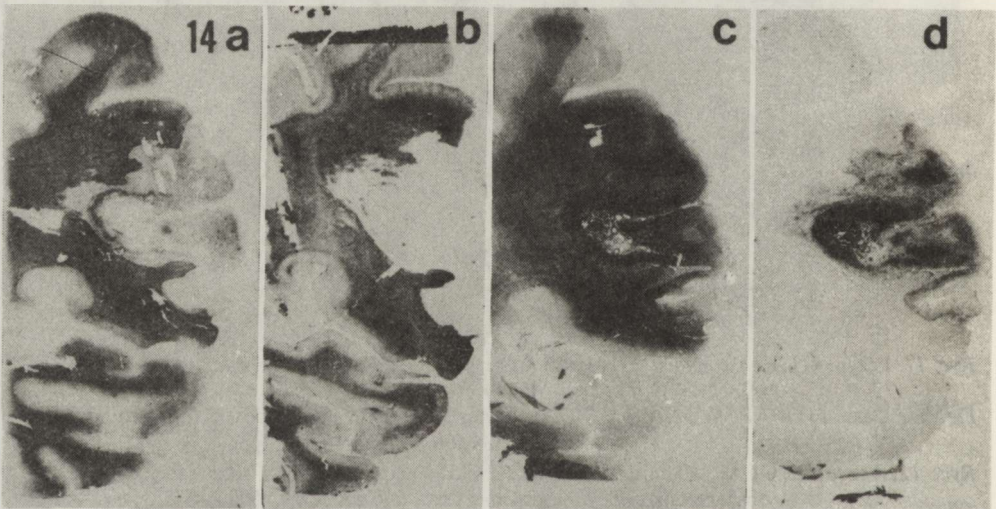
Fig. 12. Case 2. GFAP. Gemistocytes and numerous astrocytic nuclei without cytoplasmic rim within focus of partial necrotic white matter. × 500

odczyn na GFAP i MBP. Barwienie z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko gamma-lizozymowi uwidocznilo wybitną reaktywność licznych komórek histiocytarnych, położonych w tkance znajdującej się w początkowej fazie rozbiórki. Szczególnie intensywny odczyn obserwowano w okolicy naczyń krwionośnych. Makrofagi w obszarach martwicy rozplywnej wykazywały reakcję znacznie mniej nasiloną. Szczególnie dużo dodatnich komórek żernych stwierdzono w sąsiedztwie wybroczyn krwotocznych.



Ryc. 13. Przyp. 1. GFAP. Warstwa drobinowa w zachowanej części kory mózgu. Wyraźnie dodatnia reakcja zewnętrznej granicznej błony glejowej. Pow. 250 ×

Fig. 13. Case 1. GFAP. Molecular layer of relatively well preserved cortex. Distinct positive reaction of superficial glial limiting membrane. ×250



Ryc. 14a-14d. Przyp. 4. Kolejne skrawki makroskopowe wskazujące: zasięg i intensywność reakcji MBP (ryc. 14a), GFAP (ryc. 14b), alfa-1-antytrypsyny (ryc. 14c) oraz gamma-lizozymu (ryc. 14d) w ognisku niedokrwienia. PAP. Pow. 1 ×

Fig. 14a-14d. Case 4. Successive macroscopic slices showing: extension and intensity of MBP (Fig. 14a), GFAP (Fig. 14b), alpha-1-antitrypsin (Fig. 14c) and gamma-lysosym (Fig. 14d) reactions within ischemic focus. PAP. ×1

OMÓWIENIE

Analiza odczynów immunocytochemicznych stwierdzonych w przedstawionych przypadkach zawału mózgu o zróżnicowanym zaawansowaniu procesu patologicznego, jego natężeniu i obrazie patomorfologicznym pozwala na

ocenę zachowania kwaśnego włóknikowego białka glejowego oraz antygenowych znaczników histiocytarnych w obszarach martwicy zupełnej o różnym charakterze oraz w polach martwicy niezupełnej położonych zarówno w korze mózgu, w tym przede wszystkim w jej warstwie drobinowej, jak i w istocie białej.

W obszarach martwicy zarówno rozplywnej, znajdujących się w różnych fazach procesów rozbiórkowych, jak i bezodczynowej reakcja ujawniająca obecność kwaśnego włóknikowego białka glejowego była ujemna. Obszary te były ostro odgraniczone od tkanek otaczających, a w ich obrębie występował silny odczyn immunocytochemiczny na gamma-lizozym i alfa-1-antytrypsynę. Na szczególne podkreślenie zasługuje brak reakcji GFAP w polach bezodczynowej martwicy, mimo utrzymanych w jej obrębie zarysów komórek nerwowych i jąder glejowych. Zjawisko to świadczy o całkowitym braku reaktywności astrocytów. Wydaje się iż należy je traktować jako wykładnik znacznego uszkodzenia gleju gwiaździstego. Niedokrwienie, poprzez uaktywnienie fosfolipazy A₂, prowadzi do głębokiego uszkodzenia błon komórkowych (Jesse, Franson 1979). Zaburzenie w przepuszczalności błon komórkowych i przenikanie jonów wapnia do komórek astrogleju mogą prowadzić do proteolizy, stanowiącej czynnik uszkadzający filamenty glejowe (De Armond i wsp. 1983). Uważa się, że z tym związana jest obniżona reakcja GFAP astrocytów kory mózgu w encefalopatii wątrobowej (Kretzschmar i wsp. 1985). Podobny mechanizm może występować również w ogniskach niedokrwienia mózgu. Porównanie immunoreaktywności na GFAP z immunoreaktywnością na gamma-lizozym i alfa-1-antytrypsynę wykazało rozległą dyfuzyjną reakcję antygenowych znaczników histiocytarnych w obszarach martwicy bezodczynowej, nie wykazujących reakcji GFAP i nie zawierających makrografów. Wskazywać to może na uszkodzenie bariery krew—mózg i krwiopochodne nasiąkanie obszaru martwicy enzymami proteolitycznymi. Stanowią one, być może, dodatkowy czynnik uszkadzający komórki gwiaździste. Istnieje również możliwość, że martwica bezodczynowa wykazująca dodatnią reakcję lizosomalną stanowi wstępny etap rozwoju ogniska martwiczego, trwający różnie długo u poszczególnych chorych w zależności od stopnia uszkodzenia bariery krew—mózg. W tym kontekście udziału komórek histiocytarnych można byłoby spodziewać się w kolejnym etapie procesu patologicznego tzn. w fazie rozbiórki. Nie wiadomo natomiast, czy uszkodzenie astrogleju w opisanym obszarze ma charakter odwracalny i czy w miarę upływu czasu dochodzi do proliferacji z powstawaniem odczynowych postaci astrocytów.

Wybitnie dodatnią reakcję GFAP obserwowano w obszarach martwicy niezupełnej warstwy drobinowej kory, przylegających do ognisk martwicy zupełnej. Obecne tu przerosłe astrocyty i gemistocyty wykazywały bardzo znaczny odczyn występujący zarówno w ciałach komórek, jak i ich wypustkach, nasilenie reakcji było podobne do obserwowanego w chorobie Wilsona (Mossakowski, Weinrauder 1986). Wydaje się jednak, że spotykane często astrocyty o dziwacznych kształtach ciała komórkowego i asymetrycznie

położonych, pofałdowanych i poskręcanych grubych wypustkach mogą wskazywać na postępujące zwyrodnienie przerosłych postaci astrogleju. Włókna Rosenthala są, być może, wypustkami takich właśnie komórek.

W istocie białej przyległej do martwicy na tle podobnego podłoża zaobserwowano zarówno gemistocyty podobne do występujących w warstwie drobniejszej, jak mniejsze i delikatniejsze przerosłe postaci astrocytów. Odczyn na GFAP był zbliżony w obu typach komórek. Nasuwa się pytanie, czy różnica w ilości kwaśnego włóknienkowego białka glejowego zależy od postępującej w czasie proliferacji astrocytów czy od niedostrzegalnej być może, różnicy w nasileniu zmian w podłożu, czy też wreszcie od różnych możliwości wytwarzania kwaśnego białka nawet w obrębie jednego rodzaju komórek – astrocytów włóknistych. W omawianych obszarach istoty białej zwracała przy tym uwagę znaczna ilość pozbawionych odczynu GFAP astrocytów położonych wśród licznych gemistocytów. Kwaśne włóknienkowe białko glejowe pojawia się w okresie różnicowania komórek gwiazdzistych (Duffy 1982; Beria, Lascano 1985). W dojrzałym astrogleju obecne jest ono zarówno w astrocytach protoplazmatycznych jak włóknistych (Eng i wsp. 1971), przeważając w tych ostatnich (Ludwin i wsp. 1976). Astrocyty protoplazmatyczne wykazują obecność GFAP jedynie w formach reaktywnych (Bignami, Dahl 1976). Charakter odczynu immunocytochemicznego GFAP ułatwia określenie rodzaju komórek w nowotworach glejowych (Duffy i wsp. 1977; Choi, Anderson 1985; Zang Xu i wsp. 1985; Dickson i wsp. 1986), rozpoznanie różnicowe nowotworów (Deck i wsp. 1978; Krajewski i wsp. 1986) oraz ustalenie stopnia ich złośliwości (Szymaś 1985). W świetle tych danych powstaje pytanie, czy brak odczynu GFAP w astrocytach w obszarach martwicy niezupełnej należy wiązać z brakiem reakcji ze strony tych komórek, czy też z obecnością komórek młodych, w których kwaśne białko włóknienkowe jest jeszcze niemożliwe do uwidocznienia. Wobec znacznej proliferacji astrogleju w okolicach otaczających ogniska martwicy, druga możliwość wydaje się bardziej prawdopodobna. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że metody immunocytochemiczne pozwalają na dokładniejszą, niż klasyczne barwienia komórkowe, ocenę stadiów rozwoju i procesu organizacji ogniska martwicy. Dane dotyczące reaktywności komórek i tkanek poszerzają zakres wiadomości, uważanych w neuropatologii klinicznej za klasyczne.

GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN AND HISTIOCYTIC MARKERS IN SOME CASES OF HUMAN BRAIN INFARCT

Summary

Immunocytochemical characterization of the astroglial and phagocytic cell reaction was done in 5 cases of subjects deceased at the age of 50, 60, 83 and 87 years with a diagnosis of ischemic brain damage. Methods against GFAP, and hematogenous histiocytic markers, namely, alpha-1-antitrypsin and gamma-lysosyme, were used.

Within nonreactive or coagulative necrotic tissue with marked diffuse immunoreactivity for

histiocytic markers, GFAP and MBP reactions were not noted. Within colliquative necrotic lesions there were no GFAP and MBP reactions, a great number of alpha-1-antitrypsin and gamma-lysosome-positive cells were visible. In the partially necrotic areas surrounding the colliquative necrotic focus, a distinct proliferation of GFAP-positive cells with gemistocytic forms took place. An especially clear GFAP reaction occurred within the cortical molecular layers. In partially necrotic white matter numerous gemistocytes as well as GFAP-negative astrocytes were found. It is not known whether negative GFAP cells are young forms of astrocytes or another type of astroglial cells. Immunocytochemical investigations are useful in evaluation of human brain infarct.

КИСЛЫЙ ФИБРИЛЛЯРНЫЙ БЕЛОК (GFAP) И ГИСТИОЦИТАРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В НЕКОТОРЫХ СЛУЧАЯХ ИНФАРКТА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Проведена иммуноцитохимическая оценка астроглиальной и фагоцитарной клеточной реакции в 5 случаях у людей умерших в возрасте 50, 60, 83 и 87 лет с диагнозом ишемического инсульта. Использовались методы с антителами против GFAP, основного белка миелина (MBP) и гистиоцитарных маркеров.

В ареактивной или коагулятивной некротической ткани с заметной распространенной иммунореактивностью на гистиоцитарные показатели, реакция на GFAP и MBP отсутствовала. В очагах колликативного некроза, в которых не было реакции на GFAP и MBP наблюдалось большое количество клеток реагирующих на альфа-1-антитрипсин и гамма-лизозим. В неполностью некротически измененных тканях, окружающих очаг колликативного некроза, обнаружена пролиферация реагирующих на GFAP глияльных клеток и их гемистоцитарных форм. Особенно отчетливая реакция была обнаружена в молекулярном слое коры мозга. В очагах неполного некроза белого вещества были видны как гемистоциты, так и не реагирующие на GFAP клетки астроглии. Являются ли не реагирующие на GFAP клетки молодыми клетками астроглии, или же это другой тип астроцитов, не известно. Иммуноцитохимические исследования полезны в оценке инфаркта мозга человека.

PIŚMIENICTWO

1. Beria M. J., Lascano E. F.: Astrocyte differentiation induced by Junin virus in rat brain cell cultures. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1985, 66, 233–238.
2. Bignami A., Dahl D.: The astroglial response to stabbing-immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte specific protein (GFA) in mammalian and submalian vertebrates. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1976, 2, 99–110.
3. Choi H. S., Anderson P. J.: Immunohistochemical diagnosis of olfactory neuroblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1985, 44, 18–31.
4. De Armond S. J., Fajardo M., Neughton S. A., Eng L. F.: Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase. An electroblot study. *Brain Res.*, 1983, 262, 275–282.
5. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbec J., Woodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 197, 42, 183–190.
6. Dickson D. W., Suzuki K. J., Kanner R., Weitz S., Horoupian D. S.: Cerebral granular cell tumor: immunohistochemical and electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1986, 45, 304–314.

7. Duffy P. E.: Glial fibrillary acidic protein and induced differentiation of glia in vitro. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 443–460.
8. Duffy P. E., Graf L., Rapport M. M.: Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1977, 36, 645–652.
9. Eng L. F., Wanderhaegen J. J., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351–354.
10. Jesse R. L., Franson R. C.: Modulation of purified phospholipase A₂ activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1979, 375, 467–470.
11. Kochi N., Budka H.: Contribution of histiocytic cells to sarcomatous development of the gliosarcoma. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1987, 73, 124–130.
12. Krajewski S., Schwendemaun G., Weizsäcker M., Wechsler W., Tribolet de N.: Binding specificity of two monoclonal antiglioma antibodies: immunocytochemical studies using a new tissue embedding technique. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1986, 69, 124–131.
13. Kretzschmar H. A., DeArmond S. J., Forno L. S.: Measurement of GFAP in hepatic encephalopathy by ELISA and transblots. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1985, 44, 459–471.
14. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.*, 1976, 165, 197–207.
15. McCombe P. A., Clarck P., Frith J. A., Hammond S. R., Stewart G. J., Pollard J. B., McLead J. G.: Alfa-1-antitrypsin phenotypes in demyelinating disease: An association between demyelinating disease and the allele P i M₃. *Ann. Neurol.*, 1985, 18, 514–516.
16. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in abnormal astrocytes in Wilson's disease. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 365–376.
17. Sternberger L. A., Hardy P. H., Jr., Cuculis F. F., Meyer M. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 315–333.
18. Szymaś J.: Diagnostic value of demonstrating glial fibrillary acidic protein in human astrocytomas. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 23–35.
19. Zang Xu, Nilaver G., Stein B. M., Fetell M. R., Duffy P. E.: Immunocytochemistry of pineal astrocytes: species differences and functional implications. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1985, 44, 486–495.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

ELŻBIETA KIDA, EWA MATYJA, LEONID KHASPEKOV

THE ULTRASTRUCTURE OF RAT HIPPOCAMPAL FORMATION IN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE AFTER EXPOSURE TO QUINOLINIC ACID

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

Brain Research Institute, Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

Quinolinic acid (QUIN) belongs to a group of excitatory amino acids exerting a potent neurotoxic effect (Stone, Connick 1985). The excitatory effect of QUIN is probably mediated via activation of a subpopulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Stone et al. 1987). This compound represents an endogenous neurotoxin derived in the kynurenine metabolic pathway found in both animal and human brains (Wolfensberger et al. 1983; Moroni et al. 1984). A significant increase of the QUIN-synthesizing enzyme activity, 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase, recently documented in several brain areas in Huntington's disease patients (Schwarcz et al. 1987) seems to support the previously suggested role of QUIN in the pathogenicity of this disorder (Schwarcz et al. 1984b; Heyes et al. 1985). Moreover, the vulnerability of the hippocampal formation to QUIN and acute convulsions observed after intrahippocampal injections of high doses of QUIN in animals designates also QUIN as a possible pathogen in temporal lobe epilepsy (Foster et al. 1983; Stone, Perkins 1984; Stone et al. 1987).

Previously performed morphological studies showed an axon-sparing character of QUIN-induced brain lesions with selective vulnerability of particular brain areas (Schwarcz et al. 1983; Perkins, Stone 1983). However, morphological alterations were found only in adult animals, whereas immature brain tissue remained unaffected (Foster et al. 1983; Whetsell, Schwarcz 1983).

The present study was undertaken to examine in tissue culture conditions the direct effect of QUIN on the hippocampal formation, known to be sensitive to QUIN *in vivo* (Stone, Perkins 1984) in order to evaluate the pattern of QUIN induced neurotoxicity in the process of development and maturation.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures of hippocampal formations were prepared from 2–3-day-old Wistar rats. Briefly, hippocampi from both cerebral hemispheres were dissected out under sterile conditions and placed into a pool of Eagle's Minimal Essential Medium (MEM). The blocks of hippocampal tissue were coronally cut into thin slices, put on collagen-coated glass coverslips and covered with two drops of nutrient medium. The cultures were maintained in Maximow double coverslip assemblies at 36.5° C. The nutrient medium, renewed twice weekly consisted of 25% human serum and 75% MEM supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg%. The cultures were regularly observed in living state by light microscopy.

Selected cultures grown in standard conditions, after 10, 14 and 20 days *in vitro* (DIV), at the stage of differentiation when numerous synaptic contacts of various type are present (Matyja, Kida 1988), were exposed for 24 h to a nutrient medium supplied with QUIN in a concentration of 10^{-3} M. Control cultures were kept in standard conditions. After 24 h of incubation with QUIN some of the experimental as well as control cultures were fixed for light microscopy and stained with cresyl violet, meanwhile the other cultures were processed for electron microscopy. These cultures were rinsed in cacodylate buffer pH 7.2, fixed in 1.5% glutaraldehyde for 1/2 h, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEM 100B electron microscope.

RESULTS

By light microscopy in all experimental groups of cultures (10, 14, 20 DIV) examined 24 h after exposure to QUIN no distinct morphological alterations could be noticed as compared with control cultures maintained in standard conditions. The neuronal organization and morphological characteristics of particular neurons visible in the explants seemed intact. Neither did the glial cells present in the explants and outgrowth zone exhibit any morphological changes.

Electronmicroscopic examination, however, revealed distinct ultrastructural alterations in mature, 21 DIV hippocampal cultures.

In 10 DIV hippocampal cultures examined 24 h after QUIN treatment no ultrastructural alterations could be detected. The nerve cells including both pyramidal and granule cells as well as glial cells were not damaged. The neuropil showed no abnormalities.

In 14 DIV cultures examined after exposure to QUIN neuronal cells of all distinguished types were undamaged and retained the same ultrastructural characteristics as the neurons observed in control cultures of the hippocampus

at the same stage of development *in vitro* (Fig. 1). Glial cells were also well preserved. In the neuropil, a mild swelling and clearing of some of the nerve cell processes was found. Axon processes and terminals were unchanged as compared with control cultures.

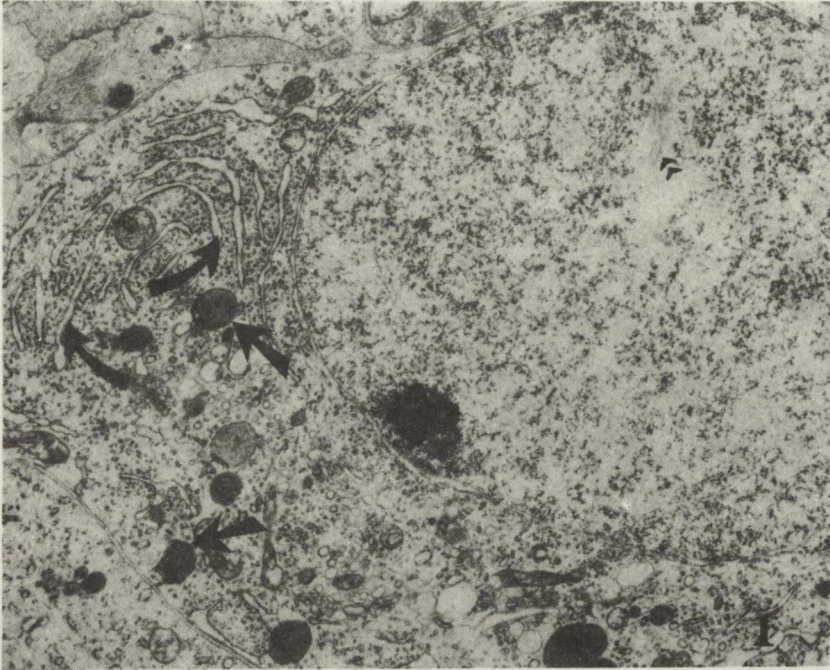


Fig. 1. Pyramidal basket cell in 15 DIV hippocampal culture, 24 h after QUIN application. Well preserved organelles and nucleus. Typical, parallel arrangement of granular endoplasmic reticulum channels (oblique arrows), internuclear rods (arrowheads) and dense bodies (straight arrows). $\times 2400$

Ryc. 1. Piramidowy neuron wstawkowy w 15-dniowej hodowli hipokampa 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Zachowane organelle komórkowe i jądro. Charakterystyczne, równoległe układy kanałów siatki ziarnistej (strzałki skośne), wtręty jądrowe (groty strzałek) oraz ciała gęste (proste strzałki). Pow. $2400 \times$

Hippocampal cultures maintained for 20 DIV and examined 24 h after QUIN treatment revealed distinct structural alterations involving neuronal cell somata and their processes. Among all neuronal cell types only pyramidal cells were affected, granule cells showed preservation of their ultrastructural pattern (Fig. 2). The alterations of pyramidal cells, including pyramidal-basket cells, varied in severity from cell to cell and involved only a certain number of them; the other pyramidal neurons remaining intact. Some of the affected pyramidal cells showed only mild swelling of the mitochondria and patchy clumping of polyribosomes in the cell cytoplasm leaving small, electron-lucent areas of the cell soma deprived of ribosomes (Fig. 3). In the other cells affected, swelling of the majority of mitochondria, numerous small vesicles and dense bodies could be seen, however the cell cytoplasm in these neurons was still very rich in cytoorganelles (Fig. 4). Axon terminals visible in their proximity or contacting

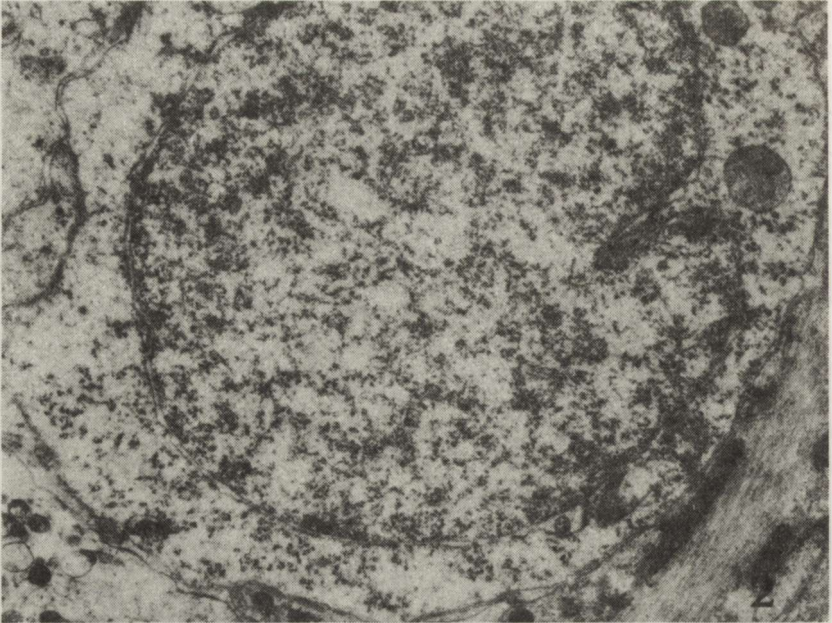


Fig. 2. Well preserved granule cell in 21 DIV culture 24 h after exposure to QUIN. $\times 6000$
Ryc. 2. Zachowana komórka ziarnista w 21-dniowej hodowli hipokampa 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Pow. 6000 \times

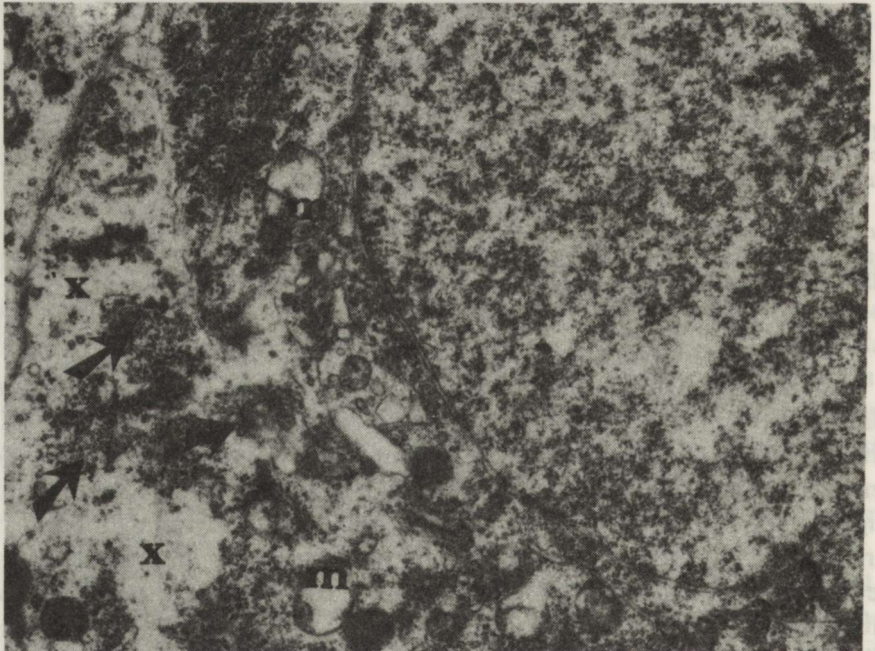


Fig. 3. Pyramidal basket cell in 21 DIV culture, 24 h after QUIN application. Swollen mitochondria (m), regional clumping of the polyribosomes (arrows) with concomitant electron-lucent areas of the cell cytoplasm (X). $\times 6000$

Ryc. 3. Piramidowy neuron wstawkowy w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Obrzmiałe mitochondria (m) i skupienia polirybosomów (strzałki) z wytworzeniem elektronowo-jasnych pól w cytoplazmie (X). Pow. 6000

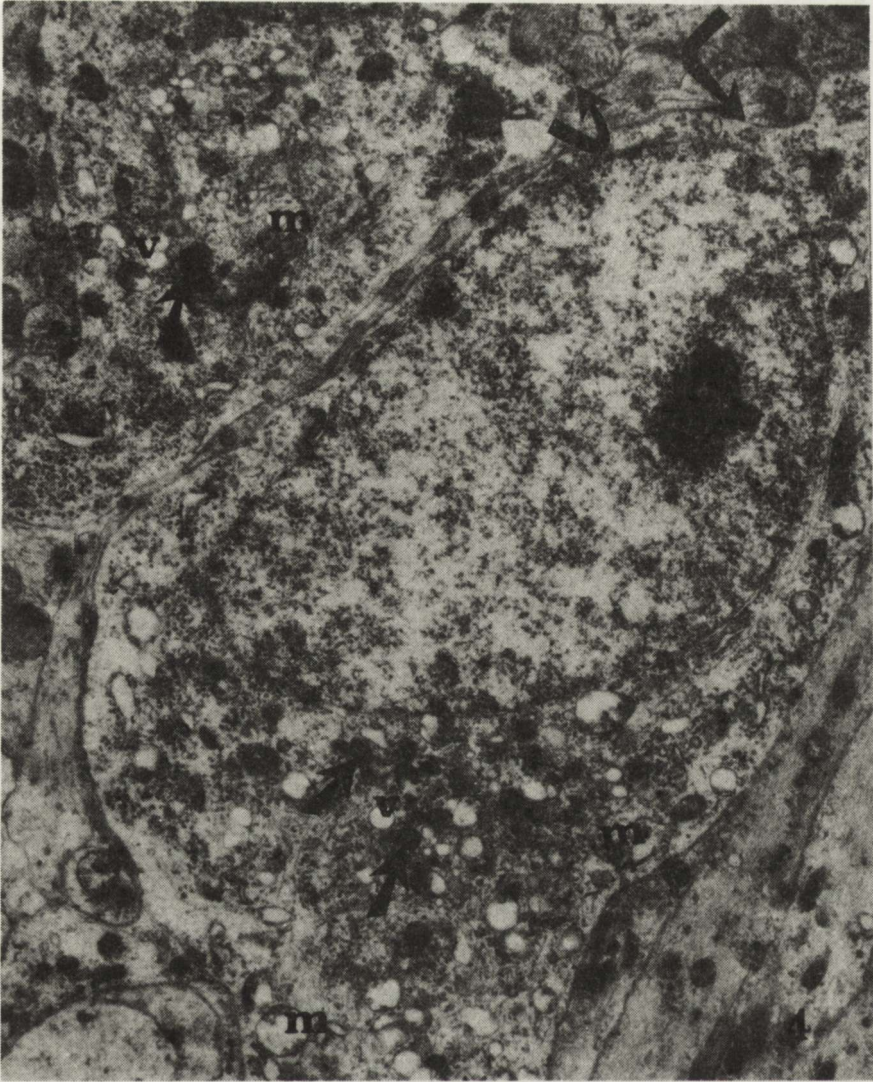


Fig. 4. Pyramidal neurons in 21 DIV culture 24 h after exposure to QUIN. Swollen and condensed mitochondria (m), vacuoles (v) and dense bodies (arrows). Intact axo-somatic contacts (oblique arrows). $\times 2400$

Ryc. 4. Komórki piramidowe w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Obrzmiałe oraz ciemne mitochondria (m), wakuole (v) oraz ciała gęste (strzałki). Prawdopodobnie zachowane synapsy akso-somatyczne (strzałki skośne). Pow. 2400 \times

these cells were intact. The most severely disturbed nerve cells were characterized by an abundant, swollen, electron-lucent cell cytoplasm containing only few, damaged organelles (Fig. 5). The ribosomes were dispersed, only very few of them attached to the channels of endoplasmic reticulum. The mitochondria were characterized by a dense matrix sometimes with disrupted cristae. A few, enlarged channels of endoplasmic reticulum could be seen. In the other

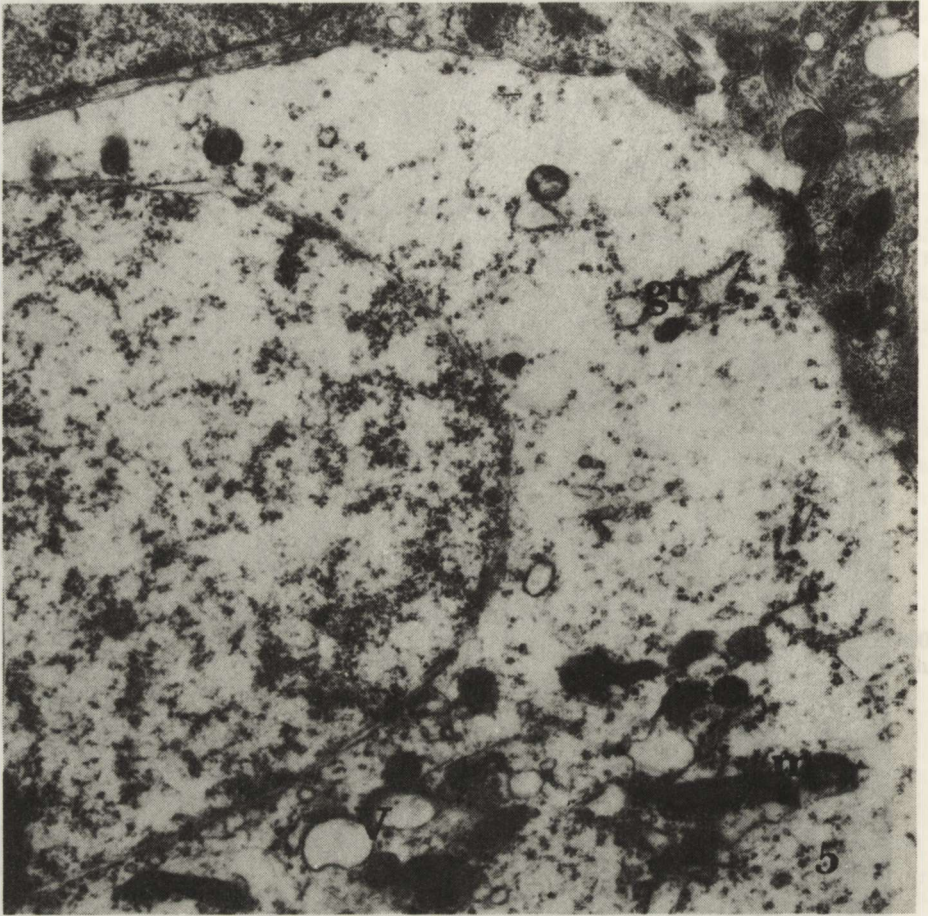


Fig. 5. Pyramidal neuron in 21 DIV culture 24 h after QUIN application. Swollen cell cytoplasm, dispersed ribosomes, vacuoles (v), dilated channels of granular endoplasmic reticulum (gr) and condensed mitochondria (m). Satellite glial cell (S). $\times 4800$

Ryc. 5. Komórka piramidowa w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Obrzmiała cytoplazma, rozsiane rybosomy, poszerzone kanały siatki ziarnistej (gr), ciemne mitochondria (m). Głej satelitarny (S). Pow. 4800 \times

affected nerve cells in addition numerous small vacuoles were observed. Even in these cells the nucleus was well preserved.

In the neuropil, axon processes and terminals showed no distinct ultra-structural alterations. Axon terminals contained variable amounts of synaptic vesicles, some of them densely packed (Fig. 6), others randomly scattered or accumulated near the presynaptic membrane, similarly to the pattern of axon terminals organization observed in the control cultures. Some dendritic processes, however, showed distinct structural alterations, not encountered in control cultures of the hippocampus. Some of the large dendrites visible in the explants showed enormous swelling and marked destruction of organelles with

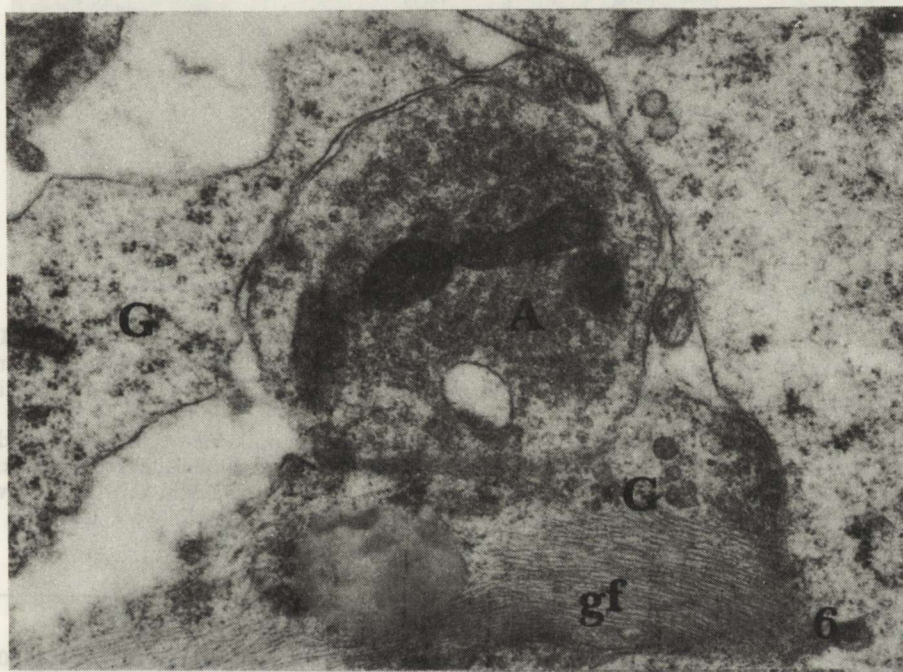


Fig. 6. Fragment of neuropil of 21 DIV culture 24 h after exposure to QUIN. Well preserved axon terminal (A) filled with numerous small, round synaptic vesicles surrounded by glial cell processes (G), one of which contains a bundle of gliofilaments (gf). $\times 9000$

Ryc. 6. Fragment neuropilu 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Prawidłowo zachowane zakończenie aksonalne (A) wypełnione licznymi małymi, okrągłymi pęcherzykami synaptycznymi otoczone wypustkami glejowymi (G), z których jedna zawiera pęczek włókienek glejowych (gf). Pow. $9000 \times$

preservation of only few polyribosomes, conspicuously swollen mitochondria and single microtubules (Fig. 7). Other dendritic processes were slightly swollen, clear and contained damaged mitochondria, single microtubules and vacuoles. A diminution and disarrangement of microtubules in the dendritic shafts was a constant feature as compared with their organization observed in control cultures (Fig. 8a,b, c). Some of dendritic expansions besides normal

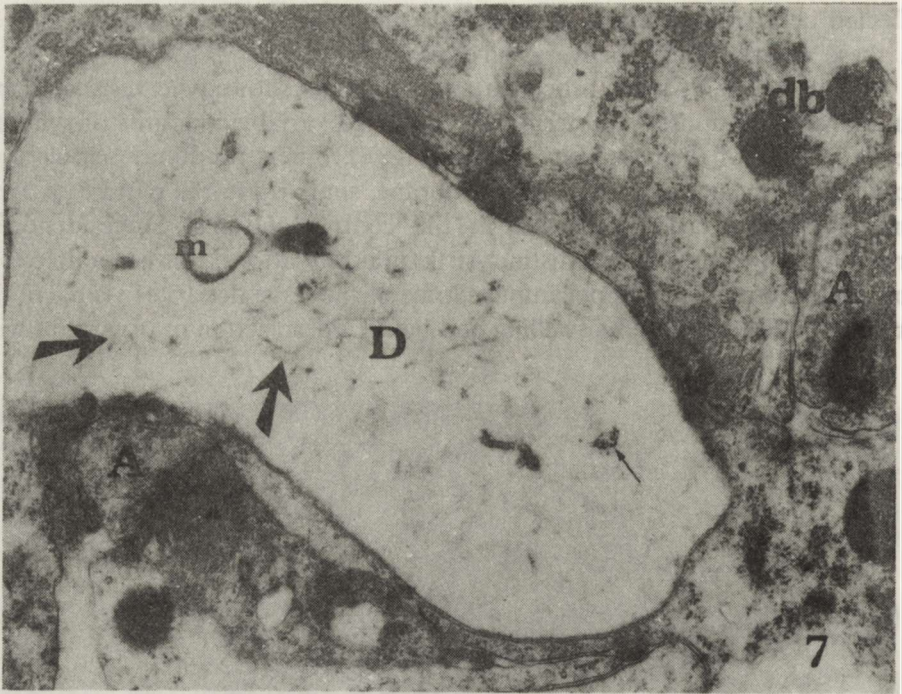
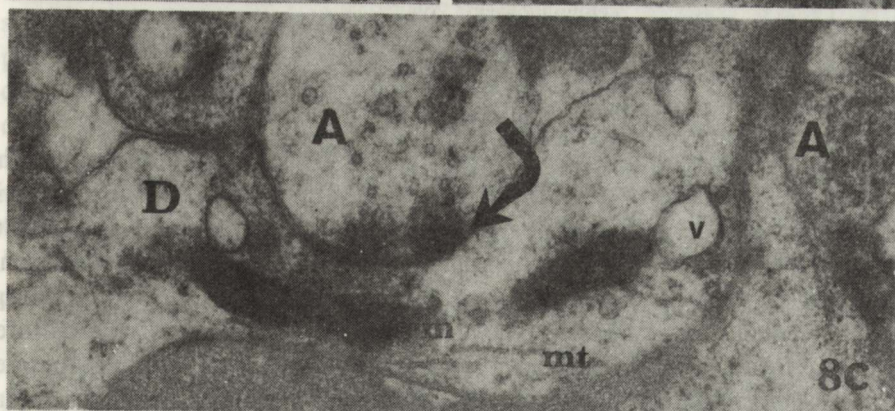
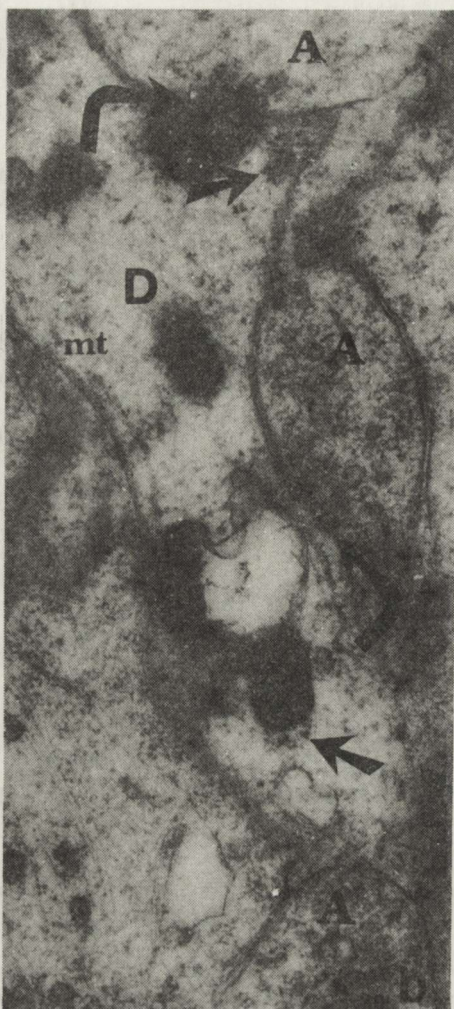


Fig. 7. Electron-lucent, swollen dendritic process (D) in 21 DIV culture 24 h after QUIN application with short disarranged microtubules (thick arrows), few ribosomes (thin arrows) and damaged mitochondrion (m). Intact axon terminals (A). Dense bodies in the adjacent glial processes (db). $\times 6000$

Ryc. 7. Elektronowo jasna, obrzmiąta wypustka dendrytyczna (D) w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego z krótkimi, bezładnie ułożonymi mikrotubulami (grube strzałki), pojedynczymi rybosomami (cienkie strzałki) i uszkodzonym mitochondrium (m). Prawidłowe zakończenia aksonalne (A). Ciała gęste w wypustkach glajowych (db). Pow. $6000 \times$

Fig. 8. Dendritic profiles in control and experimental 21 DIV hippocampal cultures. $\times 9000$. *a* – Control culture with axo-dendritic contact (oblique arrow). Numerous parallel arrays of microtubules (mt) and abundant ribosomes (arrows) in dendritic profile (D). A-axon terminal. *b* – Axo-dendritic synapses (oblique arrows) in the culture 24 h after QUIN application. Electron-lucent appearance of dendritic shaft (D) with disarranged microtubules (mt) and few ribosomes (arrows). Well preserved axon-terminals (A). *c* – Axo-dendritic contact (oblique arrow) in the culture 24 h after QUIN application. Mitochondria (m), vacuoles (v) and disarranged microtubules (mt) in dendritic profile (D). Intact axon terminals (A)

Ryc. 8. Wypustki dendrytyczne w 21-dniowej hodowli kontrolnej i doświadczalnej. Pow. $9000 \times$ *a* – Hodowla kontrolna. Synapsa akso-dendrytyczna (strzałka skośna). Liczne, równoległe ułożone mikrotubule (mt) oraz rybosomy (strzałki) w wypustce dendrytycznej. A – zakończenie aksonalne. *b* – Synapsy akso-dendrytyczne (strzałki skośne) w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Elektronowo-jasna cytoplazma wypustki dendrytycznej (D) z bezładnie ułożonymi mikrotubulami (mt) i pojedynczymi rybosomami (strzałki). Prawidłowo zachowane zakończenia aksonalne (A). *c* – Synapsa akso-dendrytyczna (strzałka skośna) w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Mitochondria (m), wakuole (v) i bezładnie ułożone mikrotubule (mt) w wypustce dendrytycznej (D). Prawidłowe zakończenia aksonalne (A)



organelles contained numerous electron dense bodies. Dendritic alterations were independent of the type of axon terminals contacting them. The glial cells, including their somata and processes were not damaged (Fig. 9).

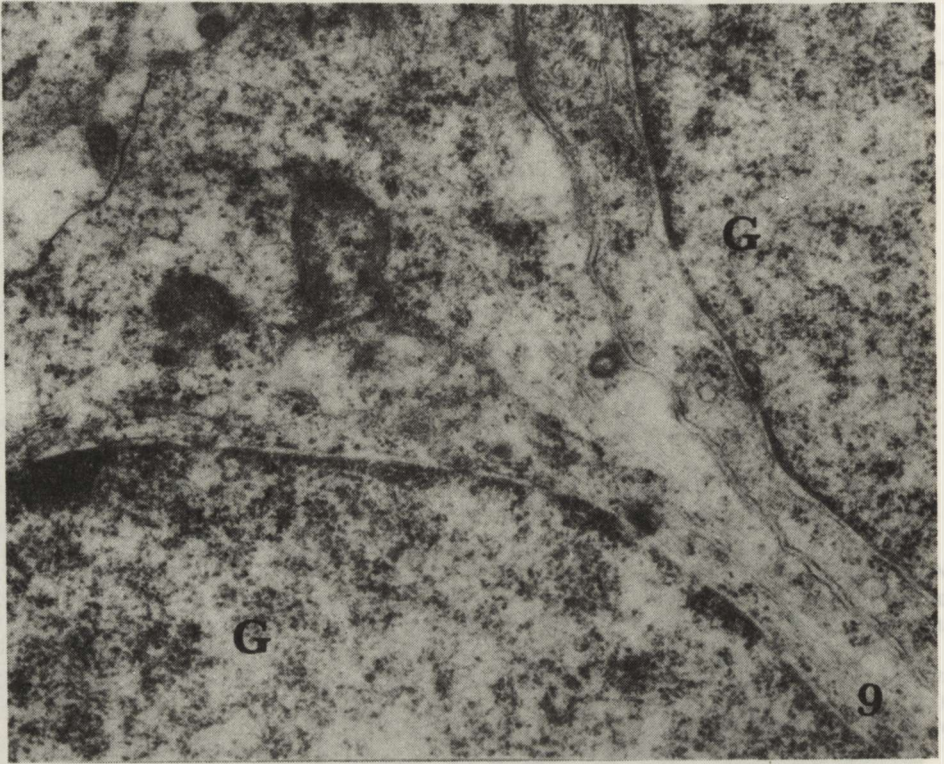


Fig. 9. Intact glial cells (G) in 21 DIV culture 24 h after exposure to QUIN. $\times 9000$
 Ryc. 9. Prawidłowe komórki glejowe (G) w 21-dniowej hodowli 24 godz. po podaniu kwasu chinolinowego. Pow. $9000\times$

DISCUSSION

Previous experiments *in vitro* performed in organotypic cultures of the cortex or cortex-striatum co-cultures showed the axon-sparing, postsynaptic character of QUIN-induced morphological lesions, similar to the results obtained *in vivo*. The neuron cell somata in the cultures studied revealed no deep alterations since the only structural abnormalities were confined to Golgi apparatus dilatations (Whetsell, Schwarcz 1983). In our organotypic cultures of the hippocampus, however, after similar QUIN doses applied, besides neuropil abnormalities manifested by dendritic swellings also pyramidal neurons exhibited distinct morphological changes. It was earlier documented that the hippocampus, besides the striatum and globus pallidus, belongs to the

brain areas particularly susceptible to QUIN (Schwarcz, Köhler 1983). Moreover, a difference in the pharmacodynamics of the neocortical and hippocampal receptors for NMDA and/or quisqualate was postulated (Perkins, Stone 1985). Our findings demonstrating higher than previously reported for cortex vulnerability of hippocampus to QUIN action might support this hypothesis.

Young hippocampal cultures in our experiments were resistant to QUIN-induced toxicity, neither did granule cells in 21 DIV cultures. This age-dependent QUIN neurotoxicity and selective vulnerability of particular brain areas for QUIN was revealed earlier by *in vivo* and *in vitro* studies (Foster et al. 1983; Whetsell, Schwarcz 1983, Victorov et al. 1987). In the hippocampus proper, as previously demonstrated *in vivo*, most sensitive for QUIN action were CA1 pyramidal cells (Schwarcz et al. 1984a). In our material structural changes of pyramidal nerve cells ranged distinctly, moreover, besides altered cells, well preserved pyramidal neurons with intact ultrastructural characteristics could be seen. The character of morphological changes, however, was similar in all more severely affected nerve cells and consisted of conspicuous swelling of the cell somata with diminution of the number of organelles and almost total disappearance of ribosomes. The nucleus, however, usually showed no deep abnormalities. The alterations observed seem thus not to be definitively irreversible. The finding that pyramidal neurons damage was not widespread and spared numerous neurons in our cultures may be due to various factors. The absence of QUIN receptors on these unaffected neuronal processes, their inappropriate density or their later development should be considered. It might also, however, be linked with the lack of their proper afferents in tissue culture conditions, since even smaller than presently used doses of QUIN applied to the hippocampus *in situ*, were sufficient to destroy all pyramidal layers (Foster et al. 1983).

The precise mechanisms of the neurotoxic action of QUIN as well as other neurotoxic amino acids remains unclear. The results of previously performed studies suggest that neurotoxicity could be closely related to the excitatory properties of these compounds (Stone 1985). The type of morphological changes observed in our material resembles non-dark cell degeneration and dendritic abnormalities found in the hippocampus *in vivo* after electrical stimulation of the perforant path axons (Olney et al. 1983). Dendritic damage was also induced by other neurotoxins like kainic acid or glutamate (Stone, Connick 1987) or after transient cerebral ischemia (Johansen et al. 1984). Recently, a common pathogenetic mechanism for these conditions has been proposed, attributing the morphological lesions to the abnormal, excessive influx of particular ions to the cell soma. Among these ions: calcium (Simon et al. 1984, Choi 1985) or sodium and chloride are under consideration (Rothman 1985; Olney et al. 1986). Moreover, two different simultaneous mechanisms responsible for the toxic action of excitatory amino acids were postulated (Olney 1987). The early produced lesions characterized by promi-

ment neuronal swelling might result from other ions disturbances, rather from sodium and chloride influx, than the calcium-dependent late developed damage responsible for dark cell degeneration and finally cell death. In our material we only found nerve cells with pronounced swelling, no dark ones could be found.

According to the previously performed studies, no distinct glial cell alterations could be observed in our cultures. However, it has recently been evidenced that numerous astroglial cells exhibited specific 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase immunoreactivity (Köhler et al. 1987), thus indicating that glial cells play an important role in QUIN metabolism.

The present study showed that the hippocampal organotypic culture provides a very suitable model for further investigations on the mechanisms underlying QUIN neurotoxicity as it permits to evaluate the direct effect of this compound in an appropriately modified environment.

WPLYW KWASU CHINOLINOWEGO NA ULTRASTRUKTURĘ HIPOKAMPA *IN VITRO*

Streszczenie

Przeprowadzono wstępne badania mające na celu ustalenie charakteru i rozległości uszkodzeń strukturalnych w obrębie poszczególnych elementów komórkowych hipokampa podczas procesu rozwoju i dojrzewania w warunkach organotypowej hodowli tkankowej. Wykazano zaoszczędzenie komórek ziarnistych, niektórych komórek piramidowych, wypustek aksonalnych oraz komórek glejowych. Stwierdzono natomiast w hodowlach dojrzałych, 20-dniowych, zmiany strukturalne nie tylko wypustek dendrytycznych, ale także niektórych spośród komórek piramidowych. Wskazuje to, że hipokamp dzięki szczególnej wrażliwości na cytotoksyczne działanie kwasu chinolinowego reprezentuje strukturę dogodną do prowadzenia dalszych badań, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw cytotoksycznego działania kwasu chinolinowego.

ВЛИЯНИЕ ХИНОЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГИПОКАМПА *IN VITRO*

Резюме

Проведены предварительные исследования влияния хинолиновой кислоты на характер и распространенность структурных повреждений отдельных клеточных элементов гиппокампа в ходе развития и созревания в органооптической культуре ткани. Обнаружена сохранность клеток-зерен, некоторых пирамидных клеток, аксиональных отростков и глиальных клеток. Однако, в зрелых 20-дневных культурах найдены повреждения не только дендритических отростков, но также и некоторых пирамидных клеток. Это показывает, что, благодаря особой чувствительности к влиянию хинолиновой кислоты, гиппокамп является подходящей структурой для дальнейших исследований, раскрывающих механизмы цитотоксического воздействия хинолиновой кислоты.

REFERENCES

1. Choi D. W.: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett.*, 1985, 58, 293–297.
2. Foster A. C., Collins J. F., Schwarcz R.: On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology*, 1983, 22, 1331–1342.
3. Heyes M. P., Garnett E. S., Brown R. R.: Normal excretion of quinolinic acid in Huntington's disease. *Life Sci*, 1985, 37, 1811–1816.
4. Johansen F. F., Jørgensen M. B., Ekström von Lubitz D. K. J., Diemer N. H.: Selective dendritic damage in hippocampal CA1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res.*, 1984, 291, 373–377.
5. Köhler C., Flood P., Okuno E., Schwarcz R.: Comparative immunocytochemical analysis of 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the rat brain. *Neuroscience Abstr.* 1987, suppl 22, 306.
6. Matyja E., Kida E.: Dynamics of rat hippocampus development in organotypic tissue culture. Light and electron microscopic study. *Neuropat. Pol.*, 1988, 26, (in press).
7. Moroni F., Lombardi G., Moneti G., Aldinio C.: The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its content increases during the aging process. *Neurosci Lett.*, 1984, 47, 51–55.
8. Olney J. W., deGubareff T., Sloviter R. S.: "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of the acute hippocampal pathology. *Brain Res. Bull.*, 1983, 10, 699–712.
9. Olney J. W., Price M. T., Samson L., Labruyere J.: The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.*, 1986, 65, 65–71.
10. Olney J. W.: Selective neuronal death. In: Endogenous excitotoxic agents. Eds.: G. Bock, M. O'Connor, Ciba Foundation Symposium 126, J. Wiley and Sons Ltd, 1987, 214–220.
11. Perkins M. N., Stone T. W.: Quinolinic acid: a regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res.*, 1983, 259, 172–176.
12. Perkins M. N., Stone T. W.: Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Neurol.*, 1985, 88, 570–579.
13. Rothman S. M.: The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.*, 1985, 5, 1483–1489.
14. Schwarcz R., Köhler C.: Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett.*, 1983, 38, 85–90.
15. Schwarcz R., Whetsell W. O., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
16. Schwarcz R., Brush G. S., Foster A. C., French A. S.: Seizures activity and lesions after intrahippocampal quinolinic acid injections. *Exp. Neurol.*, 1984a, 84, 1–17.
17. Schwarcz R., Foster A. C., French E. D., Whetsell W. O., Köhler C.: Excitotoxic model for neurodegenerative disorders. *Life Sci.*, 1984b, 35, 19–32.
18. Schwarcz R., Bird E. D., Whetsell W. O.: The quinolinic acid synthesizing enzyme is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Neuroscience Abstr.*, 1987, suppl 22, 453.
19. Simon R. P., Griffith T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selective vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischaemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.*, 1984, 4, 350–361.
20. Stone T. W., Perkins M. N.: Actions of excitatory amino acids and kynurenic acid in the primate hippocampus: a preliminary study. *Neurosci Lett.*, 1984, 52, 335–340.
21. Stone T. W.: Differences of neuronal sensitivity to amino acids and related compounds in the rat hippocampal slice. *Neurosci Lett.*, 1985, 59, 313–317.

22. Stone T. W., Connick J. H.: Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience*, 1985, 15, 597-617.
23. Stone T. W., Connick J. H., Winn P., Hastings M. H., English M.: In: *Selective neuronal death. Endogenous excitotoxic agents*. Eds. G. Bock, M. O'Connor, Ciba Foundation Symposium 126, J. Wiley and Sons Ltd., 1987, 204-220.
24. Whetsell W. O., Schwarcz R.: The organotypic tissue culture model of corticostriatal system for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: Studies on kainic acid, quinolinic acid and *l*-2-amino-7-phosphoheptanoic acid. *J. Neural. Transm.* 1983, suppl., 19, 53-63.
25. Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Poster A. C., Whetsell W. O., Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett.*, 1983, 41, 247-257.
26. Victorov I. V., Khaspekov L. G., Kida E.: Neurocytotoxic effect of quinolinic acid on hippocampal, neocortical and septal neurons in cell culture. Light and electron microscopic study. VIIIth Conference of the Association of Polish Neuropathologists and Vth Polish-Hungarian Neuropathological Symposium, Gdansk, June 1987. Abstr. p. 71.

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

MAREK PIETRZAK

INFLUENCE OF VINCRIStINE ON THE NEUROSECRETORY NUCLEI OF THE HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSEAL SYSTEM OF THE DEVELOPING RAT

Department of Developmental Neurology, School of Medicine, Poznań

The toxic effects of antineoplastic drugs are now the most important limitation of the therapy of neoplasms. The developing nervous system is particularly susceptible to toxic agents (Grobe, Palm 1972; Dietrich 1979). Vincristine is one of *Vinca rosea* alkaloids used for the treatment of leukaemias, lymphomas, reticulo-endothelial system neoplasms and some brain tumors. The most frequent side effects of vincristine are due to its neurotoxicity (Rosenthal, Kaufman 1974; Goldberg et al. 1982). Usually only the peripheral nervous system is affected, but seizures, disturbances of consciousness, focal symptoms and inadequate antidiuretic hormone secretion have also been reported (Grobe, Palm 1972; Rosenthal, Kaufman 1974; Goldberg et al. 1982). Intrathecal administration of vincristine caused particularly severe myeloencephalopathy with fatal outcome (Schochet et al. 1968; Slyter et al. 1980; Gaidys et al. 1982). The aim of this study was to investigate the influence of therapeutic doses of vincristine administered during the first week of life on the development of the hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretory system of the rat.

MATERIAL AND METHODS

Wistar albino rats (26) of either sex were received 0.03 mg/kg b. wt. of vincristine (Vincristin Richter H) intraperitoneally on the 3rd, 5th and 7th day after birth. The control rats received intraperitoneal injections of 0.9% saline. The animals were kept with their mothers in standard laboratory conditions until sacrificed by decapitation on the 8th, 15th and 30th day of life. The brains and hypophyses were promptly removed and fixed in Bouin fixative for immunohistochemistry and in Zenker-formol fixative for other methods. After dehydration in ethanol the material was embedded in paraffin. Serial transverse 7µm thick sections were cut caudally from the optic chiasm. The sections

were deparaffinized and stained with Gomori chromohematoxylin and cresyl violet. Neurophysin was demonstrated by the unlabeled antibody method and the peroxidase-antiperoxidase (PAP) complex technique as described by Sternberger (1979). The anti-neurophysin serum (Rb 42-2 Apr 78) used was kindly provided by Dr. M. V. Sofroniew, University of Oxford, U. K. The specificity of immunostaining was assessed by the use of normal pre-immune rabbit serum or anti-neurophysin serum absorbed by addition of excess (7.5 µg/ml) of neurophysin. The tests always yielded negative results.

Karyometric measurements were performed in the neurocytes in supraoptic nuclei (SON) and paraventricular nuclei (PVN) of the hypothalamus with the use of an ocular micrometer.

Immediately after decapitation, blood from cervical vessels was collected for osmolality measurements. Plasma osmolality was measured with a Fiske Osmometer by the freezing-point depression.

RESULTS

The young rats subjected to vincristine injections showed decreased motor activity, although there were no symptoms of paresis in their limbs. Their body weight gain was slower than in intact animals as shown in Table 1. Three out of 26 experimental rats were losing their hair.

Table 1. Body weight gain of control and vincristine-treated rats

Tabela 1. Przyrost ciężaru ciała u szczurów kontrolnych i otrzymujących winkrystynę

Age (days) Wiek (dni)	Control group Grupa kontrolna	Experimental group Grupa doświadczalna	
8	13.42 ± 3.81	10.48 ± 2.48	
15	30.37 ± 3.57	25.87 ± 3.06	p < 0.05
30	96.95 ± 20.21	69.08 ± 16.65	p < 0.01

p – calculated according to Student's t-test

p – obliczone wg testu t Studenta

Number of animals in each group 9

Liczba zwierząt w każdej grupie 9

Neurophysin immunohistochemistry

Control group: 8 days after birth neurophysin-positive neurocytes were seen in the SON and PVN of the hypothalamus. Scarcely immunoreactive cells were scattered in the anterior hypothalamus outside these nuclei. Neurophysin containing fibers were demonstrated in the area between SON and PVN and dorsally to the lateral parts of the optic chiasm. Most of the neurocytes in the SON were neurophysin-positive, but they differed in the content of neurophysin. Cells showing moderate amounts of neurophysin were the most

numerous. The neurophysin-negative neurons were prevalent in the dorsal parts of the SON. At the age of 8 dys, only few neurocytes in the PVN were neurophysin-positive (Fig. 1). Fibers staining positively with anti-neurophysin serum were present in the neurohypophysis. No staining for neurophysin was seen either in the cytoplasm of pituicytes in cells of the intermediate and anterior lobes.

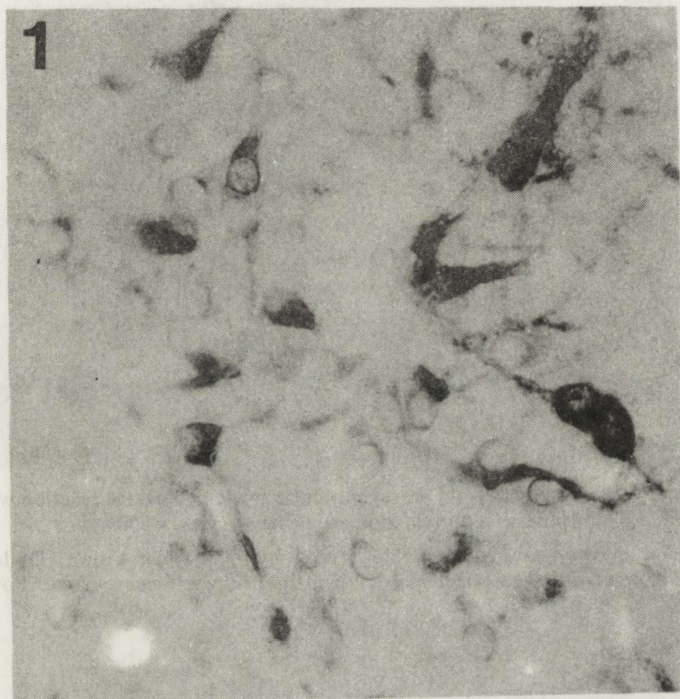


Fig. 1. Control rat 8-day-old. Paraventricular nucleus. Only few neurocytes contain neurophysin in the cytoplasm. PAP reaction with antineurophysin serum. $\times 500$

Ryc. 1. Szczur kontrolny, 8-dniowy. Jądro przykomorowe. Tylko nieliczne neuroocyty zawierają neurofizynę w cytoplazmie. Reakcja PAP z surowicą przeciwno neurofizynie. Pow. $500\times$

Fifteen days after birth, neurophysin-positive neurons were found in SON and PVN and a few were scattered in the anterior hypothalamic area. Several neurocytes in the suprachiasmatic nuclei showed a faint staining with anti-neurophysin serum. The content of neurophysin in the neuronal processes was increased as compared with that in 8-day-old rats. The majority of the neurocytes in the SON showed moderate or weak staining. There were few cells heavily stained with neurophysin and some neurons still remained neurophysin-negative. In PVN cells, the content of neurophysin was uneven, but there were significantly fewer neurophysin-negative neurocytes than in the group of 8-day-old animals. The content of neurophysin in the neuronal

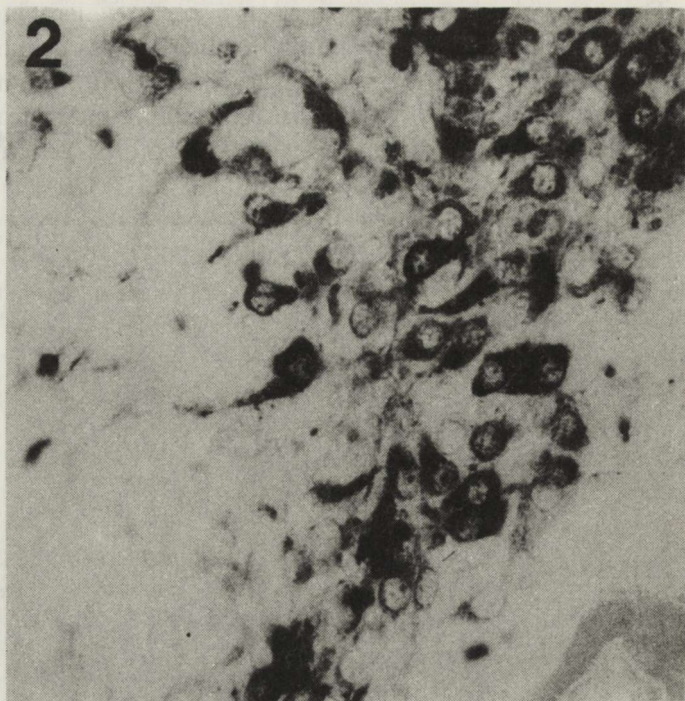


Fig. 2. Vincristine treated rat 8-day-old. Paraventricular nucleus. Positive reaction with antineurophysin serum in numerous neurocytes. $\times 500$

Ryc. 2. Szczur 8-dniowy traktowany winkrystyną. Jądro przykomorowe. Dodatnia reakcja z przeciwciałami przeciwko neurofizynie w cytoplazmie licznych neurocytów. Pow. $500 \times$

processes in the neurohypophysis was similar to that observed at the age of 8 days.

Thirty days after birth, the neurophysin-positive neurons were located in SON, PVN and in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, but in the latter, the content of neurophysin was significantly lower than in both magnocellular nuclei. Similarly to the younger animals, there were few neurophysin-positive neurocytes scattered throughout the anterior hypothalamic area, sometimes gathered around the blood vessels. The neuronal processes in the hypothalamo-hypophyseal tract showed markedly heavier staining with anti-neurophysin serum than in the other age groups. The content of neurophysin in the neurocytes in the SON and PVN differed widely. There were fewer neurophysin-negative cells as compared with the younger rats. The axons in the neurohypophysis accumulated more neurophysin than in 8- and 15-day-old animals.

Vincristine-treated group: 24 hours after the last injection of vincristine the distribution of neurophysin-positive neurons was similar to that observed in

8-day-old control rats. The neurocytes moderately and heavily stained by the anti-neurophysin serum were more numerous in the SON, but neurophysin-negative cells were still present. In the PVN neurons that did not bind the antibodies against neurophysin in the cytoplasm were scarce and the major part of the magnocellular neurons showed moderate and heavy staining (Fig. 2). The content of neurophysin in the neurohypophysis was increased as compared with that in control animals at this age.

The amount and distribution of neurophysin in the neurocytes in the SON and in the hypothalamo-neurohypophyseal tract of 15-day-old rats treated with vincristine was not altered in comparison with controls. In the PVN cells moderately and heavily stained with the anti-neurophysin serum were more numerous than in the 15-day-old animals from the control group. Still few neurocytes remained neurophysin-negative. The axonal processes in the neurohypophysis showed weaker staining for neurophysin than in intact rats.

At the age of 30 days, the neurons in the SON and PVN of rats that had been treated with vincristine in the first week of extrauterine development showed no alterations in the binding of antibodies against neurophysin. The content of neurophysin in the neurohypophysis was slightly decreased as compared with that in the control animals.

Gomori chrome-hematoxylin staining

Control group: Only few neurocytes in the SON and PVN of 8-day-old rats contained small amounts of the neurosecretory material in the cytoplasm. No Gomori-positive deposits could be seen in the neuronal processes (Fig. 3). Neurosecretory material was present in the neurohypophysis. Fine Gomori-positive granules were located along the axonal processes and around blood vessels throughout the neural lobe, but they did not form Herring bodies commonly seen in adult animals.

At the age of 15 days, the major part of the neurocytes in the SON and PVN still remained Gomori-negative. There were more neurons containing small and moderate amounts of the neurosecretory material than in 8-day-old rats. Only few cells showed intense staining with chrome-hematoxylin. The neurosecretory material in the neuronal processes was scarcely seen in the hypothalamus. The axons in the neurohypophysis contained more Gomori-positive grains than in 8-day-old animals. In 30-day-old rats, the content and distribution of the neurosecretory material in the magnocellular hypothalamic nuclei were similar to those found in adult animals. Neurocytes containing moderate and small amounts of Gomori-positive granules predominated in the cytoplasm but heavily stained cells were more numerous than in younger rats. The neuronal processes in the hypothalamus contained considerably more neurosecretory material at this age. Accumulation of the neurosecretory material in the neurohypophysis with the formation of Herring bodies was also observed.

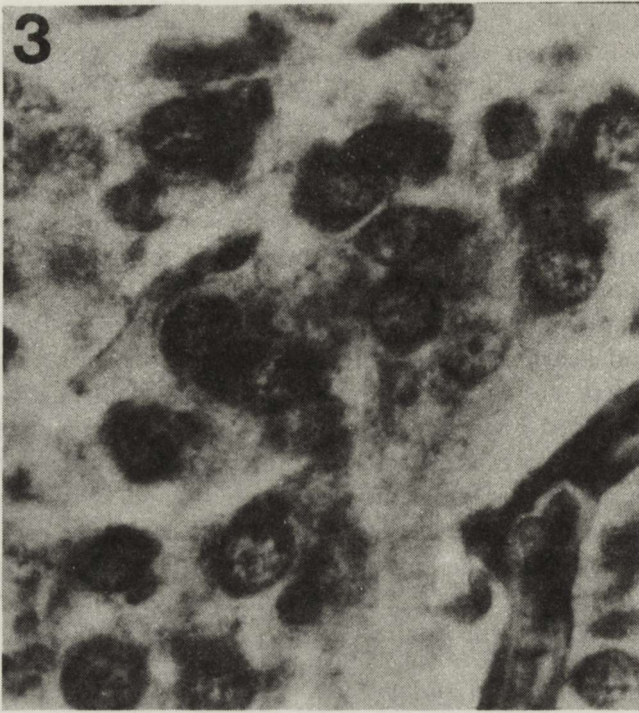


Fig. 3. Control rat 8-day-old. Paraventricular nucleus. Small amounts of neurosecretory material are present in some few neurocytes. Gomori chrome-hematoxylin. $\times 1200$

Ryc. 3. Szczur kontrolny 8-dniowy. Jądro przykomorowe. Niewielka zawartość neurosekreту w pojedynczych neurocytach. Hematoksylina chromowa Gomoriego. Pow. $1200 \times$

Vincristine treated group: The 8-day-old rats subjected previously to intraperitoneal vincristine showed clearly an increased content of neurosecretory material in the cytoplasm of the neurocytes in the SON and PVN, though the staining with chrome-hematoxylin was still weak in most of the cells. Gomori-positive grains were present also in the neuronal processes (Fig. 4). The amount of neurosecretory substance in the neurohypophysis was increased as compared with that in intact rats at this age.

At the age of 15 days, neurocytes containing small and moderate amounts of Gomori-positive granules in the cytoplasm predominated in the magnocellular hypothalamic nuclei. Cells that did not stain with chrome-hematoxylin were few. There was more neurosecretory material in the processes visible in the nuclei and along the hypothalamo-neurohypophyseal tract, but in the neurohypophysis, the axonal endings contained less Gomori-positive deposits than in the control group.

The amount of the Gomori substance in the cytoplasm of the perikarya of the neurosecretory cells in the SON and PVN was unchanged on the 30th day

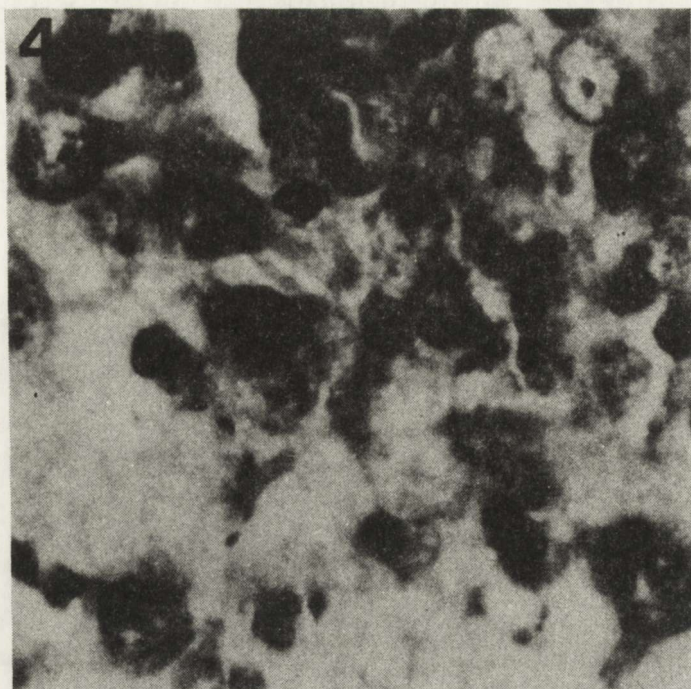


Fig. 4. Vincristine-treated rat 8-day-old. Paraventricular nucleus. Increased content of neurosecretory material in the cytoplasm of the neurocytes. Neurosecretory material can be also seen in the axons. Gomori chrome-hematoxylin. $\times 1200$

Ryc. 4. Szczur 8-dniowy traktowany winkrystyną. Jądro przykomorowe. Zwiększona zawartość neurosekretu w cytoplazmie neurocytów. Widoczna również niewielka ilość materiału neurosekrecyjnego we włóknach aksonalnych. Hematoksylina chromowa Gomoriego. Pow. $1200 \times$

of life, as compared with the control animals. Still, the neuronal processes in the hypothalamus and in the neurohypophysis contained more of the neurosecretory material.

Cresyl violet staining

Control group: 8 days after birth, the neurosecretory cells in the SON and the PVN showed features of immaturity. Their small size, bipolar shape with narrow cytoplasm often seen only in the poles of the perikaryon and relatively big nuclei made them hardly distinguishable from other neurons from adjacent parts of the hypothalamus. Nissl substance was usually localized on the periphery of the cytoplasm.

The size of neurocytes in the SON and PVN increased gradually at the age of 15 and 30 days, mainly by expansion of the cytoplasmic area.

Vincristine treated group: One day after the last injection of vincristine,

staining with cresyl violet did not show any pathological changes in the magnocellular neurosecretory nuclei of the hypothalamus. In the SON, the neurocytes did not show any changes either on the 15th or 30th day of life. A few neurosecretory cells in the PVN were shrunk and darkly stained 15 days after birth and on the 30th day the features of degeneration were even more pronounced. There was no glial proliferation around degenerating neurons (Fig. 5).

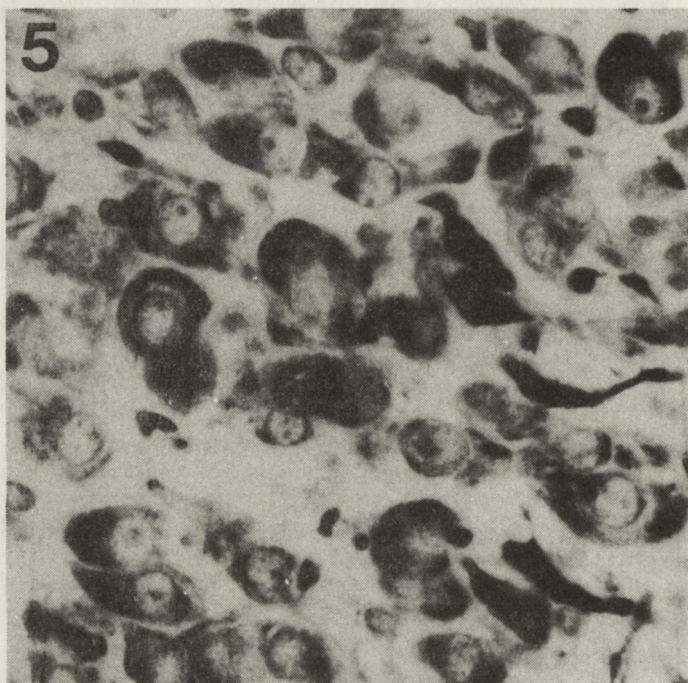


Fig. 5. Vincristine-treated rat 30-day-old. Paraventricular nucleus. Degeneration of the neurosecretory neurons. Cresyl violet. $\times 800$

Ryc. 5. Szczur 30-dniowy traktowany winkrystyną. Jądro przykomorowe. Zmiany zwyrodnieniowe w komórkach neurosekrecyjnych. Fiolet krezyłu. Pow. $800\times$

Morphometry

The results of measurements of the cross-section area of nuclei of neurocytes in the SON and PVN are shown in Table 2. In rats subjected to vincristine, the neurocytes in the SON did not show any statistically significant changes in the growth of their nuclear volume. In the PVN, the mean cross-section area was smaller than in the control animals on the 8th and 15th day, it then increased above the values observed in the control group on the 30th day.

Table 2. Mean cross-section area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$) of the nuclei of neurosecretory neurons
 Tabela 2. Średnie pole przekroju jąder ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$) neuronów neurosekrecyjnych

Age (days) Wiek (dni)		Control group Grupa kontrolna	Experimental group Grupa doświadczalna	
8	SON	23.66 ± 0.40	22.78 ± 0.44	p > 99%
	PVN	32.22 ± 0.43	30.22 ± 0.40	
15	SON	29.40 ± 0.46	28.74 ± 0.40	p > 99%
	PVN	34.98 ± 0.45	32.86 ± 0.44	
30	SON	41.00 ± 0.57	40.06 ± 0.64	p > 95%
	PVN	42.96 ± 0.67	45.12 ± 0.67	

SON – nucleus supraopticus

PVN – nucleus paraventricularis

p – confidence level

p – poziom ufności

Plasma osmolality

The results of plasma osmolality measurements are shown in Table 3. In rats treated with vincristine, increased plasma osmolality was observed on the 8th and 15th day of life.

Table 3. Plasma osmolality (mOsm/kg ± SD) of control and vincristine-treated rats
 Tabela 3. Osmolalność surowicy (mOsm/kg ± SD) u szczurów kontrolnych i otrzymujących winkrystynę

Age (days) Wiek (dni)	Control group Grupa kontrolna	Experimental group Grupa doświadczalna	
8	282.20 ± 6.34	316.33 ± 6.02	p < 0.001
15	303.13 ± 7.90	318.60 ± 7.14	p < 0.01
30	295.45 ± 12.34	301.25 ± 10.89	

p – calculated according to Student's t-test

p – obliczone wg testu t Studenta

DISCUSSION

The investigations performed hithero on the developing rat hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system have demonstrated the appearance of Gomori chromematoxylin stainable neurosecretory material on the second day of extrauterine life in the neurohypophysis, on the 6th day in neurocytes in SON and on the 18th day in the axons in the hypothalamus (Rinne, Kivalo 1964). Staining with aldehyde fuchsin and ultrastructural investigations made it possible to detect the neurosecretory material in the hypothalami of rat fetuses (Rinne, Kivalo 1964; Fink, Smith 1971). As in other animals, postnatal development of the rat SON precedes that of the PVN (Diepen et al. 1954; Rodeck, Caesar 1956; Kivalo, Talanti 1957; Donew 1970; Ellis, Watkins 1975).

The presence of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the neurohypophysis and the hypothalamus of the neonatal rats was also confirmed by biological and radioimmunological methods, but the levels of the neurohormones detected were many times lower than in adult animals and increased during extrauterine development. The ratios of vasopressin to oxytocin and neurophysin to hormone differed from those observed in adult rats, largely owing to a molar excess of vasopressin, and reached normal values on the 30th day (Dicker, Tyler 1953; Heller, Lederis 1959; Sinding et al. 1980a). The response to physiological stimuli such as dehydration was also immature during the first month of life (Sinding et al. 1980b). The results of this study confirmed the presence of the Gomori-positive neurosecretory material at the age of 8 days in the neurohypophysis and in a few neurocytes in the SON and PVN of intact rats. By using a much more sensitive immunohistochemical method, neurophysin was demonstrated in the majority of the neurocytes in the SON and in few neurocytes only in the PVN. Administration of vincristine during the first week of life caused an accumulation of neurophysin in the neurosecretory cells 24 hours after the last dose of the cytostatic, as demonstrated by the immunoenzymatic method and by chrome-hematoxylin staining. The changes were more conspicuous in the PVN than in the SON. Similar results were observed in adult rats after intraventricular injections of vincristine (Flament-Durand et al. 1975). The vincristine induced accumulation of neurophysin decreased on the 15th day after birth and at the age of 30 days the content of neurophysin was normal.

Data on the pathomorphology of the developing hypothalamo-neurohypophyseal system are scarce. Delayed maturation of the magnocellular hypothalamic nuclei manifested by a decreased content of the neurosecretory material, smaller cell and nucleus sizes and degeneration of the neurocytes has been reported as a result of dehydration (Brownstein et al. 1977) and intoxication with aromatic hydrocarbons (Bakhtizina 1978). After bilateral extirpation of the cervical sympathetic ganglia, the neurocytes in the PVN, SON and the dorso-medial nuclei were smaller sized, contained increased amounts of the neurosecretory material and showed degenerative changes (Lepekhina 1978). In adult animals, accumulation of the neurohormones in the SON and PVN has been reported as the result of poisoning with organic mercury (Kozik et al. 1978) and zinc compounds (Kozik et al. 1981), adrenalectomy (Kiss et al. 1984; Sawchenko et al. 1984), treatment with aminoglutethymide phosphate (Miśkowiak 1972), ACTH (Kozik, Walczak 1959) and CCNU (Pietrzak, Kozik 1985), and seizures elicited by electric shocks (Kozik, Wender 1960), insulin-induced hypoglycemia (Miętkiewski, Kozik 1967) and by water overload (Miętkiewski et al. 1974). Estimation of the function of the neurosecretory system cannot be based solely on the amount of the neurosecretory material present in the cytoplasm of the neurocytes and their processes in the hypothalamus and neurohypophysis, because the quantity of neurohormones in these structures depends not only on

the rate of synthesis, but also on the rate of axonal transport and release into blood (Kekki et al. 1975). Numerous authors laid stress on the importance of the additional symptoms of increased neurosecretory activity of the neurocytes such as swelling of the cell nuclei, nucleoli and of the whole perikarya, increased activity of thiamine pyrophosphatase and RNA content in the cytoplasm and nucleolus (Stahl et al. 1955; Edström, Eichner 1958; Jongkind, Swaab 1967; Miśkowiak 1980). The morphometric measurements performed in this study showed a gradual enlargement of the mean cross-section area of the nuclei of the neurosecretory cells during postnatal development of intact rats. In rats treated with vincristine, the mean cross-section area of the cell nuclei in the PVN was smaller than in the control group at the age of 8 and 15 days. According to the opinions mentioned above, this decrease of nuclear size should be interpreted as reflecting diminished neurosecretory activity, despite the accumulation of the neurosecretory products.

The close relation between the function of the hypothalamo-neurohypophyseal system, vasopressin levels in the blood and plasma osmolality has been demonstrated by a number of studies concerning physiologic and pathologic conditions (Pallan, et al. 1979; Miśkowiak 1980; Menniger 1985). In rats treated with vincristine during the first week of postnatal development, increased plasma osmolality on the 8th and 15th day, along with the putative symptoms of diminished synthesis of neurohormones and accumulation of neurophysin in the cytoplasm of the neurosecretory cells speak in favour of primary disturbance of axonal transport and release mechanisms.

Vincristine and other vinca alkaloids damage microtubules (Owells et al. 1976; Donoso et al. 1977), the organelles important for axonal transport, also in the neurosecretory processes (Grainger, Sloper 1974; Flament-Durand 1975). The disturbances in the hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system observed after administration of vincristine then may be attributed to its toxic effect on microtubules. Still, the possible direct inhibition of protein synthesis should also be considered (Cressey, Markiw 1965; Cline 1968). These disturbances were reversible and the few neurons showing degeneration did not influence the function of plasma osmolality regulation in 30-day-old rats.

CONCLUSIONS

1. In rats having received intraperitoneal injections of vincristine on the 3rd, 5th and 7th days after birth, a reversible accumulation of the neurophysin was demonstrated in the hypothalamo-neurohypophyseal system until the 15th day of life.
2. A simultaneous decrease of the mean cross-section area of the neurosecretory cell nuclei in the PVN and plasma hyperosmolality were observed.
3. Administration of vincristine in therapeutic doses during the first week of extrauterine development of the rats brought about disturbances in morphological and functional maturation of the hypothalamo-neurohypo-

physal neurosecretory system by blocking the axonal transport and release in to the blood of neurohormones, and probably by decreasing their synthesis in the neurosecretory neurons. These disturbances caused degeneration of some few neurons.

Acknowledgements: The author would like to thank Prof. Maria Dąbska for helpful advice and comments.

WPLYW WINKRYSTYNY NA NEUROSEKRECJĘ UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO SZCZURA W CZASIE ROZWOJU POZAMACICZNEGO

Streszczenie

Badano wpływ winkrystyny, podawanej dootrzewnowo szczurom w 3, 5 i 7 dniu po urodzeniu w dawce 0,03 mg/kg masy ciała, na dalszy rozwój podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego. W skrawkach parafinowych z mózgow 8, 15 i 30-dniowych szczurów wykonano immunoenzymatyczną (PAP) reakcję z przeciwciałami przeciw neurofizynie oraz barwienie hematoksyliną chromową Gomoriego. W podwzgórzach normalnie rozwijających się szczurów reakcja z przeciwciałami antyneurofizynowymi widoczna była w 8 dniu po urodzeniu w większości neurocytów jądra nadwzrokowego i tylko w nielicznych neurocytach jądra przykomorowego. Gomori—dotatni materiał neurosekrecyjny udało się wykazać w tym czasie tylko w nielicznych komórkach w jądrach nadwzrokowych i przykomorowych. Podawanie winkrystyny w pierwszym tygodniu życia spowodowało gromadzenie neurosekretu w cytoplazmie neurocytów wielkokomórkowych jąder podwzgórza oraz we włóknach neurosekrecyjnych w podwzgórzu i w części nerwowej przysadki widoczne w 8 i 15 dniu po urodzeniu. U 15 i 30-dniowych szczurów zaobserwowano zmiany zwyrodnieniowe w komórkach neurosekrecyjnych. Pomiary morfometryczne wykazały zmniejszenie średniego pola przekroju jąder komórkowych neurocytów w jądrach przykomorowych 8-dniowych szczurów, które otrzymywały winkrystynę. Pomiary osmolalności surowicy krwi wykazały zwiększenie osmolalności w 8 i 15 dniu po urodzeniu u szczurów, którym podawano winkrystynę. Uzyskane wyniki przemawiają za uszkodzeniem mechanizmów transportu aksonalnego i uwalniania do krwiobiegu neurohormonów oraz za zmniejszeniem ich syntezy w komórkach neurosekrecyjnych pod wpływem winkrystyny.

ВЛИЯНИЕ ВИНКРИСТИНА НА ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНУЮ СИСТЕМУ КРЫСЫ В ПЕРИОД ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Резюме

Исследовалось влияние винкрестина, который вводился внутривентриально молодым крысам на 3-, 5- и 7-й дни после рождения в дозе 0,03 мг/кг веса тела, на дальнейшее развитие гипоталамо-гипофизарной нейроэндокринной системы. На парафиновых срезах мозга 8, 15 и 30-дневных крыс проводилось иммуноцитохимическое исследование (пероксидазно-антипероксидазный метод) с антителами против нейротензина, а также окраска гематоксилином по Гомори. В гипоталамусе нормально развивающихся крыс реакция с анти нейротензинными антителами была обнаружена на 8-й день после рождения в большинстве нейронов супраоптического ядра и только в немногочисленных нейронах перивентрикулярного ядра. Позитивно окрашенный при реакции по Гомори нейросекреторный материал удалось найти в это время только в немногочисленных клетках супраоптического и перивентрикулярного ядер. Введение винкрестина на первой неделе жизни вызывало

скопление нейросекреторного материала в цитоплазме нейронов гигантоклеточных ядер гипоталамуса, а также в нейросекреторных волокнах гипоталамуса и в нейрогипофизе, обнаруживаемое на 8 и 15 дни после рождения. У 15 и 30-дневных крыс наблюдались дегенеративные изменения нейросекреторных клеток.

Морфометрические исследования показали уменьшение средней площади ядер нейронов в перивентрикулярном ядре у 8-дневных крыс, получавших винкристин. Измерения осмоляльности сыворотки крови показали увеличение осмоляльности на 8- и 15-й дни после рождения крыс, которых вводили винкристин.

Полученные результаты свидетельствуют о нарушении механизмов аксонального транспорта и о выведении нейрого르몬ов в кровеносное русло, а также о понижении их синтеза в нейросекреторных клетках под влиянием винкрестина.

REFERENCES

1. Bakhtizina G. Z.: Functional morphology of the peptidergic hypothalamo-hypophysal neurosecretory system of rat in postnatal ontogenesis after exposure to aromatic hydrocarbons. In: Neurosecretion and neuroendocrine activity. Eds. W. Bargmann, A. Oksche, A. Polenov, B. Scharrer. Springer, Berlin 1978, 125.
2. Brownstein M. J., Robinson A. G., Gainer H.: Immunological identification of rat neurophysin precursors. *Nature*, 1977, 259—261.
3. Cline M. J.: Effect of vincristine on synthesis of ribonucleic acid and protein in leukaemic lymphocytes. *Br. J. Haematol.*, 1968, 14, 21—29.
4. Creasey A., Markiw M. E.: Biochemical effects of the vinca alkaloids. III. The synthesis of RNA and the incorporation of amino acids in Ehrlich ascites cells in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 103, 635—645.
5. Dicker S. E., Tyler C.: Vasopressor and oxytocic activities of the pituitary glands of rats, guinea-pigs and cats and of human fetuses. *J. Physiol.*, 1953, 121, 206—214.
6. Diepen R., Engelhardt F., Smith-Agreda V.: Über Ort und Art der Entstehung des Neurosekretes im supraoptico-hypophysaren System bei Hund und Katze. *Anat. Anz.*, 1954, 101, 276—288.
7. Dietrich E.: Zur Frage der Enzephalotoxizität des Vincristin Eeg-Befunde bei Langzeitüberleben nach Leukämien und soliden Tumoren im Kindersalter, die mit Vincristin behandelt wurden. *Klin. Padiatr.*, 1979, 191, 145—147.
8. Donew S.: Occurrence of the neurosecretory substance during embryonic development of the guinea pig. *Z. Zellforsch.*, 1970, 104, 517—529.
9. Donoso J. A., Green L. S., Heller-Bettinger I. E., Samson F. E.: Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine and desacetyl vinblastine amide on axonal fibrillar organelles in vitro. *Cancer Res.*, 1977, 37, 1401—1407.
10. Edström J. E., Eichner D.: Quantitative Ribonukleinsäure-Untersuchen an den Ganglienzellen des Nucleus supraopticus der Albino-Ratte unter experimentellen Bedingungen Kochsalzbelastung. *Z. Zellforsch.*, 1958, 48, 187—200.
11. Ellis H. K., Watkins W. B.: Ontogeny of the pig hypothalamic neurosecretory system with particular reference to the distribution of neurophysin. *Cell Tissue Res.*, 1975, 164, 543—557.
12. Fink G., Smith G. S.: Ultrastructural features of the developing hypothalamo-hypophysial axis in the rat. *Z. Zellforsch.*, 1971, 119, 208—226.
13. Flament-Durand J., Couck A. M., Dustin P.: Studies on the transport of secretory granules in the magnocellular hypothalamic neurons of the rat. II. Action of vincristine on axonal flow and neurotubules in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Cell Tissue Res.*, 1975, 164, 1—9.
14. Gaidys W. G., Dickerman J. D., Walters C. L., Young P. C.: Intrathecal vincristine. Report of a fatal case despite CNS washout. *Cancer*, 1983, 52, 799—801.

15. Goldberg I. D., Bloomer W. D., Dawson D. M.: Nervous system toxic effects of cancer therapy. *JAMA* 1982, 247, 1437–1441.
16. Grainger F., Sloper J. C.: Correlation between microtubular number and transport activity of hypothalamo-neurohypophyseal secretory neurons. *Cell Tissue Res.*, 1974, 153, 101–113.
17. Grobe H., Palm D.: Vincristin-induzierte Enzephalopathien unter der Behandlung kindlicher Leukosen. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 1972, 120, 23–27.
18. Heller H., Lederis K.: Maturation of the hypothalamo-neurohypophysial system. *J. Physiol.*, 1959, 147, 299–314.
19. Jongkind J. F., Swaab D. F.: The distribution of thiamine diphosphate-phosphohydrolase in the neurosecretory nuclei of the rat following osmotic stress. *Histochemie*, 1967, 11, 319–324.
20. Kekki M., Attila U., Talanti S.: The kinetics of ³⁵S-labelled cysteine in the hypothalamic-neurohypophyseal neurosecretory system of the dehydrated rat. *Cell Tissue Res.*, 1975, 158, 439–450.
21. Kivalo E., Talanti S.: The foetal development of the hypothalamic-hypophysial neurosecretory system of the cow embryo. *Acta Endocrinol.*, 1957, 26, 471–476.
22. Kiss J. Z., Mezey E., Skirboll L.: Corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons of paraventricular nucleus become vasopressin-positive after adrenalectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1854–1858.
23. Kozik M. B., Grams G., Pietrzak M.: Neurosecretion of the hypothalamo-hypophyseal system after intragastric administration of zinc oxide. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1981, 19, 115–122.
24. Kozik M. B., Walczak M.: Wpływ ACTH na stan neurosekrecji podwzgórza świnki morskiej. *Endokrynol. Pol.*, 1959, 10, 137–144.
25. Kozik M., Wender M.: Jądra neurosekrecyjne podwzgórza i część nerwowa przysadki pod drgawkach elektrycznych. *Endokrynol. Pol.*, 1960, 11, 363–371.
26. Kozik M. B., Wigowska-Sowińska J., Pietrzak M.: Morfologia jąder neurosekrecyjnych podwzgórza i części nerwowej przysadki mózgowej w przebiegu zatrucia octanem fenylortęciowym. *Endokrynol. Pol.*, 1978, 29, 322–337.
27. Lepekhina L. M.: Effect of extirpation of the cervical sympathetic ganglia on development of the neurosecretory peptidergic and parvocellular nuclei of rat hypothalamus during postnatal ontogenesis. In: *Neurosecretion and Neuroendocrine Activity*. Eds. W. Bargmann, A. Oksche, A. Polenov, B. Scharrer. Springer, Berlin 1978, 85.
28. Menniger R. P.: Current concepts of volume receptor regulation of vasopressin release. *Fred. Proc.*, 1985, 44, 55–58.
29. Miętkowski K., Kozik M.: Neurosekrecja jąder podwzgórza królika po wstrząsach insulinowych. *Endokrynol. Pol.*, 1967, 18, 249–261.
30. Miętkowski K., Kozik M., Warchol J. B.: Histochemistry of neurosecretion in attempted eliciting of epileptic fits by water load in the rat. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1974, 12, 261–268.
31. Miśkowiak B.: Wpływ doświadczonego odwodnienia na układ neurosekrecyjny podwzgórzo-przysadkowy szczura. *Endokrynol. Pol.*, 1980, 31, 67–78.
32. Miśkowiak B.: Influence of aminoglutethimide on hypothalamo-pituitary neurosecretion in rats. *Endokrynol. Pol.*, 1972, 23, 435–449.
33. Owellen R. J., Hartke C. A., Dickerson R. M., Frederick O. H.: Inhibition of tubulin-microtubule polymerisation by drugs of the Vinca alkaloids class. *Cancer Res.*, 1976, 36, 1499–1502.
34. Pietrzak M., Kozik M. B.: The influence of the antimetabolic drug CCNU on the neurosecretion of rat hypothalamo-hypophyseal system. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1985, 23, 27–32.
35. Pullan P. T., Clappison B. H., Johnston C. I.: Plasma vasopressin and human neurophysins in physiological and pathological states associated with changes in vasopressin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1979, 49, 580–587.
36. Rinne U. K., Kivalo E.: Maturation of hypothalamic neurosecretion in rat with special

- reference to the neurosecretory material passing into the hypophysial portal system. *Acta Neuroveg. Wien*, 1964, 27, 166–183.
37. Rodeck H., Caesar R.: Entwicklung des neurosecretorischen Systems bei Saugern und Mensch und der Regulationmechanismen des Wasserhaushaltes. *Z. Zellforsch.*, 1956, 44, 666–691.
 38. Rosenthal S., Kaufman S.: Vincristine neurotoxicity. *Ann. Int. Med.*, 1974, 80, 733–737.
 39. Sawchenko P. E., Swanson L. W., Vale W. W.: Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons in adrenalectomized rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1883–1887.
 40. Schochet S. S., Lampert P. W., Earle K. M.: Neuronal changes induced by intrathecal vincristine sulphate. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1968, 27, 645–658.
 41. Sinding C., Seif S. M., Robinson A. G.: Levels of neurohypophyseal peptides in the rat during the first month of life. I. Basal levels in plasma, pituitary and hypothalamus. *Endocrinology*, 1980, 107, 749–754.
 42. Sinding C., Seif S. M., Robinson A. G.: Levels of neurohypophyseal peptides in the rat during the first month of life. II. Response to physiological stimuli. *Endocrinology*, 1980, 107, 755–760.
 43. Slyter H., Liwnicz B., Herrick M. K., Mason R.: Fatal myeloencephalopathy caused by intrathecal vincristine. *Neurology*, 1980, 30, 867–871.
 44. Stahl A., Cotte G., Seite R.: Modifications cytologiques et cytochimiques des cellules neurosecretoires de l'hypothalamus apres perturbation experimentale du metabolisme hydrique. *C. R. Assoc. Anat.*, 1955, 85, 455–464.
 45. Sternberger L. A.: *Immunocytochemistry*. 2nd ed. Wiley, New York, 1979.

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

HANNA WEHR, JERZY WĘGIEL, WOJCIECH DZIEDZIAK,
ELŻBIETA MEDYŃSKA, GRAŻYNA NOWICKA

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS (VLDL) IN CHRONIC ALCOHOLICS

Department of Genetics and Department of Neuropathology, Institute of Psychiatry and
Neurology, Warsaw

Department of Clinical Pathophysiology and Dietetics, National Food and Nutrition Institute,
Warsaw

Alcohol consumption results in an overproduction of triglycerides in the liver and an enhanced secretion of very low density lipoproteins (VLDL) into the bloodstream (Lieber, Savolainen 1984). After prolonged heavy drinking in alcohol addicted persons a secondary rise of lipoprotein lipase activity was observed (Ekman et al. 1981). The turnover of VLDL triglycerides in such individuals is accelerated (Sane et al. 1984) and a part of other VLDL lipid constituents is transferred to high density lipoproteins (HDL). This results in a HDL increase which may even be utilised as a laboratory marker of alcohol abuse (Salaspuro 1986; Wehr, Woronowicz 1986).

VLDL lipolysis in the serum results in their gradual transformation into low density lipoproteins (LDL), VLDL apolipoprotein B (apo B) being recovered in the LDL fraction. Though LDL are end products of VLDL lipolysis they usually, however, remain low in heavy drinkers (Taskinen et al. 1982). On the contrary, it was observed that apo B – the main LDL protein – often increased after an abstinence period following heavy drinking (Wehr et al. 1986). The cause of this was not explained.

Several authors emphasise recently an important catabolic pathway consisting in direct degradation of VLDL and VLDL remnants in the liver without their conversion to LDL. The VLDL fate is related to the size and composition of these particles, the direct liver pathway concerning mostly large ones (Janus et al. 1980; Stalenhoef et al. 1984). In the case of VLDL catabolism in the liver apo B would escape from the bloodstream.

In the present work VLDL diameters and composition were studied in alcohol addicted individuals shortly after a period of heavy drinking and for the second time after a period of abstinence. The main purpose was to investigate whether the low apo B level which was often observed after alcohol

abuse could be explained by the presence of very large VLDL particles in the bloodstream which could be degraded in the liver without their transformation to LDL.

MATERIAL AND METHODS

Ten male alcohol-dependent patients (mean age 40 years, range 33–56) were examined twice: for the first time 8–18 hours after interrupting an alcohol abuse period (examination I) and for the second time after 1–2 weeks of abstinence (examination II).

Blood was drawn after overnight fast, serum was isolated and ultracentrifuged for 18 hours at $100\,000 \times g$ at a density of 1.006 g/cm^3 (Beckmann ultracentrifuge rotor type 50) and the top layer containing VLDL was collected.

Negative staining of lipoproteins with 1% phosphotungstic acid was performed (Forte et al. 1968; Groszek, Grundy 1978) and the mixture was put on Formvar film-covered grids (1000 mesh, Tesla). Electron micrographs were obtained using a Tesla BS 500 electron microscope (magnification $\times 31\,320$). Particle diameters were determined on 10 micrographs by measuring 40 lipoprotein particles on each micrograph on a magnifying screen (final magnification was $\times 389\,105$).

HDL cholesterol was estimated after removing the lighter lipoprotein fractions by heparin MgCl_2 precipitation (Lopes-Virella et al. 1977).

For triglyceride and cholesterol determinations Boehringer enzymatic tests were used.

Protein was determined by the Lowry et al. (1957) method.

Apolipoprotein B was measured by immunoprecipitation (Nowicka 1983).

Statistical significance was estimated by Student's test.

RESULTS

Serum triglyceride, total cholesterol and HDL cholesterol levels in individual patients are presented in Table 1. Only five individuals were normolipemic after the alcohol abuse period, one was markedly hypertriglyceridemic, four were hypercholesterolemic. In one patient (G.B.) post-alcoholic liver cirrhosis was diagnosed, basing on clinical symptoms and liver function tests.

After the period of abstinence in most of the patients the HDL cholesterol level decreased similarly as in the results reported previously (Wehr et al. 1983). Patient J.G. represented a case of alcohol-induced hypertriglyceridemia and as is characteristic for such individuals his results differed in this respect (Nilson-Ehle 1979).

In other patients except J.G. a significant rise of mean triglyceride and cholesterol content in the VLDL fraction in examination II as compared to examination I was noted (Table 2). Electron microscopy and morphometry of

Table 1. Serum lipids in alcohol addicted patients after alcohol abuse (I) and after 1–2 weeks of abstinence (II)

Tabela 1. Lipidy surowicy u pacjentów uzależnionych od alkoholu po okresie nadużywania alkoholu (I) i po 1–2 tygodniach abstynencji (II)

Patient Pacjent	Age Wiek	Triglycerides Trójglicerydy mg/dl		Cholesterol Cholesterol mg/dl		HDL cholesterol Cholesterol HDL mg/dl	
		I	II	I	II	I	II
H.B.	56	102	90	179	165	–	–
C.K.	51	97	136	179	175	–	–
W.G.	37	52	194	204	190	83	47
I.S.	43	59	50	250	170	90	83
Z.Z.	38	73	136	161	256	45	39
J.G.	34	399	150	193	195	39	47
G.B.	33	61	114	288	256	53	55
S.F.	33	114	125	339	292	90	83
A.K.	37	120	104	361	225	97	65
J.P.	39	70	127	386	309	94	45

Table 2. Mean values of VLDL triglyceride, cholesterol and protein in alcohol addicted patients after alcohol abuse (I) and after 1–2 weeks of abstinence (II)

Tabela 2. Średnia zawartość trójglicerydów, cholesterolu i białka w VLDL u pacjentów uzależnionych od alkoholu po okresie nadużywania alkoholu (I) i po 1–2 tygodniach abstynencji (II)

Triglycerides Trójglicerydy mg/dl		Cholesterol Cholesterol mg/dl		Protein Białko mg/dl	
I	II	I	II	I	II
44.1 ± 19.6	67.4 ± 24.6	17.8 ± 9.1	28.0 ± 13.6	17.4 ± 5.5	22.4 ± 4.8
p < 0.05		p < 0.05		n. s.	

The values are means ± SD from 9 estimations

Wartości średnie ± SD z 9 oznaczeń

VLDL particles showed that in 8 out of 10 individuals VLDL diameters increased after a period of abstinence, the differences of the mean values were, however, nonsignificant. Electron-micrographs of representative samples are shown in Figs. 1–3.

Since the patients represent a variety of drinking habits, liver involvement and other characteristics, the data concerning some of the patients were considered individually in order to evaluate whether there was a relationship between the change of the apo B level and VLDL characteristics (Table 3). As shown in the Table, the increase of VLDL particle size and of its triglyceride content were usually not associated with apo B decrease.

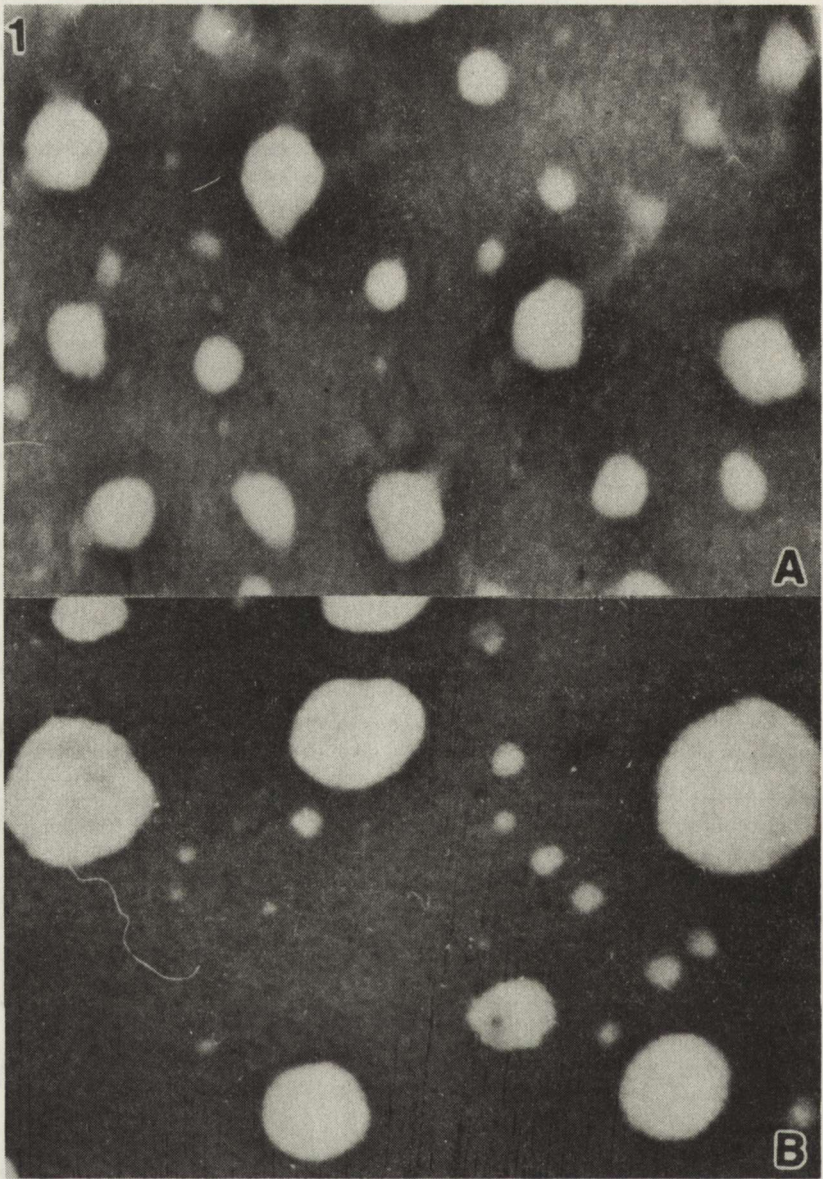


Fig. 1-3. VLDL particle-electronmicrographs of representative samples. Negative staining. $\times 150\,300$

Ryc. 1-3. Przykłady elektronogramów cząsteczek VLDL. Barwienie negatywne. Pow. $150\,300\times$

Fig. 1. Patient W. G. *1 A.* After alcohol abuse (mean diameter $67.8\ \mu\text{m}$). *1 B.* After 12 days of abstinence (mean diameter $77.5\ \mu\text{m}$)

Ryc. 1. Pacjent W. G. *1 A.* Po nadużyciu alkoholu (przeciętna średnica $67,8\ \mu\text{m}$). *1 B.* Po 12 dniach abstynencji (przeciętna średnica $77,5\ \mu\text{m}$)

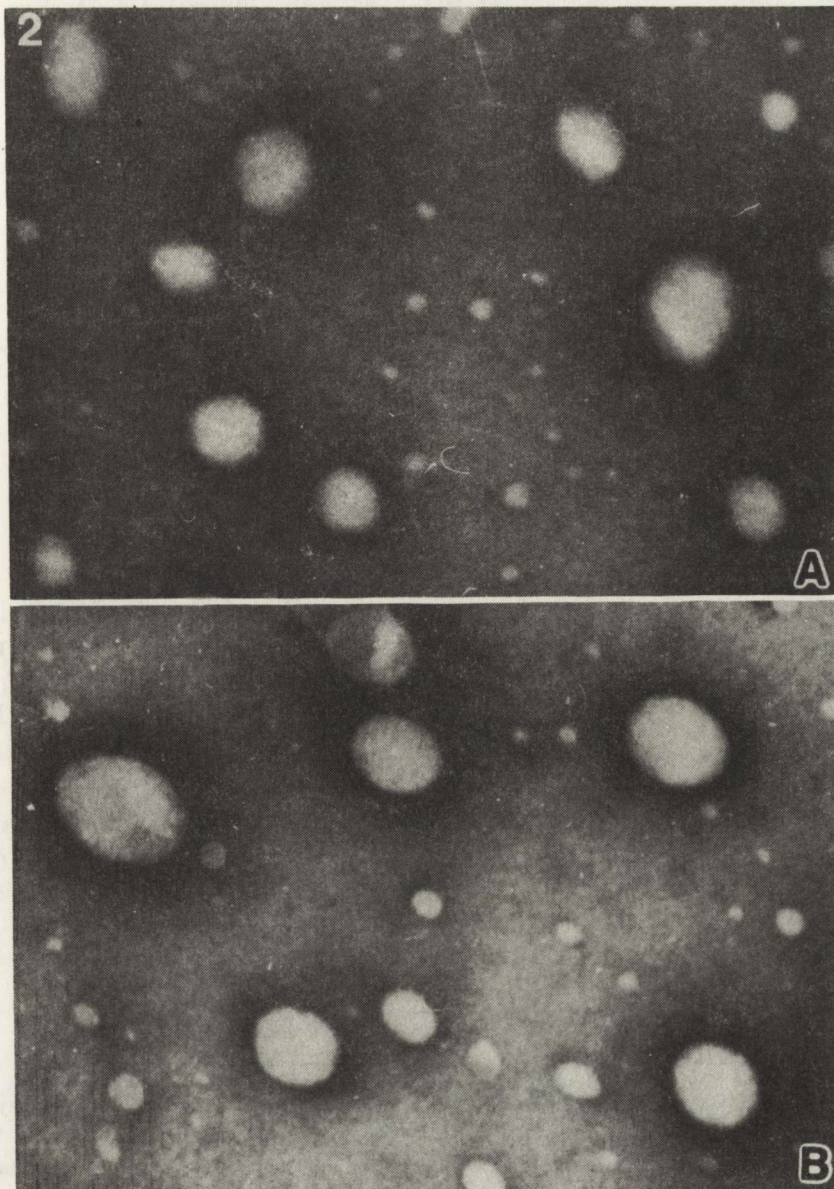


Fig. 2. Patient Z. Z. 2 A. After alcohol abuse (mean diameter 66.3 μm). 2 B. After 8 days of abstinence (mean diameter 71.6 μm)

Ryc. 2. Pacjent Z. Z. 2 A. Po nadużywaniu alkoholu (przeciętna średnica 66,3 μm). 2 B. Po 8 dniach abstynencji (przeciętna średnica 71,6 μm)

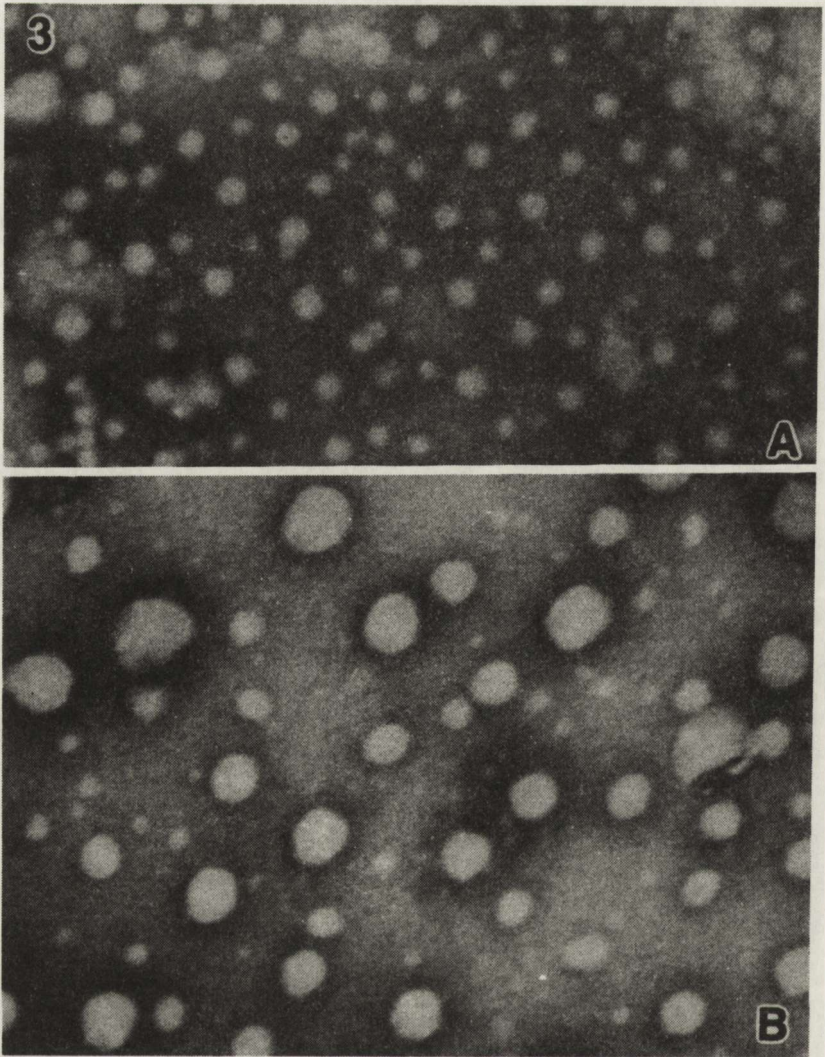


Fig. 3. Patient J. P. 3 A. After alcohol abuse (mean diameter 29.2 μm). 3 B. After 8 days of abstinence (mean diameter 46.0 μm)

Ryc. 3. Pacjent J. P. 3 A. Po nadużywaniu alkoholu (przeciętna średnica 29,2 μm). 3 B. Po 8 dniach abstynencji (przeciętna średnica 46,0 μm)

Table 3. Examples of serum lipoprotein changes in individual patients after alcohol abuse (I) and after 1–2 weeks of abstinence (II)

Tabela 3. Przykłady zmian w lipoproteinach surowicy u poszczególnych pacjentów po okresie nadużywania alkoholu (I) i po 1–2 tygodniach abstynencji (II)

Patient Pacjent	TG-VLDL TG-VLDL mg/dl		VLDL diameter Średnia VLDL µm		VLDL particles > 100 µm Cząsteczki VLDL > 100 µm %		apo B apo B mg/dl	
	I	II	I	II	I	II	I	II
C.K.	52	75	327	549	0.8	7.5	52	72
W.G.	31	107	679	776	16.5	26.0	60	76
Z.Z.	31	64	663	719	21.0	24.5	64	156
G.B.	36	57	799	690	20.3	18.5	90	102
A.K.	84	68	355	558	1.8	3.0	102	165
J.P.	30	90	293	461	0.3	1.5	92	92

DISCUSSION

In alcohol-fed baboons secretion of very large VLDL particles from the liver was observed in an electron-microscopy study (Savolainen et al. 1986). In the present work the large VLDL were also often observed in the bloodstream. VLDL diameters were larger in most of the individuals after 1–2 weeks of abstinence than shortly after a period of heavy drinking. This unexpected observation could be explained by a persisting secretion of triglyceride-rich lipoproteins from the liver and a simultaneous lowering of lipoprotein lipase activity. The decrease of VLDL turnover in the bloodstream was indirectly indicated by the observed decrease of the HDL cholesterol level.

The large VLDL particles could undergo direct catabolism in the liver without being converted into LDL (Stalenhoef et al. 1984). The possibility that this was the cause of the low apo B level, often observed after alcohol abuse, was not confirmed, however, in the present study. After 1–2 weeks of abstinence following heavy drinking VLDL still became enriched in triglycerides and their particles were still larger than before and yet in the same persons apo B levels already increased. Thus, low LDL levels after heavy drinking must be caused by different factors.

ANALIZA MORFOMETRYCZNA LIPOPROTEIN O BARDZO NISKIEJ GĘSTOŚCI (VLDL) U LUDZI UZALEŻNIONYCH OD ALKOHOLU

Streszczenie

U 10 pacjentów alkoholików po okresie nadużywania alkoholu i po 1–2 tygodniach abstynencji mierzono przy użyciu mikroskopii elektronowej rozmiary VLDL izolowanych ultrawirami. Oznaczano lipidy surowicy i VLDL oraz poziom apolipoproteiny B w surowicy i ilość białka VLDL. Po okresie abstynencji rozmiary VLDL u większości badanych wzrastały

w stosunku do rozmiarów stwierdzonych po okresie intensywnego picia. Ilość trójglicerydów i cholesterolu VLDL była wtedy wyższa. Można sądzić, że wydzielanie wysokotrójglicerydowych VLDL do krwiobiegu utrzymywało się dłużej po zaprzestaniu picia niż wzmożona lipoliza VLDL. Stwierdzono, że niski poziom apolipoproteiny B, często obserwowany po nadużywaniu alkoholu, nie był związany z obecnością dużych cząsteczek VLDL, które być może, są rozkładane bezpośrednio w wątrobie bez ich transformacji w LDL.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИПОПРОТЕИНОВ С ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТЬЮ (VLDL) У ЛЮДЕЙ ЗАВИСЯЩИХ ОТ АЛКОГОЛЯ

Резюме

У 10 больных — алкоголиков электронно-микроскопически исследовались размеры VLDL после периода злоупотребления алкоголем и после 1–2 недельного воздержания. VLDL изолировались методом ультрацентрифугирования. В сыворотке обозначались липиды и VLDL а также уровень аполипопротеина В и количество белка VLDL.

После периода воздержания размеры VLDL у большинства больных увеличались по сравнению с размерами, обнаруженными после периода злоупотребления алкоголем. Количество триглицеридов и холестерина было выше, чем в контрольных случаях. Вероятно секрета и кровеносное русло VLDL богатых триглицеридами, сохранялась долже, чем усиленный липолиз VLDL.

Обнаружено, что низкий уровень аполипопротеина В, наблюдаемый часто после злоупотребления алкоголем, не был связан с присутствием больших молекул VLDL распад которых мог происходить непосредственно в печени, без трансформации в LDL.

REFERENCES

1. Ekman R., Fex G., Johansson B. G., Nilsson-Ehle P., Wadstein J.: Changes in plasma high density lipoproteins and lipolytic enzymes after long-term, heavy ethanol consumption. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1981, 41, 709–715.
2. Forte G. M., Nichols A. V., Glaeser R. M.: Electron microscopy of human serum lipoproteins using negative staining. *Chem. Phys. Lipids*, 1968, 2, 396–406.
3. Groszek E., Grundy S. M.: Electron microscopic evidence for particles smaller than 250 Å. *Arteriosclerosis*, 1978, 31, 241–250.
4. Janus E. D., Nicoll A., Wootton R., Turner P. R., Magill P. J., Lewis B.: Quantitative studies of very low density lipoprotein conversion to low density lipoproteins in normal controls and primary hyperlipidaemic states and the role of direct secretion of low density lipoprotein in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1980, 10, 149–159.
5. Lieber C. S., Savolainen M.: Ethanol and lipids. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 1984, 8, 409–423.
6. Lopes Virella M. F., Stone P., Ellis L., Colwell J. E.: Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.*, 1977, 23, 882–884.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1957, 265–275.
8. Nilsson-Ehle P.: Alcohol induced alterations in lipoprotein lipase activity and plasma lipoproteins. In: *Proc. Intern. Symp. Metab. Eff. Alc.*, Milan, June 1979.
9. Nowicka G.: Serum apolipoprotein B determination by radial immunodiffusion (RID) in clinical practice. *Żyw. Człow. Metab.*, 1983, 10, 59–67.
10. Salaspuro M.: Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 1986, 5S–11S.

11. Sane T., Nikkilä E. A., Taskinen M. R., Välimäki M., Ylikahri R.: Accelerated turnover of very low density lipoprotein triglycerides in chronic alcohol users. *Arteriosclerosis*, 1984, 53, 185–193.
12. Savolainen M. J., Baraona E., Leo M. A., Lieber C. S.: Pathogenesis of the hypertriglyceridemia at early stages of alcoholic liver injury in the baboon. *J. Lipid Res.*, 1986, 27, 1073–1083.
13. Stalenhoef A. F. H., Malloy M. J., Kane J. P., Havel R. J.: Metabolism of apolipoproteins B-48 and B-100 of triglyceride-rich lipoproteins in normal and lipoprotein lipase-deficient humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1839–1843.
14. Taskinen M. R., Välimäki M., Nikkilä E. A., Kuusi T., Ehnholm C., Ylikahri R.: High density lipoprotein subfractions and post heparin plasma lipases in alcoholic men before and after alcohol withdrawal. *Metabolism*, 1982, 31, 1168–1174.
15. Wehr H., Naruszewicz M., Nowicka G., Woronowicz B., Mrozek S., Rosnowska M.: Triglyceride level and changes in high density lipoproteins in intoxicated alcoholic patients. *Żyw. Człow. Metab.*, 1983, 10, 69–74.
16. Wehr H., Nowicka G., Naruszewicz M., Woronowicz B., Dziedziak W.: Effect of ethanol abuse and abstinence on blood serum HDL, apo B level and some LDL characteristics: Alcohol and Alcoholism IIIrd Congr. of ISBRA, Helsinki, 1986, Abstr. 199.
17. Wehr H., Woronowicz B.: Zastosowanie oznaczania cholesterolu lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) w leczeniu odwykowych. *Psych. Pol.*, 1986, 20, 27–32.

Authors' address: Department of Genetics. Institute of Psychiatry and Neurology, 1/9 Sobieskiego Str., 02-957 Warsaw, Poland.

IZABELA KUCHNA¹, MAREK KULERSKI², JOANNA RÓG-MARCZUK³

NEUROPATOLOGIA ZESPOŁU REYE'A

¹Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ²Oddział Intensywnej Terapii i Reanimacji i ³Zakład Patomorfologii Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej, Warszawa

Reye i wsp. w 1963 r. opisali po raz pierwszy zespół chorobowy składający się z nagle występujących objawów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego i wątroby, w której stwierdza się (w materiale biopsyjnym lub pośmiertnie) stłuszczenie. Od tego czasu pojawiły się liczne opisy dalszych przypadków tej choroby, która dotyczy dzieci w wieku od kilku miesięcy do 18 lat. Pojedyncze zachorowania spostrzegano także u dorosłych (Vanholder i wsp. 1979). Obecnie uważa się, że zespół Reye'a można rozpoznać na podstawie objawów ostrych zaburzeń mózgowych (nagle wymioty, napady drgawkowe, zaburzenia świadomości narastające do śpiączki), poprzedzonych krótką infekcją nieżytową górnych dróg oddechowych lub przewodu pokarmowego oraz zaburzeń funkcji wątroby (podwyższony poziom aminotransferaz, przedłużony czas protrombinowy, hiperamonemia we krwi) (Huttenlocher, Trauner 1978). Należy wykluczyć inne przyczyny stwierdzanych objawów neurologicznych. Choroba ma przebieg burzliwy i w 25–52% przypadków (w zależności od nasilenia objawów neurologicznych) zejściem śpiączki jest zgon (Manz, Colon 1982). Całkowite wyzdrowienie następuje rzadko. Po przebyciu zespołu Reye'a w części przypadków pozostają neurologiczne objawy ubytkowe: upośledzenie umysłowe, napady padaczkowe, porażenie połowicze. Etiologia zespołu Reye'a nie jest dotychczas ustalona. Wielokrotnie stwierdzano, że do zachorowania usposabiają zakażenia wirusowe najczęściej z grupy varicella i grypy A, B, ale dotychczas niezwykle rzadko izolowano te wirusy w układzie nerwowym u chorych z zespołem Reye'a. Niektórzy autorzy wymieniają jako potencjalną przyczynę zespołu Reye'a egzogenne toksyny (salicylany, insektycydy), inni sugerują genetyczną predyspozycję do zaburzeń metabolicznych, które ujawniają się w tym zespole przy infekcji wirusowej i/lub pod wpływem czynników toksycznych (Manz, Colon 1982). Wysoka śmiertelność i nieustalona etiopatogeneza zaburzeń w zespole Reye'a wymaga

dalszych badań i obserwacji. Wobec wiodących klinicznie objawów neurologicznych wydaje się również istotna analiza zmian w układzie nerwowym.

Celem pracy jest przedstawienie neuropatologii zespołu Reye'a na podstawie oceny własnych przypadków.

MATERIAŁ I METODY

Badany materiał stanowią 4 przypadki sekcyjne dzieci zmarłych w Oddziale Intensywnej Terapii i Reanimacji Instytutu Pediatrii AM w Warszawie, u których klinicznie rozpoznano zespół Reye'a, a w badaniu anatomopatologicznym stwierdzono stłuszczenie wątroby. Wiek dzieci wynosił od 6 miesięcy do 2 lat. Badania sekcyjne wykonano w Zakładzie Patomorfologii Instytutu Pediatrii AM w Warszawie. Badania neuropatologiczne przeprowadzono w Pracowni Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Do badań tych pobierano wycinki z półkul mózgu, pnia oraz mózdzku. Materiał zatapiany w parafinie barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu oraz według metody Klüvera – Barrery.

WYNIKI

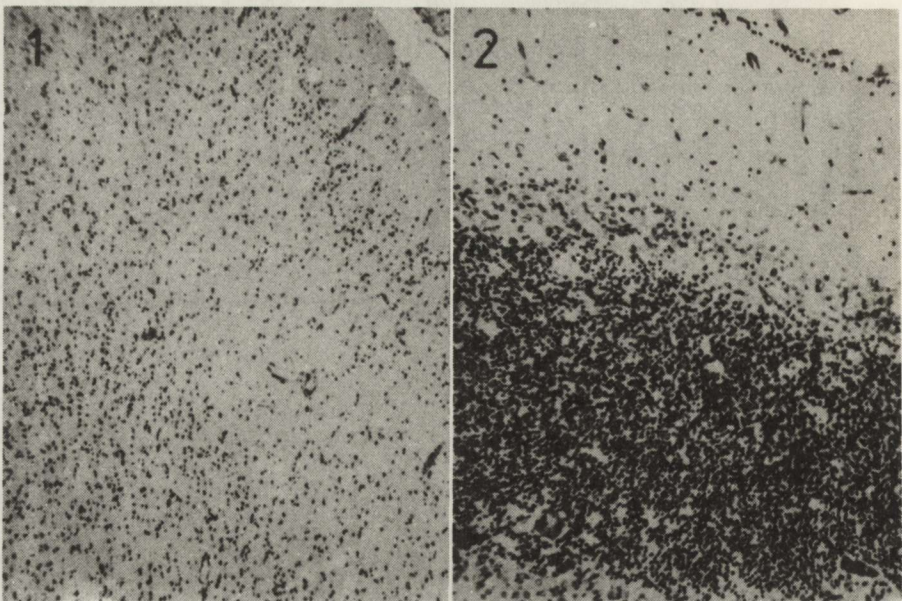
Dane kliniczne, laboratoryjne i anatomopatologiczne omawianych przypadków przedstawia tabela 1.

Badaniem neuropatologicznym makroskopowo stwierdzono obrzęk mózgu w 2 przypadkach — z podwyższeniem ciężaru w stosunku do normy o 14% (przypadek 4) i 57% (przypadek 3). W pozostałych dwóch przypadkach widoczne było: w przypadku 1 obniżenie spoistości istoty białej prawej półkuli mózgu na poziomie ciemieniowo-potylicznym i w przypadku drugim ograniczone krwawienie podpajęczynówkowe w okolicy ciemieniowo-skroniowej prawej.

Badanie mikroskopowe ujawniło wyraźne uszkodzenie kory półkul mózgowych, w przypadku 3 w formie ostrego schorzenia neuronów z chromatolizą oraz ubytków neuronalnych, a w pozostałych przypadkach w postaci wieloogniskowych rozległych opustoszeń neuronalnych (ryc. 1). W obrębie pnia mózgu nie stwierdzono zmian, z wyjątkiem przypadku 2, w którym spostrzegano wyraźne cechy schorzenia ischemicznego komórek nerwowych w oliwkach i w tworze siatkowatym. W jednym również przypadku (przyp. 1) stwierdzono zmiany w mózdzku. W obrębie półkul obserwowano odcinkowy, a w robaku całkowity brak komórek Purkinjego z wyrównawczym rozplemem gleju Bergmanna oraz ogniskowe przerzedzenia w warstwie ziarnistej (ryc. 2). W istocie białej półkul mózgu stwierdzono przekrwienie we wszystkich przypadkach i cechy obrzęku (ryc. 3) w tych przypadkach, w których był on widoczny makroskopowo (przyp. 3 i 4). W jednym przypadku (przyp. 1) w istocie białej półkuli prawej znaleziono drobne ogniska martwic z obecnością pojedynczych makrofagów oraz uogólniony rozplam i przerost komórek

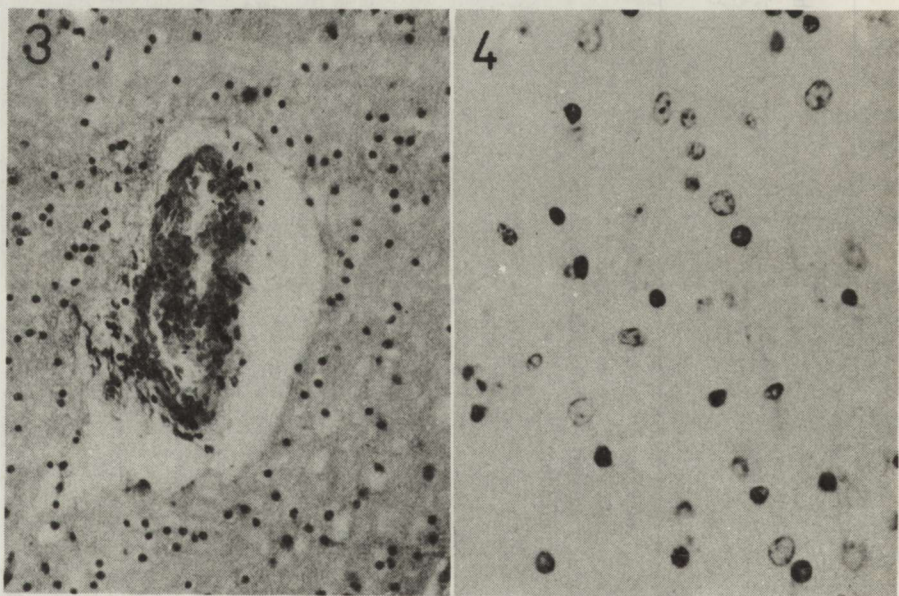
Tabela 1. Clinical, laboratory and pathological data

Lp No	Nr przy-padku Case No	Wiek Age	Choroba poprzedzająca Antecedent illness	Główne objawy kliniczne Main clinical symptoms and signs	Badania laboratoryjne Laboratory investigations					Czas przeżycia w dniach Survival time in days	Rozpoznanie anatomopatologiczne Pathological diagnosis	
					GOT	GPT	biliru-bina całkowita total bilirubin mg%	cukier we krwi blood glucose mg%	czas protrombinyowy prothrombin time sec			płyn m-rdz. CSF
1	49/84	6 mies 6 month	infekcja kataralna catarrhal infection	wymioty, drgawki, oczopląs, śpiączka, zaburzenia oddychania vomiting, convulsions, nystagmus, coma, respiratory disturbances	485	354	0,6 2,32	15	42	prawidłowy normal	5	stłuszczenie i ogniska martwicy w wątrobie, obustronne zapalenie płuc Liver steatosis and focal necrosis Pneumonia bilateral
2	46/84	8 mies 8 month	infekcja kataralna, biegunka catarrhal infection diarrhoea	wymioty, bradycardia, drgawki, zaburzenia oddychania vomiting, bradycardia convulsions, respiratory disturbances	365	—	—	15	—	prawidłowy normal	2	Stłuszczenie i ogniska martwicy w wątrobie Liver steatosis and focal necrosis
3	43/84	10 mies 10 month	zapalenie gardła pharyngitis	wymioty, drgawki, śpiączka, zaburzenia oddychania vomiting, convulsions, coma, respiratory disturbances	1785	1378	—	80	—	prawidłowy normal	4	Stłuszczenie i ogniska martwicy w wątrobie Liver steatosis and focal necrosis
4	65/84	2 lata 2 years	biegunka diarrhoea	wymioty, drgawki, śpiączka, zaburzenia oddychania vomiting, convulsions, coma, respiratory disturbances	1395	1945	0,58	120	—	prawidłowy normal	8	Stłuszczenie wątroby Zapalenie płuc ropne Liver steatosis Purulent pneumonia



Ryc. 1. Przypadek 2. Ubytki neuronalne w korze mózgowej. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×
 Fig. 1. Case 2. Neuronal loss in cerebral cortex. Cresyl violet. × 60

Ryc. 2. Przypadek 1. Zanik komórek Purkinje z wyrównawczym rozplemieniem gleju Bergmanna i ogniskowe przerzedzenia warstwy ziarnistej kory mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×
 Fig. 2. Case 1. Atrophy of Purkinje cells with proliferation of Bergmann's glia and focal rarefactions of granular layer in cerebellar cortex. Cresyl violet. × 100

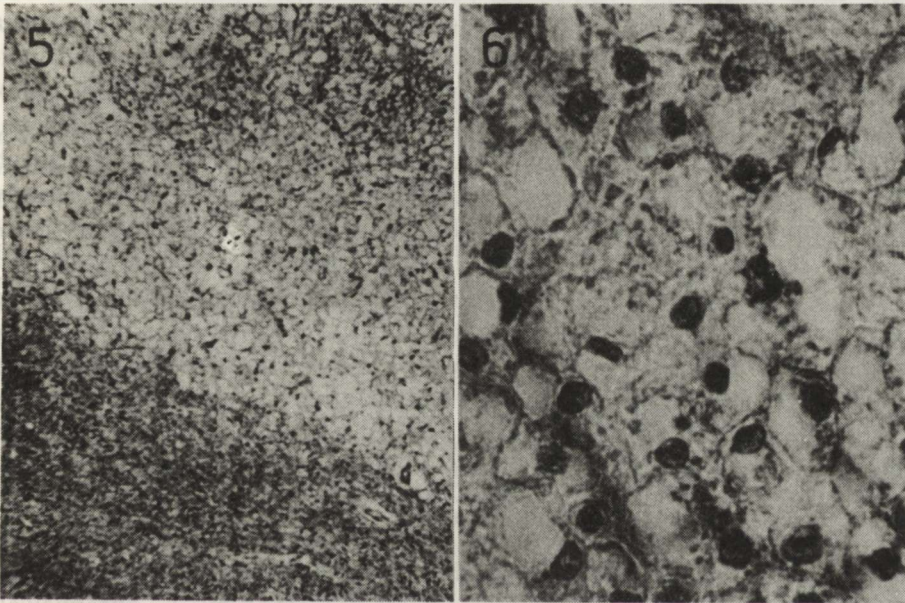


Ryc. 3. Przypadek 4. Obrzęk w istocie białej. H – E. Pow. 200 ×
 Fig. 3. Case 4. White matter edema. H – E. × 200

Ryc. 4. Przypadek 1. Przerost i rozplemienie astrogleju w istocie białej. Niektóre astrocyty przypominają komórki Alzheimera typu II. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×
 Fig. 4. Case 1. Hypertrophy and proliferation of astroglial cells in white matter. Some astrocytes resembling Alzheimer, type II cells. Cresyl violet. × 400

astrogleju. Niektóre astrocyty przypominały komórki Alzheimera typu II, miały powiększone jądra i niewidoczną cytoplazmę (ryc. 4). Tylko w tym przypadku stwierdzono ogniska zgąbczeń w okolicy korowo-podkorowej (ryc. 5). We wszystkich przypadkach, w niektórych naczyniach występowało wykrzepianie wewnątrznacyniowe. W oponach mózgu w przypadku 3 obserwowano pojedyncze makrofagi i limfocyty, a w przypadku z krwotokiem podpajęczynówkowym (przyp 2) – pojedyncze leukocyty wokół wybroczyn. W przedstawionych przypadkach nie znaleziono wyraźnego zespołu zmian zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym.

W badaniu anatomopatologicznym w 3 przypadkach (przyp. 1, 2 i 3) stwierdzono w wątrobie stłuszczenie i ogniska martwicy oraz stłuszczenie w przypadku 4 (ryc. 6).



Ryc. 5. Przypadek 1. Zgąbczenie tkanki nerwowej na pograniczu korowo-podkorowym. Klüver-Barrera. Pow. 60 ×

Fig. 5. Case 1. Nerve tissue spongiosis in the cortico-subcortical borderzone. Klüver-Barrera. × 60

Ryc. 6. Przypadek 4. Rozlane stłuszczenie hepatocytów wątroby. H – E. Pow. 400 ×

Fig. 6. Case 4. Diffuse fatty degeneration of liver hepatocytes. H – E. × 400

OMÓWIENIE

W przedstawionych przypadkach zespołu Reye'a analiza zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym wykazała, oprócz obrzęku mózgu, rozsiane ubytki i uszkodzenia neuronów, przede wszystkim kory półkul mózgowych. Manz i Colon (1982) w sekcynie przebadanych przypad-

kach tego zespołu obserwowali w mózgach podobne, a nawet cięższe zmiany. Wieloogniskowe martwice ischemiczne występowały nie tylko w korze, ale również w zwojach podstawy, międzymózgowiu oraz w pniu mózgu i towarzyszyły obrzękowi mózgu we wszystkich przypadkach. Wymienieni autorzy uważają, że początkowe objawy zespołu Reye'a (wymioty, śpiączka) są związane z narastającym obrzękiem mózgu, natomiast podłożem neuropatologicznym późniejszych objawów obserwowanych po przebyciu zespołu (upośledzenie umysłowe, napady padaczkowe, niedowłady połowicze) są liczne, wieloogniskowe mikrozawały w półkulach i w pniu mózgu. Zdaniem Manz i Colon (1982) jest to zgodne z ewolucją uszkodzeń w ośrodkowym układzie nerwowym. Obrzęk mózgu zagraża bowiem mózgowemu przepływowi krwi przez wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego, przez spadek mózgowego ciśnienia perfuzyjnego, a szczególnie przez zamknięcie przepływu krwi we włosniczках. Zmniejszony przepływ mózgowy doprowadza do niedokrwienia i do wieloogniskowych, drobnych, widocznych mikroskopowo zawałów w półkulach mózgu i w pniu mózgu (Venes i wsp. 1978; Manz, Colon 1982). Zaburzenia metaboliczne towarzyszące zespołowi Reye'a (np. hiperamonemia, hiperglikemia) mogą również modyfikować obraz zmian morfologicznych w układzie nerwowym. Obserwowane w jednym z naszych przypadków formy astrogleju, przypominające komórki Alzheimer'a typu II mogą być wyrazem udziału ostrej niewydolności wątroby w rozwoju zmian w mózgu (Mossakowski 1966). Pytanie, w jakim stopniu encefalopatia jest spowodowana wtórnie przez niewydolność wątroby (Huttenlocher i wsp. 1969) pozostaje jednak otwarte. Rozważana jest bowiem możliwość, że początkowe objawy kliniczne zespołu Reye'a wywołuje wspólny czynnik, który uszkadza równocześnie wątrobę i mózg (De Vivo 1984). W świetle wyników badań ultrastrukturalnych hipoteza istnienia takiego czynnika wydaje się prawdopodobna. Partin i wsp. (1975, 1978) w materiale biopsyjnym pobranym z wątroby i tkanki mózgu chorych z zespołem Reye'a stwierdzili nieprawidłowe mitochondria w hepatocytach i podobnie zmienione mitochondria w neuronach. Analogiczne zmiany w mitochondriach włókien mięśniowych, zwłaszcza typu I, obserwowali w biopsjach mięśni Hanson i Urizar (1977). Wyniki te pozwalają przypuszczać, że czynnik wywołujący zespół Reye'a (wirus?) uszkadza mitochondria komórkowe w sposób uogólniony w różnych narządach. Badanie mikroskopowo-elektronowe mięśni według Shapira i wsp. (1981) może być badaniem morfologicznym, potwierdzającym rozpoznanie zespołu Reye'a. Shapira i wsp. uważają, że dotychczas stosowana biopsja wątroby jest badaniem mniej bezpiecznym ze względu na współistniejącą w tej chorobie koagulopatię.

Przebieg zespołu Reye'a jest znacznie cięższy u dzieci poniżej 2 lat (Huttenlocher, Trauner 1978). Wydaje się, że można to wiązać z trwającym do tego wieku okresem intensywnego dojrzewania mózgu, co czyni go szczególnie wrażliwym na działanie całego zespołu czynników uszkadzających układ nerwowy.

NEUROPATHOLOGY OF REYE'S SYNDROME

Summary

Morphological analysis of changes in the central nervous system was performed in four children who died in the age from 6 months up to 2 years with clinical diagnose of Reye's syndrome. Anatomopathological examination revealed in all cases liver steatosis. Neuropathological study revealed brain edema and multifocal damage and loss of cortical nerve cells in the cerebral hemispheres. On the base of the literature data, actual views on the etiopathogenesis of Reye's syndrome are presented. Worth mentioning are ultrastructural results obtained on biopsy material which revealed similar mitochondrial changes in neurocytes, hepatocytes and muscle cells. This suggests the existence in the Reye's syndrome a common toxic factor which damages simultaneously brain and liver.

НЕВРОПАТОЛОГИЯ СИНДРОМА РЕЙЕ'А

Резюме

Исследовались морфологические изменения центральной нервной системы в 4 секционных случаях у детей в возрасте от 6 месяцев до 2 лет, у которых клинически был поставлен диагноз синдрома Ре́йе'а. При патологоанатомическом исследовании обнаружено ожирение печени. Микроскопическое исследование показало, что наряду с отеком мозга преобладали многоочаговые повреждения и воспадение нейронов в коре больших полушарий мозга. На основании данных литературы даны современные представления об этиопатогенезе синдрома Ре́йе'а. Интересны результаты ультраструктурных исследований биопсии: они показывают сходные повреждения митохондрий в гепатоцитах, нейронах и мышечных клетках. Эти результаты свидетельствуют о том, что при синдроме Ре́йе'а действует токсический фактор, повреждающий одновременно печень и мозг и мышцы.

PIŚMIENNICTWO

1. De Vivo D. C.: The diagnosis and management of Reye syndrome. W: Pediatrics Update. Red. A. J. Moss, U. C.. Los Angeles, 1984, 231–251.
2. Hanson P. A., Urizar R. E.: Ultrastructural lesions of muscle and immunofluorescent deposits in vessels in Reye's syndrome. A preliminary report of muscle biopsies. *Ann. Neurol.*, 1977, 1, 431–437.
3. Huttenlocher P. R., Schwartz A. D., Klatskin C.: Reye's syndrome — Ammonia intoxication as a possible factor in the encephalopathy. *Pediatrics*, 1969, 43, 443–454.
4. Huttenlocher P. R., Trauner D. A.: Reye's syndrome in infancy. *Pediatrics*, 1978, 62, 84–91.
5. Manz H. J., Colon A. R.: Neuropathology, pathogenesis and neuropsychiatric sequelae of Reye syndrome. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 377–395.
6. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropatol. Pol.*, 1966, 4, 231–304.
7. Partin J. C., Partin J. S., Schubert W. K., McLaurin P. L.: Brain ultrastructure in Reye's syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1975, 34, 425–444.
8. Partin J. S., McAdams A. J., Partin J. C., Schubert W. K., McLaurin R. L.: Brain ultrastructure in Reye's disease. Part II. Acute injury and recovery process in three children. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1978, 37, 796–819.
9. Reye R. D. K., Morgan G., Barel J.: Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera. A disease entity in childhood. *Lancet*, 1963, 2, 749–752.

10. Shapira V., Deckelbaum R., Statter M., Tennenbaum A., Aker M. Yarom R.: Reye's syndrome: Diagnosis by muscle biopsy. *Arch. Dis. Child.*, 1981, 56, 287-291.
11. Vanholder R., De Reuck J., Sieben-Praet M., De Coster W.: Reye's syndrome in an adult. *Eur. Neurol.*, 1979, 18, 367-372.
12. Venes J. L., Shaywitz B. A., Spencer D. D.: Management of severe cerebral edema in the metabolic encephalopathy of Reye-Johnson syndrome. *J. Neurosurg.*, 1978, 48, 903-915.

Adres autorów: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-993 Warszawa.

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
DANUTA TALKOWSKA, JADWIGA PANKRAC

MYELIN LIPIDS IN SENILE RAT BRAIN

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The problem of brain ageing may be considered from different points of view. One of possible approaches involves the study of changes in the chemistry of membranes of structural components in the nervous tissue. In our previous studies we studied the subject on autoptic human material of patients deceased at an age above 70 years (Wender et al. 1987b). In the same paper we have summarized the data from the literature concerning changes in ageing brain myelin.

Chemical alterations noted by us, both in the frontal lobe and the cerebellum involved an increase in lysophosphatidylcholine content and marked decrease in myelin yield. In the cerebellum additionally a decrease in sulfatide content and a slight increase of phosphatidylethanolamine was noted. The results were almost identical in two groups of patients, differing in the neuropathological pattern of lesions, i.e. in patients with dominant vascular changes in the brain and in those with senile atrophy of Alzheimer type.

Studies of the autoptic material are valuable, because they provide the only chance to evaluate directly the changes in the human brain. However, there exists a risk that the observed alterations might be modified by secondary factors such as long lasting treatment, agonal as well as postmortal changes. Therefore, we have repeated the studies on material of aged rats, in which it was possible to avoid the above mentioned secondary changes.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on the material of 14 Wistar rats of both sexes, sacrificed at the age of more than 2 years. The results were compared with those established in 6 young adult animals (4–6 months old).

Isolation of myelin

The whole rat brain was the source of myelin fraction, isolated according to the method of Norton and Poduslo (1973). The final sediment was lyophilized.

Extraction of myelin lipids

Lyophilized myelin samples were extracted and partitioned according to Folch-Pi et al. (1957). After separation of the chloroform phases, the extracted total lipids were separated by means of column and thin-layer chromatography, after Svennerholm (1964) and Singh et al. (1971).

Determination of lipids

Cholesterol was quantitated using the method of Sperry and Webb (1950) and galactolipids — by the method of Radin et al. (1955). Phosphorus content of the so separated and identified spots was determined after elution, using the method of Bartlett (1959).

RESULTS

Results of studies on myelin lipids of aged brain in rats are presented in Table 1 and those pertaining to the pattern of phospholipids are shown in Table 2.

The characteristic deviations in the aged brain involved all main lipid fractions, i.e. cholesterol, phospholipids and galactolipids. As to the first fraction, the level of free cholesterol was unchanged, but a marked increase of cholesterol esters was noted. Very pronounced deviations involved galactolipids, both fractions of which, sulfatides and cerebrosides were significantly decreased. In phospholipids, a very striking difference was the marked increase of lysophosphatidylcholine. Also two other phospholipids: phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine showed a significant increase in the aged myelin.

Table 1. Pattern of myelin lipids of the brain of aged rats
Tabela 1. Obraz lipidów mieliny istoty białej mózgu starzejących się szczurów

	Results in mmol/100 g of dry myelin Wyniki w mmol/100 g suchej mieliny		Results in % of total lipids Wyniki w % całkowitych lipidów	
	Young adult rats Młode dorosłe szczury	Aged rats Starzejące się szczury	Young adult rats Młode dorosłe szczury	Aged rats Starzejące się szczury
Cholesterol	39.3 ± 2.0	39.8 ± 2.7	30.6 ± 0.6	30.4 ± 1.7
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.1 ± 0.03	1.7 ± 0.3**	0.01 ± 0.01	1.3 ± 0.2**
Sulfatides Sulfatydy	3.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1**	6.8 ± 0.4	4.9 ± 0.3**
Cerebrosides Cerebrozydy	14.7 ± 0.2	12.2 ± 0.6**	23.7 ± 0.7	19.8 ± 0.9*
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	18.4 ± 0.2	14.9 ± 0.7**	30.5 ± 0.8	24.7 ± 1.2**
Sphingomyelins Sfingomieliny	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2*	2.1 ± 0.1	3.0 ± 0.3
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	7.7 ± 0.7	8.8 ± 0.6*	12.5 ± 0.7	13.9 ± 0.5

Tabela 1.

	Results in mmol/100 g of dry myelin Wyniki w mmol/100 g suchej mieliny		Results in % of total lipids Wyniki w % całkowitych lipidów	
	Young adult rats Młode dorosłe	Aged rats Starzejące się	Young adult rats Młode dorosłe	Aged rats Starzejące się
	szczury	szczury	szczury	szczury
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.6±0.07	1.6±0.1**	0.6± 0.1	1.6±0.2*
Phosphatidylserine + Phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + Fosfatydyloinozytol	2.5±0.2	2.7±0.3	4.4± 0.2	4.6±0.4
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	2.8±0.1	5.3±0.4**	4.1± 0.2	7.6±0.2**
Plasmalogens Plazmalogeny	10.3±0.3	9.0±0.8	15.2± 0.3	12.9±0.4**
Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	25.1±1.3	29.3±1.8	38.9± 0.7	43.6±1.1*
Young adult rats: Młode dorosłe szczury:	n - 6	Mean ± SEM	Statistical significance	
Aged rats: Starzejące się szczury:	n - 14	Średnia ± średni błąd średniej	Znamiennosc statystyczna	
			*p ≤ 0.05	
			**p ≤ 0.01	

Table 2. Pattern of myelin phospholipids of the brain of aged rats

Tabela 2. Obraz lipidów mieliny istoty białej mózgu starzejących się szczurów

	Results in % of total phospholipids Wyniki w % całkowitych fosfolipidów		
	Young adult rats Młode dorosłe	Aged rats Starzejące się	
	szczury	szczury	
Sphingomyelins Sfingomieliny	5.3±0.3	7.0±0.6	
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	32.1±1.2	31.9±0.5	
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	1.6±0.2	3.9±0.7*	
Phosphatidylserine + Phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + Fosfatydyloinozytol	11.3±0.5	10.9±0.8	
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	10.5±0.5	17.2±0.8**	
Plasmalogens Plazmalogeny	39.2±0.9	29.1±0.8**	
Young adult rats: Młode dorosłe szczury:	n - 6	Mean ± SEM	Statistical significance
Aged rats: Starzejące się szczury:	n - 14	Średnia ± średni błąd średniej	Znamiennosc statystyczna
			*p ≤ 0.05
			**p ≤ 0.01

DISCUSSION

Chemical studies of myelin in the ageing brain have shown several deviations in the lipid pattern in comparison with that characteristic for the adult age. The findings observed by us as well as by other authors (Horrocks 1973; Horrocks et al. 1975; Wender et al. 1987b) concern the first of all a decrease in total myelin content in the brain, noticed as a decrease of myelin yield. The other alterations involved changes in the composition of myelin as well as of other membranes of the nervous tissue.

In our studies of the ageing rat brain we established a marked transformation of the myelin lipid pattern: increased content of phospholipids, mainly of lysophosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine with a reciprocal decrease of galactolipids, both sulfatides and cerebrosides. In aged myelin some excess of cholesterol esters has also been noticed. The general trends in deviations of the myelin lipid pattern in the course of ageing in rats resemble those described in our previous studies concerning human autolytic material. However, the changes were more pronounced in the animal brain.

Deviations in lipid content and composition of aged myelin must have resulted from changes in the rate of anabolism, catabolism or both. Horrocks (1973) studied the turnover of ethanolamine phosphoglycerides in myelin mitochondrial and microsomal fractions from brains of mice aged 40, 150, and 730 days. In aged mice the turnover rate was only 1/3 to 1/6 the rate observed at an early adult age. These decreased metabolic rates reflect decreased enzyme activities.

Gaiti et al. (1986), studying the phospholipid metabolism in ageing brain, expressed the opinion that the aging brain loses progressively its ability to synthesize the main phospholipids by the *ex novo* pathway. This loss may be due to various causes, however, the most important seems to be the reduced capability to utilize the simplest precursors of phosphoglyceride biosynthesis. The phenomenon is not general because phosphatidyl synthesis in some brain areas, as in the hippocampus, is relatively unaffected by aging. The same concerns some selectivity in various phospholipid fractions, because, as we have noticed, some myelin phospholipid fractions are more affected than others. This results in transformation of the phospholipid composition of myelin membranes in the ageing brain.

In the aged myelin of rats we have observed an increased content of lysophosphatidylcholine and cholesterol esters. Both phenomena are typical for degenerative changes of the myelin sheath, the first for the late period of myelin decomposition, while the second one for early demyelinating lesions. We observed the same in myelin of rat brain after experimental hypoxia (Wender et al. 1987a). These observations testify that the increased amount of lysocompounds or increased cholesterol esterification alone do not lead to demyelination, unless supplemented by the activity of cellular components,

provoked by immunological reactions. The increased content of lysocompounds and cholesterol esters in myelin is only a sign of degenerative changes in a broad sense.

CONCLUSIONS

1. Aged rat myelin exhibits in the lipid pattern an increase of lysophosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cholesterol esters contents, whereas sulfatides and cerebrosides are decreased.
2. In the ageing rat brain some transformation of the phospholipid pattern of myelin membranes takes place.
3. The increased content of lysocompounds and cholesterol esters in aged myelin are signs of degenerative changes in the brain membranes.

LIPIDY MIELINY W STARCZYM MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Badano obraz lipidów mieliny w mózgu szczurów o wieku powyżej 2 lat. Wyniki porównano z danymi uzyskanymi u młodych dorosłych zwierząt (4–6 miesięcznych).

Obraz lipidów mieliny badano przy użyciu metod chromatografii kolumnowej i cienkowsarstwowej.

Uzyskane wyniki doprowadziły do następujących wniosków:

1. Obraz lipidów mieliny mózgu starczych szczurów wykazuje wzrost zawartości lysofosfatydylocholina, fosfatydyloetanolaminy i estrów cholesterolu, przy spadku zawartości sulfatydów i cerebrozydów.
2. W starzejącym się mózgu szczura następuje przekształcenie obrazu fosfolipidów błon mielinowych.
3. Wzrost zawartości lizozwiązków i estrów cholesterolu w starzejącej się mielinie stanowi objaw zmian zwyrodnieniowych tej błony mózgu.

ЛИПИДЫ МИЕЛИНА В МОЗГУ СТАРЫХ КРЫС

Резюме

Исследовались липиды миеллина в мозгу крыс в возрасте старше 2 лет. Результаты сравнивались с данными, полученными на молодых взрослых животных (4–6 месяцев). Исследования проводились с применением колоночной и тонкослойной хроматографии.

Полученные результаты дали возможность сделать следующие выводы:

1. Анализ липидов миеллина мозга старых крыс свидетельствует об увеличении количества лизофосфатидилхолина, фосфатидилэтаноланина и эфиров холестерина и понижении количества сульфатидов и cerebroзидов.
2. В мозгу старых крыс происходит изменение спектра фосфолипидов миелиновых мембран.
3. Увеличение количества лизосвязей и эфиров холестерина в миелине мозга старых крыс является проявлением дегенеративных изменений этих мембран.

REFERENCES

1. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466–468.
2. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497–511.
3. Gaiti A., Gatti C., Puliti M., Brunetti M.: Phospholipid metabolism in aging brain. In: *Phospholipid research and the nervous system*. Eds. L. Horrocks, L. Freysz, G. Toffano. Fidia Research Series, vol. 4, Liviana Press, Padova, 1986, 225–231.
4. Horrocks L.: Composition and metabolism of myelin phosphoglycerides during maturation and aging. In: *Neurobiological aspects of maturation and aging*. Ed. D. Ford. *Progress in Brain Research*, vol. 40, Elsevier, Amsterdam, 1973, 383–395.
5. Horrocks L., Sun G., D'Amato R.: Changes in brain lipids during aging. In: *Neurobiology of aging*. Eds. J. Ordy, K. Brizzee. *Plenum Publ. Comp.*, New York, 1975, 359–367.
6. Norton P., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method for myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749–758.
7. Radin N., Levin F., Brown J.: Determination of cerebroside. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789–796.
8. Singh H., Spritz M., Geyer B.: Studies of brain myelin in the “quaking mouse”. *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473–483.
9. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97–106.
10. Svennerholm L.: The determination of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839–859.
11. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipids. *Neuropat. Pol.*, 1987a, 25, 107–115.
12. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Szczech J., Godlewski A.: Pattern of myelin lipid on the aging brain. *Neuropat. Pol.*, 1987b, 25, 235–245.

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

DANUTA MARKIEWICZ, LUDWIK MATUSZKIEWICZ, ELŻBIETA PAWIŃSKA*

PODOSTRE STWARDNIAJĄCE ZAPALENIE MÓZGU Z ROZLANYM USZKODZENIEM KORY W PRZYPADKU Z PRZEBYTYM URAZEM CZASZKI

Zakład Diagnostyki Patomorfologicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, *Oddział Neurologiczny Wojewódzkiego Szpitala Dziecięcego, Dziekanów Leśny

W badaniach dotyczących topografii procesu patologicznego w podostrym stwardniającym zapaleniu mózgu (panencephalitis scleroticans subacuta — SSPE) stwierdza się często maksymalne natężenie zmian w istocie białej półkul mózgowych. Przeważające lub równe istocie białej zajęcie kory obserwowano stosunkowo rzadko (Osetowska 1980). W serii 50 przypadków przebadanych neuropatologicznie przez Osetowską (1959, 1961) na dużych skrawkach półkulowych tylko w 3 przypadkach autorka stwierdziła przeważające uszkodzenie kory, w 10 przypadkach zmiany w korze i istocie białej wykazywały jednakowe nasilenie, natomiast w pozostałych 35 przypadkach w zespole patomorfologicznym dominowały zmiany w istocie białej półkul mózgowych. Patomechanizm uszkodzeń kory w SSPE nie jest dokładnie poznany. W piśmiennictwie z tego zakresu podkreślano możliwość współdziałania wielu czynników, przy czym szczególnie dużo uwagi poświęcono zaburzeniom krążenia i oddychania, uszkodzeniu ścian naczyń i obrzękowi mózgu (Tariska 1961, 1966; Koernyey 1965; Fontana i wsp. 1967; Csermely, Szües 1970).

Przedstawiony przypadek SSPE wydaje się interesujący ze względu na przebyty uraz czaszki przez pacjentkę i jego modyfikujący wpływ na przebieg kliniczny schorzenia i związane z tym trudności diagnostyczne, jak również ze względu na obraz morfologiczny mózgu z rozległym uszkodzeniem kory.

OPIS PRZYPADKU

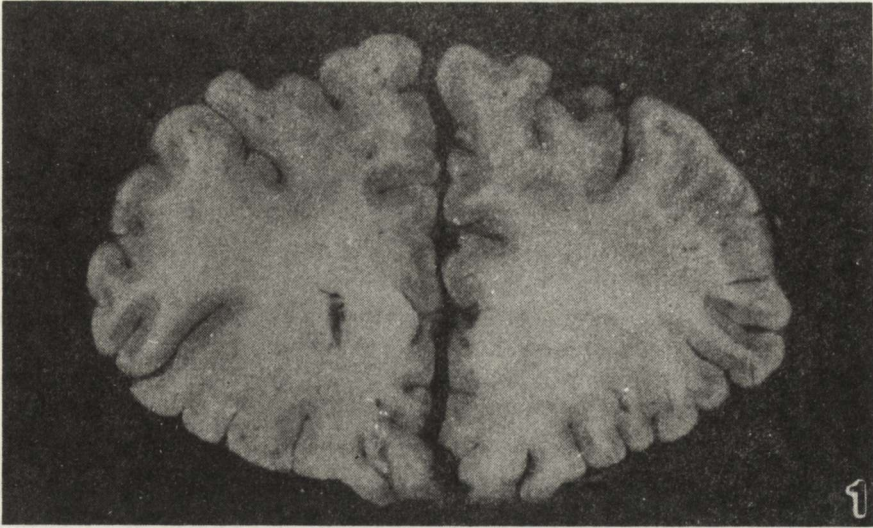
Dziewczynka lat 14, zdrowa w opinii rodziców, doznała urazu w wypadku drogowym i została przyjęta do Oddziału Neurologicznego Wojewódzkiego Szpitala Dziecięcego w Dziekanowie Leśnym (Nr ks. gł. 2841/85) z powodu wstrząśnienia mózgu, złamań kości żuchwowej i udowej oraz ogólnego potłuczenia. W czasie pierwszych 4 tygodni hospitalizacji stan kliniczny chorej

poprawiał się i rokowanie wydawało się pomyślne. Po tym okresie pojawiły się senność i szybko narastające zaburzenia kontaktu, a w badaniu neurologicznym stwierdzono niedowład czterokończynowy z lewostronnymi objawami piramidowymi. Na дне oczu widoczne było lekkie zatarcie granicy tarcz nerwów wzrokowych od góry i nosa z nieznacznym poszerzeniem żył. W badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego stwierdzono nieznacznie wzmożoną pleocytozę (28/3), poziom białka był w normie (44 mg%). Badanie CT mózgu nie wykazało zmian. W zapisie EEG obserwowano rozszlane zmiany w postaci polimorficznych fal delta, średnio i wysokonapięciowych o częstości 2–3 c/s, o charakterze uogólnionym z nieznaczną przewagą w lewej półkuli. W ciągu 2 tygodni od wystąpienia objawów pogorszenia, a w 6 tygodni po wypadku rozwinął się zespół sztywności odmóżdzeniowej z prężeniami całego ciała. Ponownie wykonane badanie CT mózgu wykluczyło obecność krwiaka śródczaszkowego. Wyniki pozostałych badań diagnostycznych, wykonanych z powodu pogorszenia stanu dziecka, jak również zespół objawów neurologicznych wskazywały na rozwój procesu chorobowego o charakterze ogólnomózgowym, nie związanym bezpośrednio z uszkadzającym działaniem urazu. Na krótko przed zgonem dziewczynki, rodzice nastawieni roszczeniowo do sprawy urazu, zdecydowali się na uzupełnienie wywiadu dotyczącego okresu przedwypadkowego. Podali oni, że w roku szkolnym poprzedzającym wypadek zasięgałi porady specjalistycznej w związku ze skargami dziecka na bóle głowy i obserwowane trudności w nauce. Uzyskano ponadto informację, że w wieku 2–3 lat dziewczynka przebyła odrę. Natychmiast wysłano krew chorej na oznaczenie przeciwciał przeciwodrowych i uzyskano wynik: OZHA z wirusem odry 1:512. Przed śmiercią dziewczynka zagorączkowała bardzo wysoko, wystąpiły objawy zapalenia płuc i układu moczowego. Zmarła po upływie 3 miesięcy od wypadku wśród objawów zatrzymania czynności serca. Klinicznie rozpoznano SSPE, posocznicę, stan po przebyłym urazie (wypadek lokomocyjny).

Wynik badania sekcyjnego (dr L. Matuszkiewicz): z istotnych odchyień stwierdzono prawostronne płatowe zapalenie płuc, częściowo ropne, posocznica.

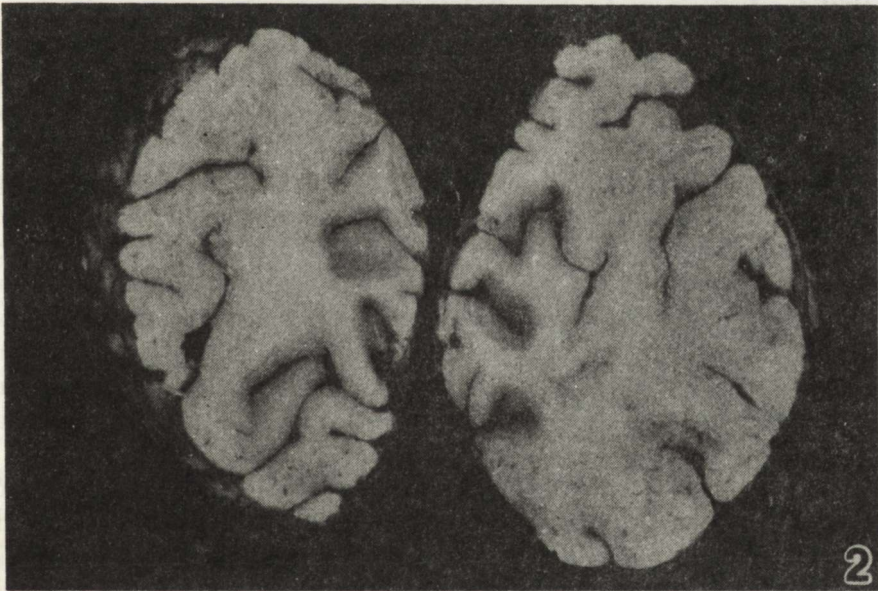
Badanie neuropatologiczne

Badanie makroskopowe mózgu utrwalonego w formalinie, poza wkliniowaniem haków i migdałków mózdzku oraz przekrwieniem opon miękkich, wykazało rozległe uszkodzenie kory i istoty białej półkul mózgowych. W okolicy biegunów czołowych widoczne było obustronnie odcinkowo występujące zatarcie granicy korowo-podkorowej (ryc. 1). Podobne zmiany stwierdzono również w obu płatach skroniowych i ciemieniowych. Natomiast w okolicy styków ciemieniowo-potylicznych i w płatach potylicznych uszkodzenie kory było rozlane i wykazywało wyraźnie widoczne cechy rozpadu tkanki w postaci zatarcia rysunku, ziarnistej powierzchni przekroju i obniżenia spoistości (ryc. 2). Istota biała półkul miała szarawe zabarwienie o niejednorodnym, plamistym



Ryc. 1. Przekrój przez półkule mózgu na poziomie biegunów czołowych. Obustronnie zwężenie i zatarcie rysunku kory oraz odcinkowe zatarcie granicy korowo-podkorowej, zwłaszcza w górnej i dolnej części bieguna czołowego lewego. Wielkość naturalna

Fig. 1. Coronal section on the level of frontal poles. Bilateral thinning and obliteration of cortical structure. Focal obliteration of cortico-subcortical border, especially in upper and lower parts of the left frontal pole. Natural size



Ryc. 2. Przekrój przez półkule mózgu na poziomie biegunów potylicznych. Obustronnie rozlane uszkodzenie istoty białej i kory z wyraźnie widocznym rozpadem tkanki na całej niemal powierzchni przekroju. Wielkość naturalna

Fig. 2. Coronal section on the level of occipital poles. Diffuse white matter and cortical damage with clearly visible tissue disintegration. Natural size

wyłądzie. Największe nasilenie zmian w istocie białej stwierdzono, podobnie jak w obrębie kory, na poziomie styku ciemieniowo-potylicznego z obniżeniem spoistości tkanki, zwłaszcza w osi zawojów bocznej, górnej i dolnej części mózgu. W zwojach podstawy, we wzgórzu, pniu mózgu oraz mózdzku nie stwierdzono zmian uchwytynych makroskopowo.

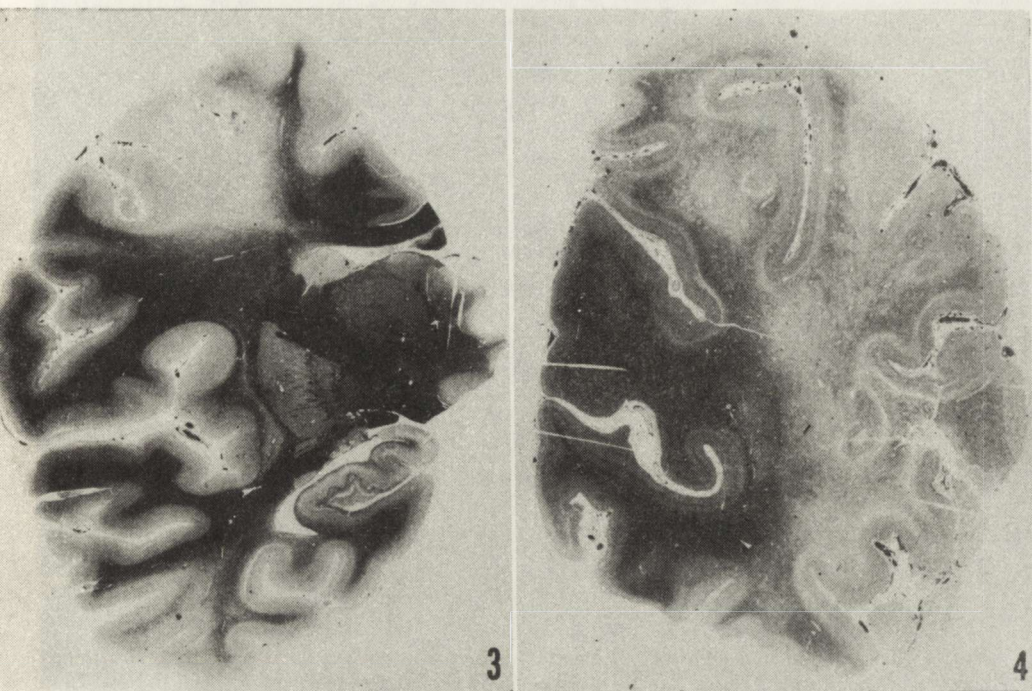
Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z półkul mózgu na poziomie rogów przednich komór bocznych, wzgórza, styku ciemieniowo-potylicznego oraz śródmózgowia, mostu, opuszki i półkul mózdzku. Po odwodnieniu i zatopieniu w parafinie preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem kryzylu oraz według metod Klüvera – Barrery, Heidenhaina, Kanzler – Arendta, van Gieson i Bielschowskiego.

Wyniki badania mikroskopowego

W powiększeniach lupowych preparatów, barwionych według metody Heidenhaina widoczne było uszkodzenie mieliny w istocie białej obu półkul mózgu. Zmiany demielinizacyjne w okolicy czołowej, ciemieniowej i skroniowej obustronnie miały postać klinowatych, rozległych ognisk, nieostro odgraniczonych od otoczenia (ryc. 3). Na poziomie styku ciemieniowo-potylicznego i w płatach potylicznych uszkodzenie mieliny miało charakter rozlany o plamistym wyładzie. Największe nasilenie demielinizacji było widoczne w bocznej części *centrum semiovale* i w osiach zawojów górno-bocznej i podstawnej części półkul mózgowych (ryc. 4). Rozplem pilśni glejowej w polach uszkodzenia mieliny był słabo zaznaczony.

Mikroskopowo widoczne zmiany w mózgu miały charakter uogólniony. Najbardziej nasilone w korze i istocie białej półkul mózgowych, wyraźnie traciły na intensywności w zwojach podstawy i we wzgórzu i były tylko zaznaczone w obrębie pnia mózgu i w mózdzku. Na tle rozlanych, o nierównomiernym nasileniu, zmian rozplemowo-przerostowych gleju komórkowego w korze (ryc. 5), a zwłaszcza w istocie białej półkul mózgu widoczne były okołonaczyniowe nacieki zapalne (ryc. 6). Obfitość nacieków była zmienna, od skąpych jednorzędowych do mufkowatych, utworzonych niemal wyłącznie z limfocytów (ryc. 7). Skład większości nacieków był mieszany, limfocytarno-plazmatocytarny. Widoczne były również nacieki, składające się niemal wyłącznie z komórek plazmatycznych (ryc. 8). Plazmatocyty występowały często śródtkankowo, z dala od naczyń krwionośnych tak w korze, jak i w istocie białej mózgu.

Zmiany neuronalne w korze półkul mózgowych miały charakter uogólniony. W obszarach kory, zlokalizowanych nad polami zdemielinizowanej istoty białej stwierdzono całkowity zanik neuronów w odcinkach obejmujących często więcej niż jeden zawój. W większych powiększeniach widoczne były w tych obszarach na całej szerokości kory gęsto rozsiane gemistocyty przemieszane z mniej lub bardziej licznymi pałeczkami mikrogleju (ryc. 9 i 10). Granica korowo-podkorowa była niewidoczna. Wstążka kory od podkorowej istoty białej odróżniała się bardziej intensywnym różowym zabarwieniem



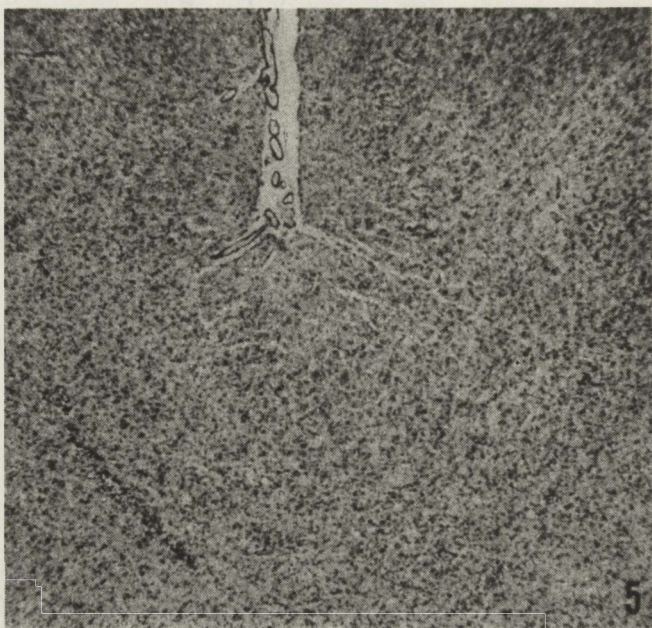
Ryc. 3. Rozległa ogniskowa demielinizacja w płatach ciemieniowym i skroniowym, nieostro odgraniczona od otoczenia. Uszkodzenie osłonek mielinowych obejmuje istotę białą, warstwę U-włókien oraz korę. Heidenhain. Pow. lupowe

Fig. 3. Diffuse, unsharply delineated demyelination in parietal and temporal lobes occupying white matter, subcortical U-fibers and cerebral cortex. Heidenhain. Magn. glass

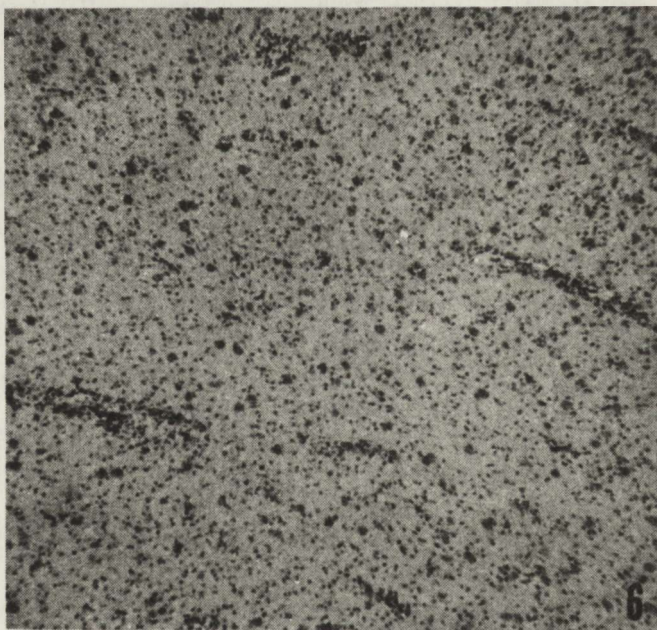
Ryc. 4. Rozlana demielinizacja o nierównomiernym nasileniu obejmuje prawie całą powierzchnię przekroju pogranicza ciemieniowo-potylicznego wraz z warstwą włókien podkorowych i kory. Heidenhain. Pow. lupowe

Fig. 4. Uneven diffuse demyelination of the white matter, subcortical region and cortical fibers in the parieto-occipital region. Heidenhain. Magn. glass

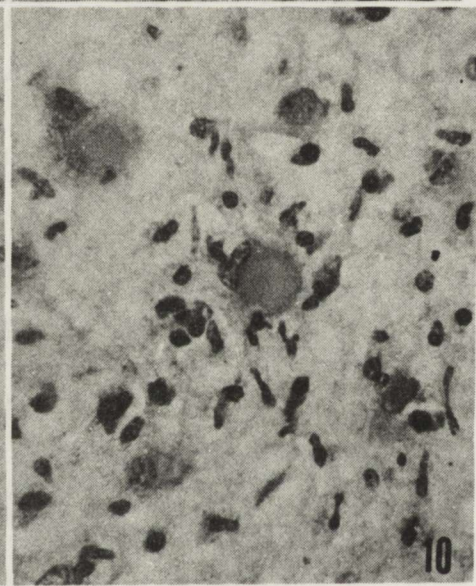
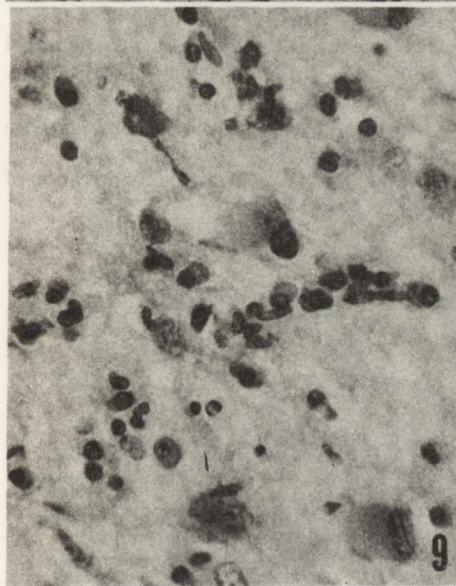
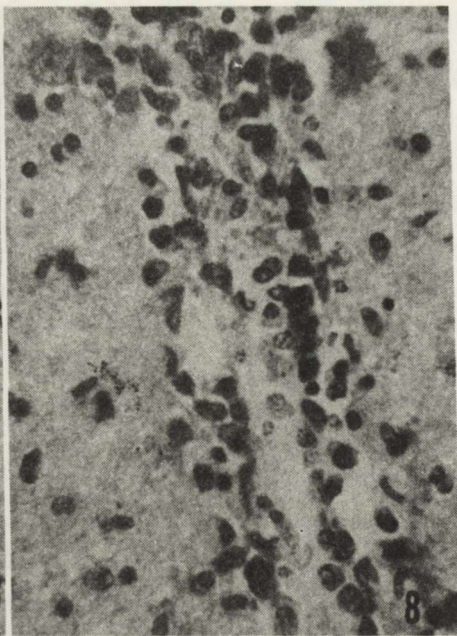
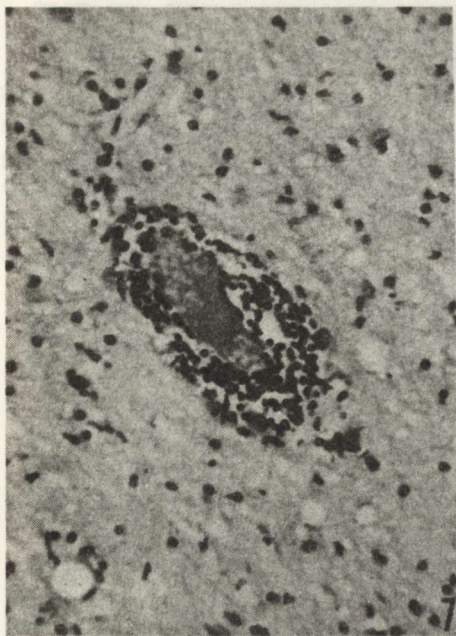
w barwieniu hematoksyliną i eozyną oraz nieco większą homogennością podłoża tkankowego, szczególnie dobrze widoczną w mniejszych powiększeniach mikroskopowych. Na pozostałym obszarze półkul mózgu ubytki komórek nerwowych były najczęściej rozsiane, czasem ogniskowe, obejmujące kilka warstw kory, kiedy indziej odcinkowe, widoczne w jednej lub dwóch warstwach (ryc. 11). Zmianom tym towarzyszyło mniej lub bardziej nasilone zgańczenie. W tych obszarach kory odczyn gleju reprezentowany był niemal wyłącznie przez rozproszone pałeczki mikroglejowe (ryc. 12). Sporadycznie tylko obserwowano grudki neuronofagiczne. W jądrach istoty szarej zlokalizowanych podkorowo rozplem gleju komórkowego miał raczej charakter ogniskowy. Czasem wokół grudek glejowych widoczne było zagęszczenie komórek glejowych, zwłaszcza we wzgórzu (ryc. 13). Nacieki okołonaczyniowe obserwowano sporadycznie. W pniu mózgu znajdowano pojedyncze grudkowate zagęszczenia komórek glejowych. Występowały one w jądrach włas-



Ryc. 5. Kora płata ciemieniowego. Zatarcie budowy warstwowej oraz granicy korowo-podkorowej. W podkorowej istocie białej widoczny skąpy naciek okołonaczyniowy. H—E. Pow. 25 ×
Fig. 5. Obliteration of cortical architecture and cortico-subcortical border in the parietal region. Scanty perivascular infiltration in subcortical white matter. Parietal region. H—E. ×25



Ryc. 6. Istota biała płata ciemieniowego. Rozlany rozplęm gleju komórkowego z obecnością licznych gemistocytów. Widoczne nacieki okołonaczyniowe rozpraszające się w otoczeniu. H—E. Pow. 60 ×
Fig. 6. Parietal white matter. Diffuse proliferation of glial cells with numerous gemistocytes and perivascular infiltrations dispersing in the surrounding tissue. H—E. ×60



Ryc. 7. Mufkowany limfocytny naciek okołonaczyniowy w istocie białej z widocznym rozplmem i przerostem gleju komórkowego. H-E. Pow. 200 ×

Fig. 7. Lymphocytic perivascular cuff in the white matter. Hypertrophy and proliferation of glial cells. H-E. × 200

Ryc. 8. Okołonaczyniowy naciek plazmatocytny w istocie białej. Komórki plazmatyczne widoczne również śródtkankowo. H-E. Pow. 400 ×

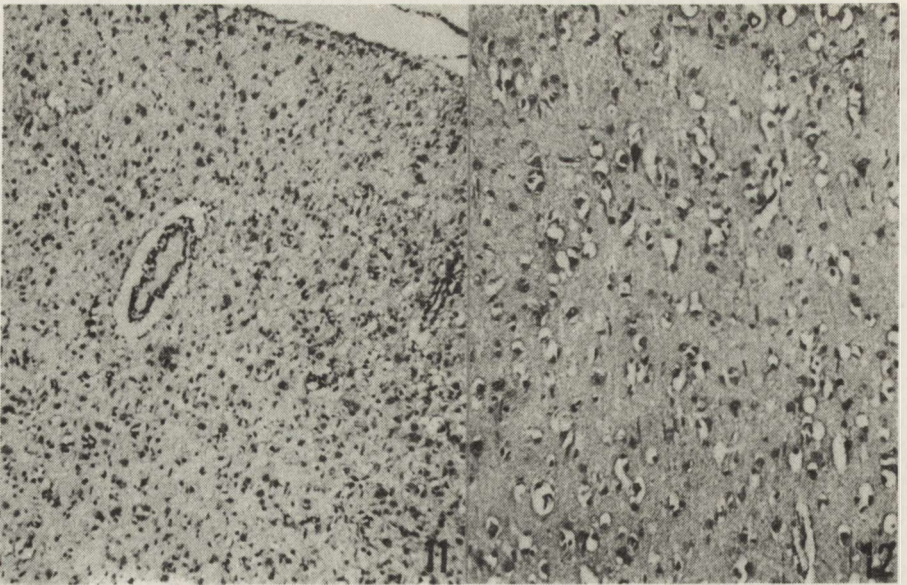
Fig. 8. Perivascular plasmocyte infiltration in the white matter. Plasmocytes in parenchyma are visible also. H-E. × 400

Ryc. 9. Kora płata ciemieniowego. Całkowity brak neuronów, gemistocyty przemieszane z pałeczkami mikroglejowymi pokrywają pole widzenia. H-E. Pow. 400 ×

Fig. 9. Parietal cortex. Total neuronal loss, numerous gemistocytes intermixed with microglial rod cells. H-E. × 400

Ryc. 10. Kora płata ciemieniowego. Liczne komórki plazmatyczne widoczne śródtkankowo. H-E. Pow. 400 ×

Fig. 10. Parietal cortex. Numerous plasmocytes in nervous parenchyma. H-E. × 400

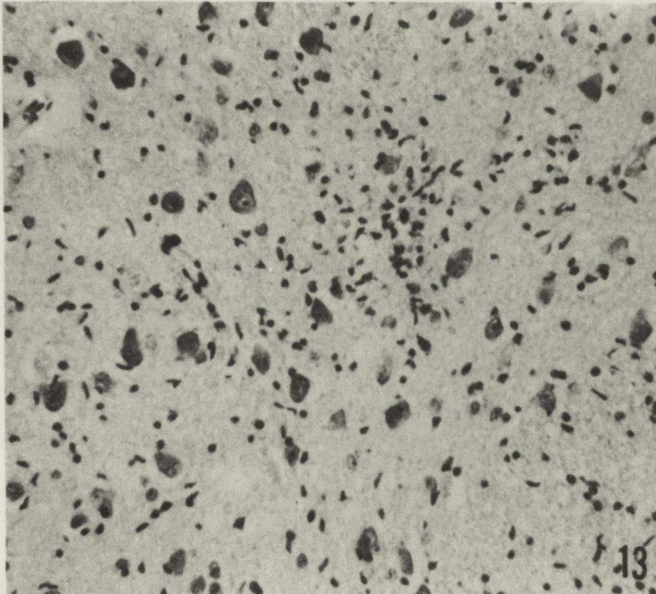


Ryc. 11. Kora płata ciemieniowego z obszaru bez zmian widocznych makroskopowo w barwieniu na osłonki mielinowe. Rozsiane ubytki neuronalne na całej szerokości kory, zatarcie budowy warstwowej, dyskretne nacieki okołonaczyniowe. H—E. Pow. 60 ×

Fig. 11. Parietal cortex from the region without macroscopically visible tissue lesions. Neuronal atrophy leading to obliteration of cortical structure, discreet lymphocytic infiltrations. H—E. × 600

Ryc. 12. Ten sam obszar kory. Liczne pałeczki mikroglejowe, ubytki neuronalne oraz zatarcie budowy warstwowej. H—E. Pow. 200 ×

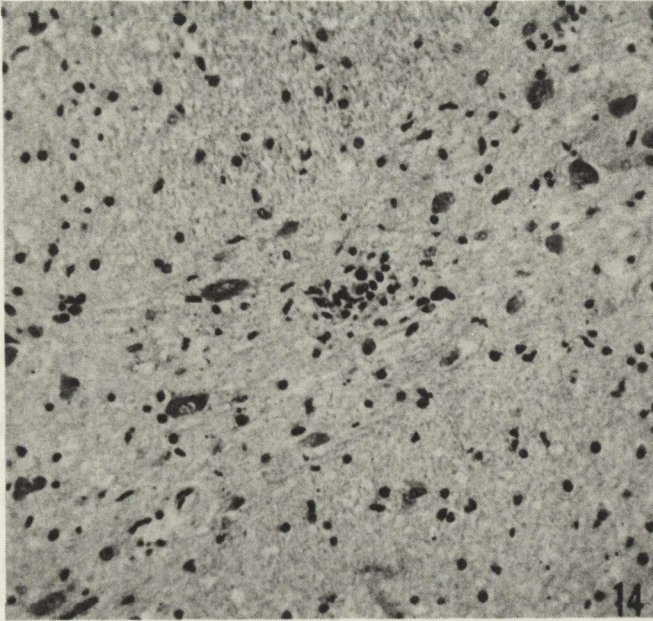
Fig. 12. The same cortical region. Numerous microglial rod cells, neuronal loss and obliteration of cortical structure. H—E. × 200



Ryc. 13. Ławicowy rozplm gleju we wzgórzu z grudką neuronofagiczną. Dyskretne ubytki i uszkodzenia neuronalne. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 13. Thalamus. Proliferation of glial cells and “immature” neuronophagic nodule. Discreet neuronal loss and degeneration. H—E. × 200

nych mostu (ryc. 14) i w oliwkach dolnych. W mózdzku nie obserwowano nacieków okołonaczyniowych ani odczynów glejowych. Widoczne było natomiast przerzedzenie i odcinkowe ubytki w warstwie komórek Purkiniego. W oponach miękkich stwierdzono niewielkie, rozsiane nacieki limfocytarne, zwłaszcza w głębi rowków międzyczawojowych. Wtrętów śródjądrowych w przebadanym materiale nie znaleziono.



Ryc. 14. Grudka neuronofagiczna w jądrach własnych mostu. H—E. Pow. 100 ×
 Fig. 14. Neuronophagic nodule in pontine nuclei. H—E. ×100

OMÓWIENIE

Rozpoznanie SSPE jako podstawowego procesu chorobowego w przedstawionym przypadku nie było klinicznie łatwym zadaniem. Przypomnijmy, że 14-letnia dziewczynka została przyjęta do szpitala po urazie z powodu utraty przytomności, złamań kośćca oraz ogólnego potłuczenia. Rodzice dziecka, nastawieni roszczeniowo, nie wiadomo świadomie czy z braku rozeznania utrzymywali, że ich córka była zdrowa do czasu wypadku. Wobec ciężkiego zagrożenia życia dziecka, przy ciągłym nacisku ze strony lekarzy z powodu niemożności wytłumaczenia pogorszenia w stanie zdrowia pacjentki bezpośrednimi następstwami urazu dopiero na krótko przed zgonem dziecka rodzice ujawnili fakty, bardzo istotne dla dalszego postępowania diagnostycznego. Rostrzygające znaczenie dla ostatecznego rozpoznania SSPE miało stwier-

dzenie wysokiego miana przeciwciał przeciwdrobnoustrojowych w surowicy krwi chorej. Rozpoznanie kliniczne zostało potwierdzone badaniem neuropatologicznym, w którym stwierdzono obecność zmian uznanych za typowe dla SSPE (van Bogaert 1957; Osetowska 1980). Jednakże w typowym dla SSPE obrazie neuropatologicznym nie mieszczą się stwierdzone w naszym przypadku wyraźnie zaznaczone cechy encefalopatii, a przede wszystkim rozlane uszkodzenie kory mózgu z wyraźnym rozpadem martwiczym. Obserwowany na dużych obszarach kory całkowity zanik neuronów z obfitym rozplemem gemistocytów, jak również obraz uszkodzenia mieliny i towarzyszących demielinizacji odczynów przekraczają zespół zmian tkankowych stanowiących wykładnik pierwotnego procesu patologicznego. Widoczne w niektórych obszarach kory półkul mózgowych przerzedzenia neuronalne ze zgębczeniem i obecnością rozsianych pałeczek mikrogleju mogą ewentualnie odpowiadać uszkodzeniom kory w przebiegu SSPE. Tego rodzaju zmiany traktowane są jako wtórne, stanowiące następstwo rozlanego uszkodzenia istoty białej i stwierdzane są zwykle w przypadkach SSPE o przewlekłym przebiegu (Osetowska 1961, 1980).

W przedstawionym przez nas przypadku przebieg kliniczny był bardzo dynamiczny dopiero w okresie powypadkowym, przy czym nie był on również typowy dla SSPE, to jest z charakterystycznym trójfazowym przebiegiem: od fazy zaburzeń psychointelektualnych, przez fazę objawów ogniskowego uszkodzenia mózgu i hiperkinez do fazy końcowej ze sztywnością odmóżdzeniową, prężeniami oraz zaburzeniami krążenia i oddechu. W naszym przypadku, po długotrwałym, skąpoobjawowym okresie zaburzeń psychointelektualnych, rozwinął się gwałtownie zespół odmóżdzeniowy z pominięciem fazy nadmiaru ruchów. Z klinicznego punktu widzenia można to przypisać modyfikującemu przebieg schorzenia wpływowi urazu, znajdującemu również wykładnik w rozległości i nasileniu uszkodzeń parenchymalnych w mózgu. Wydaje się to w pełni uzasadnione w świetle badań nad rozwojem uszkodzeń mózgu w encefalopatii pourazowej w materiale ludzkim (Feigin, Popoff 1963; Girard i wsp. 1963, 1968; Osetowska 1964). Wprawdzie w badaniu neuropatologicznym nie znaleziono w naszym przypadku ognisk stłuczenia, ani śladów wynaczynień krwi w mózgu, na podkreślenie zasługuje duże uszkodzenie okolicy czołowej, szczególnie na podstawie półkul, rzadko obserwowane w SSPE (Osetowska 1959; Schulze, David 1968), natomiast stanowiącej typową lokalizację zmian pourazowych (Kałuża 1963). Za udziałem urazu w kształtowaniu się obrazu zmian morfologicznych w mózgu w przedstawionym przez nas przypadku przemawia również obraz uszkodzenia mieliny odpowiadający zespołowi określonego przez Jacoba (1948) jako martwica obrzękowa, często obserwowana w encefalopatiach pourazowych z przedłużonym przeżyciem po przebyciu urazu.

Reasumując – w przedstawionym przypadku obraz morfologiczny uszkodzenia mózgu, oprócz zmian zapalnych, typowych dla SSPE wykazuje zmiany, charakterystyczne dla encefalopatii pourazowej.

SUBACUTE SCLEROSING PANENCEPHALITIS WITH DIFFUSE
CORTICAL DAMAGE IN A CASE WITH THE HEAD INJURY

Summary

The authors present a case of 14-year-old girl with subacute sclerosing panencephalitis, who 3 months before death had been severely injured in a traffic accident. Diffuse cortical damages in SSPE are rather uncommon neuropathological findings and their pathogenetic background is not fully elucidated. In the presented case the influence of head injury on the clinical course of SSPE and neuropathological brain changes is discussed.

ПОДОСТРЫЙ СКЛЕРОЗИРУЮЩИЙ ПАНЭНЦЕФАЛИТ (ПСПЭ) С ДИФФУЗНЫМ
ПОВРЕЖДЕНИЕМ КОРЫ В СЛУЧАЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Резюме

Представлен случай ПСПЭ с диффузным повреждением коры мозга у девочки 14 лет, которая за 3 месяца до смерти перенесла тяжелую черепно-мозговую травму.

Диффузные изменения в коре мозга при ПСПЭ наблюдаются редко. В литературе подчеркиваются также трудности в выяснении механизма их появления.

Обсуждается влияние перенесенной травмы на клиническое течение и морфологическую картину обнаруженных изменений мозга.

PIŚMIENNICTWO

1. Csermely A., Szűcs O.: Über die postoperativen anoxischen Veränderungen des Zentralnervensystems. *Zentralbl. Allg. Pathol.*, 1970, 113, 556–563.
2. Fontan A., Battin J. J.: Leucoencéphalite sclérosante subaigüe, corticothérapie prolongée, varicelle grave. *J. Neurol. Sci.*, 1967, 4, 455–471.
3. Feigin I., Popoff N.: Neuropathological changes late in cerebral edema: the relationship to trauma, hypertensive disease and Binswanger's encephalopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1963, 22, 500–511.
4. Girard P. F., Tommasi M., Trillet M.: Le lésions anatomiques de l'encéphalopathie post-traumatique. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1963, 2, 313–327.
5. Girard P. F., Tommasi M., Rochet M., Boucher M.: Leucoencéphalopathie avec cavitations massives, bilatérales et symétriques. *Presse Med.*, 1968, 76, 163–166.
6. Jacob H.: Zur histologischen Diagnose des akuten und chronisch rezidivierenden Hirnödems. *Z. Gesamte Neurol.*, 1948, 179, 158–162.
7. Kałuża J.: Dynamika zmian morfologicznych w mózgu pod wpływem działania urazu mechanicznego. *Neuropatol. Pol.*, 1963, 1, 123–164.
8. Koernyey St.: Anoxisch-vasale Hirnschädigungen bei allgemeinen und neuralen Infektionskrankheiten. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1965, 4, 278–287.
9. Osetowska E.: Note préliminaire sur la topographie des lésiones cérébrales dans la leucoencéphalite sclérosante subaigüe. *Rev. Neurol. (Paris)*, 1959, 100, 118–129.
10. Osetowska E.: The distribution of telencephalic lesions in subacute sclerosing leucoencephalitis. *W: Encephalitides. Red. L. van Bogaert, Elsevier, Amsterdam*, 1961, 414–469.
11. Osetowska E.: Urazy mózgu a encefalopatie pourazowe. *Neuropat. Pol.*, 1964, 2, 168–190.
12. Osetowska E.: Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *W: Tissue neuropathology of viral and allergic encephalitides. National Science Foundation, Washington D. C., Warsaw*, 1980, 138–166.

13. Schulze H. A. F., David E.: Verteilungsmuster der zerebralen Läsionen und Symptomgestaltung bei der subakuten sklerosierenden Enzephalitis. Psychiatr. Neurol. Med. Psychol. (Leipz.), 1968, 20, 252–265.
14. Tariska St.: The vasal mechanisms responsible for the pathological variations of subacute progressive panencephalitis. W: Encephalitides. Red. L. van Bogaert, Elsevier, Amsterdam, 1961. 541–559.
15. Tariska St.: Remarks on the encephalopathic lesions occurring in encephalitides. Neuropatol. Pol., 1966. 4. 651–654.
16. van Bogaert L.: Die klinische Einheit und die pathologische Variationsbreite der subakuten sklerosierenden Leukoencephalitis. Wien. Z. Nervenheilk., 1957, 13, 185–203.

Adres autorów: Zakład Diagnostyki Patomorfologicznej CMKP, ul. Ceglowska 80, 01-828 Warszawa.

LECH IWANOWSKI

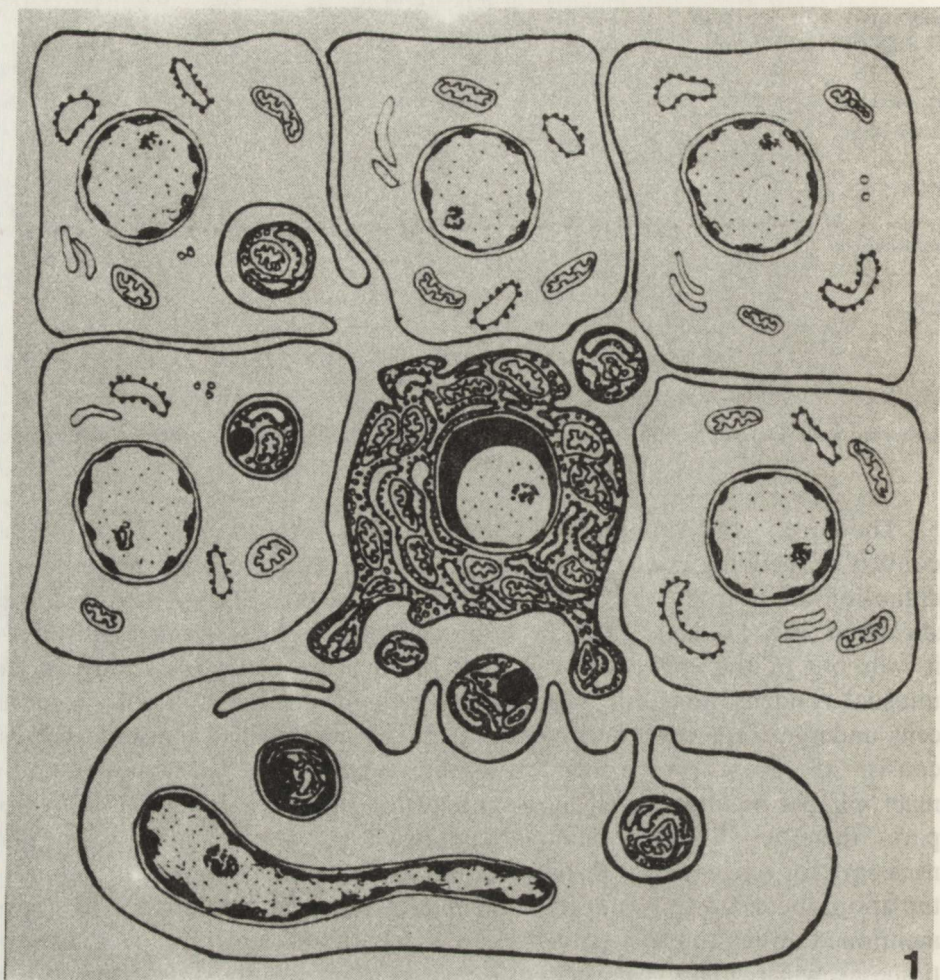
APOPTOSIS AND DARK NEURONS

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw

The Greek word "apoptosis" means dropping, for example it is used in the context of shedding leaves from trees. Kerr (1972) was the first, who used this definition in morphology for controlled cell death. Such a cell becomes shrunken (Fig. 1), the connections with neighbouring cells are lost and finally it falls out of the epithelium cell row. Its nuclear chromatin undergoes an unusual condensation, but the nucleolus remains preserved. Such apoptotic cells undergo fragmentation; the separated cell parts called apoptotic bodies, consist of compact organelles. Apoptotic bodies can be fagocytosed by macrophages or internalized by neighbouring cells. Groniowski (1987) compares them to shrinking baloon, from wich the whole balast, even that necessary for navigation is thrown out for continuation of the flight. Similarly the apoptotic cell disposes of its organelles to continue vegetation. The above mentioned observations suggest that apoptosis should be treated as a form of tissue growth regulation dependent on a local factor, antagonistic to mitosis. The mechanism of apoptosis is quite different from that of cell necrosis.

The phenomenon of apoptosis was observed in some glands with cyclic changes of activity and provoked experimentally in tissue culture treated with various drugs, toxins, hormones, irradiation or chronic gradual hypoxia. The chemical mechanism of chromatin changes in apoptosis consist in breaking of most of the nuclear DNA to short but well organized chains of nucleosomes by an endogenous non-lysosomal nuclease (Wyllie et al. 1981). Mares et al. (1986) observed changes identical with apoptosis in nervous tissue from immature rat cerebellum, in the germinal external layer and called it "shrinkage necrosis".

About 30 year ago Cammermeyer (1961) took note of what is called dark neurons. According to him, in light microscopy the dark cell is characterized by its shrunken cytoplasm containing compacted basophil material giving a dark hue and by its separation from the surrounding tissue by a space of varying length and width. The shrunken nucleus usually blends with the dark



*Fig. 1. Diagram illustrating the morphological features of apoptosis (after Groniowski 1987)
Ryc. 1. Schemat zmian apoptozyjnych (wg Groniowskiego 1987)*

cytoplasm but sometimes it is surrounded by a rim of clear cytoplasm (Fig. 2). The nucleolus is noted for its relatively large size, in fact it remains unaltered, when the whole cell body undergoes shrinkage. The processes of cell shrinkage assume an irregular corkscrew-like shape (Fig. 3). In electron microscopy dark neurons are characterized by a shrunken cytoplasm filled with condensed microorganelles, mainly mitochondria and free rybosomes (Johnson 1975). This gives a dense appearance and contributes to an increased electron density. The nucleus is also condensed. There are no remarks about the nucleolus. The surface of dark neurons is irregular. The descriptions of the electron microscope pictures of dark neurons by different authors are similar despite the different etiology. There exists an abundant literature concerning the

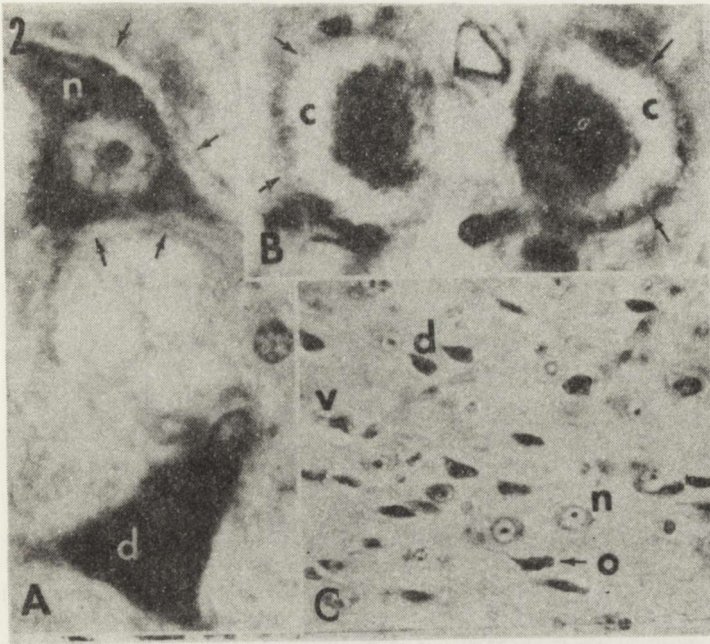


Fig. 2. A. Dark (d) and clear neuron with a distinct peripheral zone (arrows). B. Cells resembling water change with separation of perinuclear cytoplasm (c) from cellular membrane (arrows). C. Cortical dark neurons (d) of varying shape, normal clear neuron (n), acute swelling of oligodendrocyte (o) and perivascular space (v). All artifacts due to immersion fixation (after Cammermeyer 1961)

Ryc. 2. A. Neuron ciemny (d) i jasny (n) z wyraźną przestrzenią między komórką a otaczającym neuropilem (strzałki). B. Komórki przypominające „zmiany wodne” z wyraźnym oddzieleniem okołojądrowej cytoplazmy (c) od błony komórkowej (strzałki). C. Różnego kształtu neurony ciemne (d) w korze mózgu, prawidłowy jasny neuron (n), oligodendrocyt w stanie ostrego obrzęku (o), poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa (v). Wszystkie zmiany są artefaktem, spowodowanym utrwaleniem przez imersję (wg Cammermeyera 1961)

etiology of dark neurons: post mortem available artifacts (Cammermeyer 1961), artifacts dependent on the state of maturation (Ebels 1975), resulting from intravital operations (Johnson 1975) or mechanical lesions (Quiros, Faria 1975), effect of increased pressure in tissue due to swelling of neuronal processes (Love 1978) or of a subpopulation of cells in some regions of the central nervous system (Lawson 1979). Some authors treat the definition “dark cell” and “apoptotic cell” as synonymous (Parson et al. 1983), because in the light microscope they are similar. To consider this problem not only semantically we decided to check retrospectively our own material, both by light and by electron microscopy.

Our material had been collected for years both from control and experimental animals, newborn and mature or senile. All animals were killed by perfusion, prepared for electron microscopy according to routine procedure and embedded in Epon 812. In light microscope examination, dark cells, mainly of mesodermal origin, appeared in normal control (Fig. 4) and senile

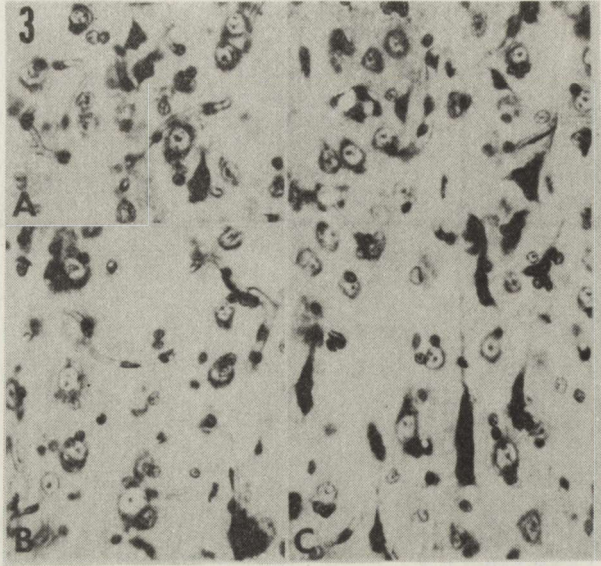


Fig. 3. A. Cortical dark neurons. B. Normal cortical neurons. C. Dark cortical neurons. All artifacts due to mechanical lesion (after Cammermeyer 1961)

Ryc. 3. A. Ciemne neurony w korze mózgu. B. Normalne neurony kory. C. Ciemne neurony kory. Wszystkie artefakty spowodowane uszkodzeniem mechanicznym (wg Cammermeyera 1961)

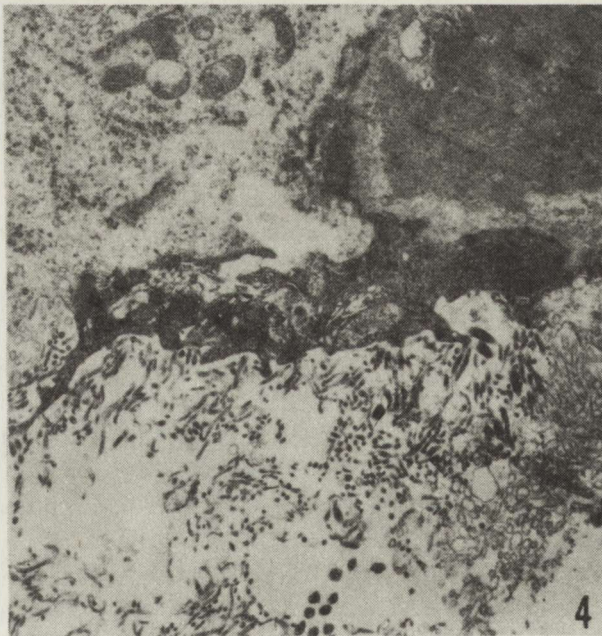


Fig. 4. Dark cell of choroid plexus. Rabbit 20-day-old. $\times 10\,000$

Ryc. 4. Ciemna komórka splotu naczyniówkowego u 20-dniowego normalnego królika. Pow. $10\,000 \times$

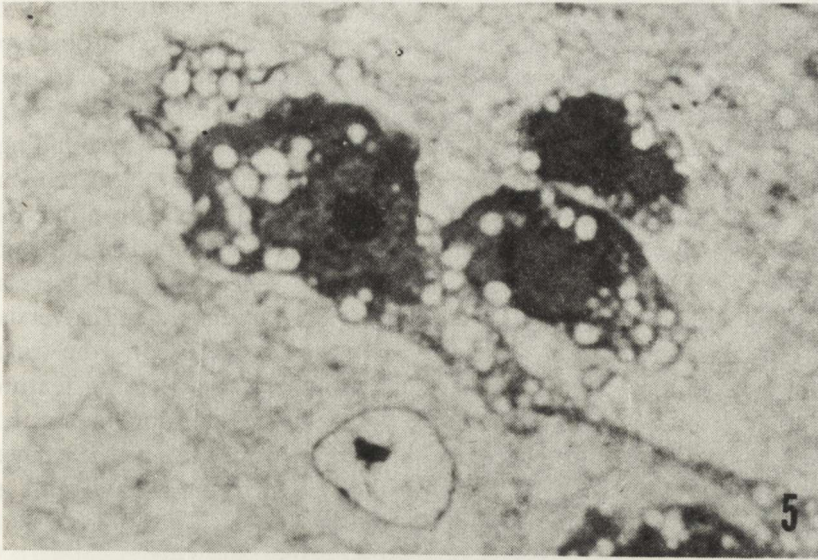


Fig. 5. Dark neurons in spinal cord. 20-day-old rabbit treated with antimetabolic drug. Semithin section. $\times 600$

Ryc. 5. Ciemne neurony w rdzeniu kręgowym królika 12-dniowego, traktowanego lekiem przeciwmitycznym. Skrawek półcienki. Pow. $600\times$

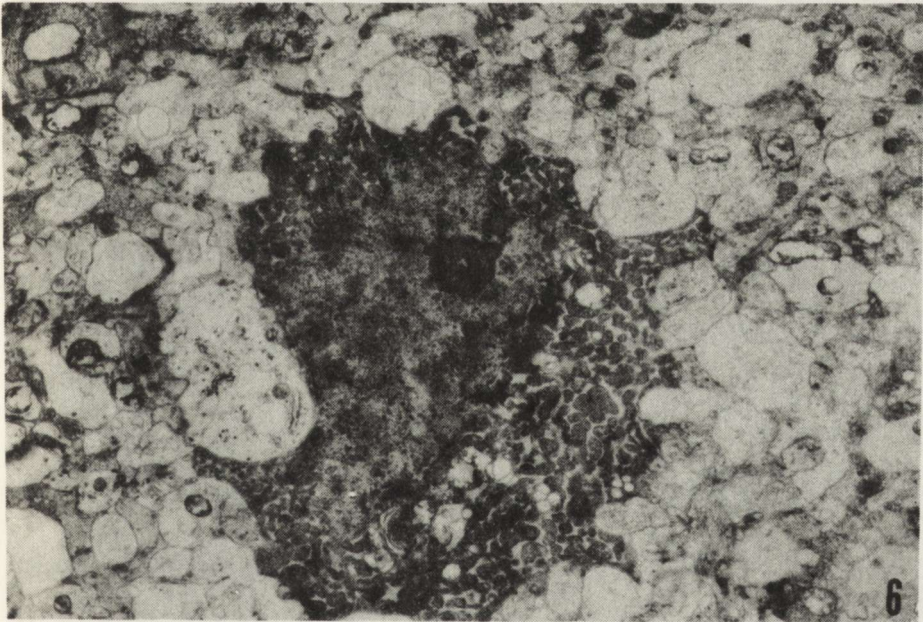


Fig. 6. Dark neuron with shrunken cytoplasm filled with compact organelles. 12-day-old rabbit as above. $\times 6000$

Ryc. 6. Ciemny neuron z obkurczoną cytoplazmą wypełnioną zbitymi organelami. Królik 12-dniowy — jak wyżej. Pow. $6000\times$

animals. They were also seen in a group of 12-day-old rabbits treated with an antimetabolic drug 7 days before death. Dark neurons were observed in a specimen taken from the spinal cord on semithin sections (Fig. 5). In the light microscope the similarity to the dark cells of Cammermeyer (1961) consisted in shrinkage and a dark hue, but their separation from the surroundings by a space was not observed, and the dense compact nuclear chromatin contrasted well with the cytoplasm rich in vacuoles. In the electron microscope shrunken cytoplasm was filled with compact organelles mostly mitochondria (Fig. 6). In the shrunken cytoplasm numerous autophagic vacuoles were noted (Fig. 7). The changes observed in the light microscope were controversial for diagnosing dark neurons or apoptosis. By electron microscopy the fragmentation of cells to apoptotic bodies, which should be the deciding feature for apoptosis, were not found. Therefore, the changes in our material were considered as dark neurons. It seems that dark neurons may be the early stage of apoptosis. Probably some dark neurons may return to a normal state, some may undergo necrosis and some apoptosis.

Acknowledgements: The autor is grateful to dr Jan Cammermeyer for his kind allowance to make use Figures 2 and 3 taken from this paper and to prof. Janusz Groniowski to make use his diagram (Fig. 1).

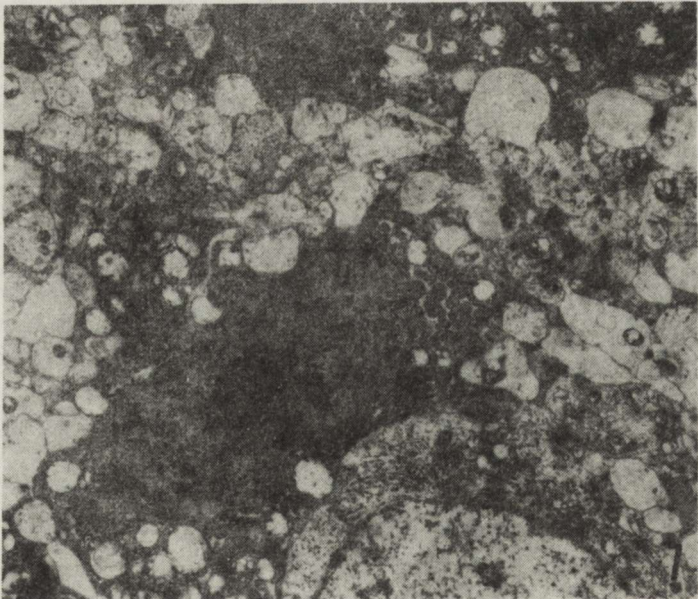


Fig. 7. Dark neuron with numerous autophagic vacuoles in shrunken cytoplasm. 12-day-old rabbit as above. $\times 6000$

Ryc. 7. Ciemny neuron. W obkurczonej cytoplazmie liczne wodniczki autofagiczne. Królik 12-dniowy — jak wyżej. Pow. $6000 \times$

CIEMNE NEURONY I APOPTOZA

Streszczenie

Ciemne neurony, które do niedawna traktowano jako pośmiertne zmiany artefakcyjne powstałe przy utrwalaniu tkanki, obecnie zostały uznane również jako stany przyżyciowe, powstałe wskutek działania różnych czynników. Apoptoza – kontrolowane obumieranie komórek – głównie nabłonka przy jego odnowie, występuje również w ośrodkowym układzie nerwowym. Morfologiczne podobieństwo obu zmian i przypuszczalne mechanizmy ich powstawania są dyskutowane w świetle obserwacji własnych i bieżącego piśmiennictwa.

ТЕМНЫЕ НЕЙРОНЫ И АПОПТОЗИС

Резюме

Темные нейроны, которые до недавних пор рассматривались как посмертные артефактные изменения, возникающие вследствие фиксации ткани, теперь рассматриваются также как прижизненное состояние, связанное с действием различных факторов. Апоптозис – контролируемое омертвление клеток, главным образом эпителия, происходящее в процессе его регенерации – обнаруживается также и в центральной нервной системе. На основе собственных наблюдений и данных современной литературы обсуждается сходство и различие этих двух типов изменений и предполагаемые механизмы их появления.

REFERENCES

1. Cammermeyer J.: The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1961, 1, 245–270.
2. Ebels E. J.: Dark neurons. A significant artifact. The influence of the maturation state of neurons on the occurrence of the phenomenon. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 33, 271–273.
3. Groniowski J.: Apoptosis – ubywanie komórek. *Patol. Pol.*, 1987, 38, 1–10.
4. Johnson J. E., Jr.: The occurrence of dark neurons in the normal and deafened lateral vestibular nucleus in the rat: observations by light and electron microscopy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 31, 117–127.
5. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Curie A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26, 239–257.
6. Lawson S. N.: The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: A statistical analysis of cell numbers and size. *J. Neurocytol.*, 1979, 8, 275–294.
7. Lowe D. A.: Morphological changes in the cat cerebral cortex produced by superfusion of ouabain. *Brain Res.*, 1978, 148, 347–368.
8. Mares V., Scherim E., Biggiogera M., Bernocchi S.: Influence of cis-dichlorodiamineplatinum on the structure of the immature cat cerebellum. *Exp. Neurol.*, 1986, 91, 246–258.
9. Parsons D. F., Marko M., Braun S. J., Wansor K. J.: "Dark cells" in normal, hyperplastic and promoter-treated mouse epidermis studied by conventional and high-voltage electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.*, 1983.
10. Quiros L., Faria L.: Evolution of dark neurons in experimental brain stab wounds. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.*, 1975, 28, 361–370.
11. Wyllie A. H., Beattie C. J., Hargreaves A. D.: Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J.*, 1981, 13, 681–692.

Author's address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteura Str., 02-093 Warszawa

EWA MATYJA, HALINA KROH

ATYPICAL MORPHOLOGICAL COMPONENTS IN A TUMOR OF THE CEREBELLO-PONTINE ANGLE

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

Routine differential diagnose in the case of even most frequent types of cerebello-pontine tumors often fails to give a complete account of their intrinsic histological variety. The purpose of this paper is to illustrate the pathogenetic and diagnostic difficulties in a tumor which at first seemed to represent a rather popular kind of neoplasm in neuropathological practice.

CASE REPORT

The 62-year-old woman was admitted to the Neurosurgical Department with complaints of dizziness, nausea and vomiting worsening during the last two months. The patient suffered for a few years from some deafness in her left ear. Upon admission there was impairment of the left corneal and conjunctiva reflexes, left facial hemiparesis and left side hearing failure. The Romberg syndrome was positive to left side and back. There was no papilledema. Cranial X-ray revealed enlargement of the left internal auditory meatus. EEG: normal, except for some theta waves. CT scan disclosed a tumor about 4 cm in diameter located in the left cerebello-pontine angle, surrounded by a narrow zone of edema and distention of ventricular system. Cerebrospinal fluid examination: cytosis 3, protein content 66 mg%. At craniotomy after partial resection of the left cerebellar hemisphere a large mass of white-grey, firm tumor was removed from the capsule and taken for biopsy. The patient died 5 days later owing to severe vascular disorders.

Autopsy of the visceral organs revealed purulent tracheobronchitis, dispersed purulent pneumonia and pulmonary edema. There was a congestion of visceral organs, hepatic steatosis and myocardial micronecrotic foci.

Biopsy examination of brain tumor showed tissue built of bundles and whorls of cells with elongated rod-shaped nuclei containing a marked amount of fine granular chromatin (Fig. 1). The tumor cellularity differed markedly. There were rather compact areas with typical palisading, whereas the other

fields were of loose reticular texture. Some areas showed much bigger cells with irregular nuclei and some giant cells. Mitotic divisions were scarce. The stroma exhibited a strongly argyrophilic, rich network of thin fibers around the neoplastic cells. The tissue was poorly vascularized. The tumor was diagnosed as neurinoma, type Antony A.

Neuropathologic findings

Weight of brain 1038 g. Right-sided tonsillar herniation. Asymmetry of brain stem and cerebellum caused by whitish-grey large, encapsulated tumor in left cerebello-pontine angle. Lateral surface of tumor rough, devoid of capsule. Frontally cut brain hemispheres showed symmetric dilatation of ventricular system. Cuts through the brain stem and cerebellum demonstrated a tumor of dimensions 4 × 4 cm, firm, elastic with a mottled pattern forming a deep cleft in the left half of the brain stem (Fig. 2). Border between the tumor tissue and the

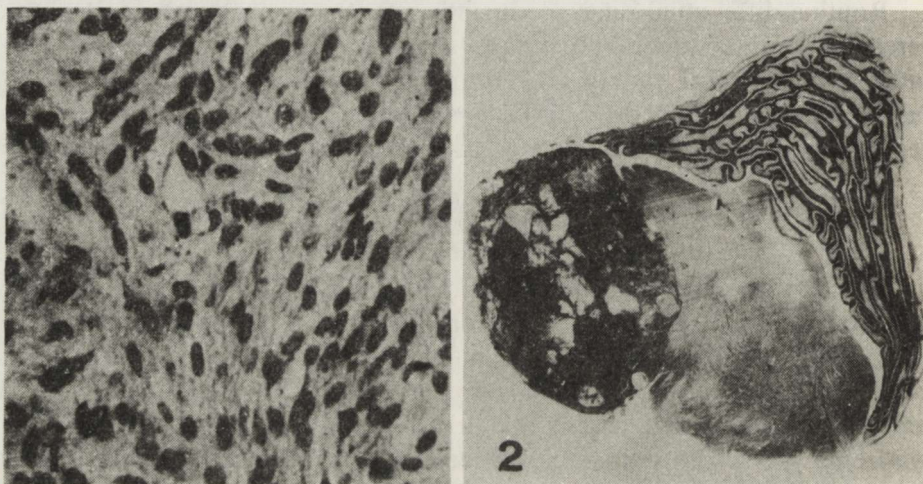


Fig. 1. Biopsy specimen. Spindle-shaped cells, dense cellularity. H—E. × 200

Ryc. 1. Materiał biopsyjny. Bogatokomórkowe utkanie złożone z wydłużonych, wrzecionowatych komórek. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 2. Coronal section of the cerebellum and brain stem. Large extracerebral tumor pressing the brain stem. Van Gieson

Ryc. 2. Przekrój czołowy przez mózdzek i pień mózgu. Duży guz zewnątrzmoźgowy uciskający pień mózgu. Van Gieson

brain stem blurred. IVth ventricle constricted, vermis displaced to the right.

The tumor fragment, attached to the brain stem and cerebellum, was embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin-eosin, cresylviolet and after van Gieson, Klüver-Barrera, Gridley, Heidenhain and Bielschowsky. Other frozen fragments were stained with Oil red O and Mayer's carmine. Cajal impregnation and immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) by modification of immunoperoxidase method with avidine-biotine complex (Vectastain Lab. USA) were also performed.

Microscopic evaluation

The neoplastic tissue was well demarcated from the cerebellar and pontine structures, except for some infiltration of the basal pons along the nervous fibers. Other pontine changes were: loosened bundles of nerve fibers, moderate perivascular edema and ischemic alterations of neurons. Cerebellum showed conspicuous rarefaction of granular layer, moderate loss of Purkinje cells and some proliferation of Bergmann astroglia.

An outstanding feature of the neoplastic tissue was its varying pattern. Most numerous were fields of bipolar spindle cells arranged in intermingled bundles and whorls (Fig. 3). Typical palisading was rare. The cell nuclei were usually elongated, chromatin-rich, less often oval or round with fine granular chromatin. Besides the area of monotypic cells, there were others with more or less marked polymorphic features. These cells were characterized by irregular, hyperchromatic nuclei and rather abundant acidophilic cytoplasm. Among them spread some multinucleated giant cells. In the fields of poorer cellularity the stroma was loose, reticular, whereas the cells were stellate with long, irregular processes. There were also foci of microcystic degeneration (Fig. 4).

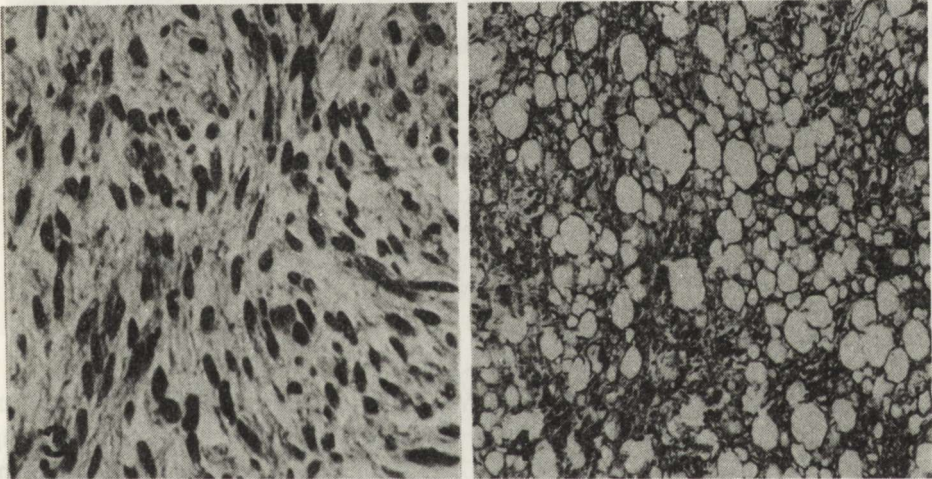


Fig. 3. Necropsy specimen. Intermingled bands of spindle cells. H—E. $\times 200$

Ryc. 3. Materiał autopsyjny. Przeplatające się pasma wydłużonych komórek. H—E. Pow. $200 \times$

Fig. 4. Area of rarefied, degenerated tissue. H—E. $\times 100$

Ryc. 4. Tkanka o rozrzedzonym utkanu z cechami drobnotorbielkowego zwyrodnienia. H—E. Pow. $100 \times$

A fair amount of lipid was visualized in loose neoplastic areas but no mucoid substance. Mitotic divisions, were absent, though the content of nuclear chromatin differed markedly in several fields. A profuse network of collagen fibers was best visible in the fields of high cellular density, but poor or absent

in loose structures. Silver impregnation demonstrated a thick network of argyrophilic fibers: the thick one arranged at random, the thin ones twined around individual neoplastic cells (Fig. 5).

Striking elements were numerous, large, degenerated cells with abundant, slightly eosinophilic cytoplasm and irregular, blurred nucleus (Fig. 6). Additional serial sections taken for elucidating the character of these cells showed

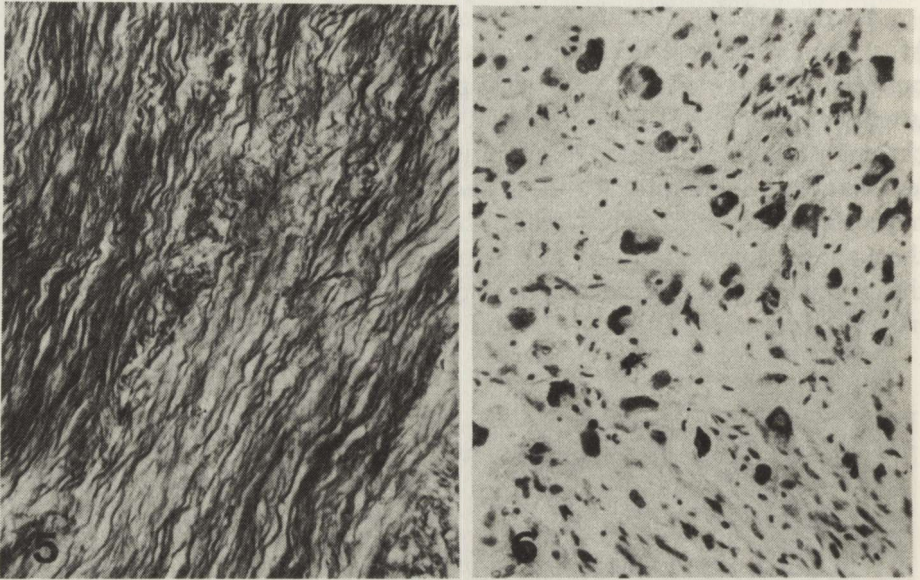


Fig. 5. Thin and thick argyrophilic fibers. Gridley. $\times 100$

Ryc. 5. Cienkie i grube włókna srebrochłonne. Gridley. Pow. 100 \times

Fig. 6. Field of large, irregular, polynuclear cells. H-E. $\times 200$

Ryc. 6. Pole zawierające duże, różnokształtne, wielojądrzaste komórki. H-E. Pow. 200 \times

large, oval or round ganglion cells with a huge vesicular nucleus with clearcut nucleolus and abundant eosinophilic cytoplasm (Fig. 7a). Cresyl violet staining presented thick tigroid granules (Fig. 7b). Some ganglion cells were surrounded by small dark satellite cells. Ganglion cells were never spotted in foci, but dispersed in the tissue, though in places they accumulated at short distance from each other (Fig. 7c). The widest spread of ganglion cells was near to the basal surface of the tumor.

Gold chloride impregnation demonstrated small fields of cells with thin, irregular, rather radial processes some of which seemed to be attached to the vascular walls but they did not stain for glial fibrillary acidic protein.

Few nervous fibers run through the compact neoplastic tissue in the tumor periphery, not far from the capsule but near to the numerous ganglion cells (Fig. 8). Some of the nervous fibers were segmented and showed myelin sheath damage.

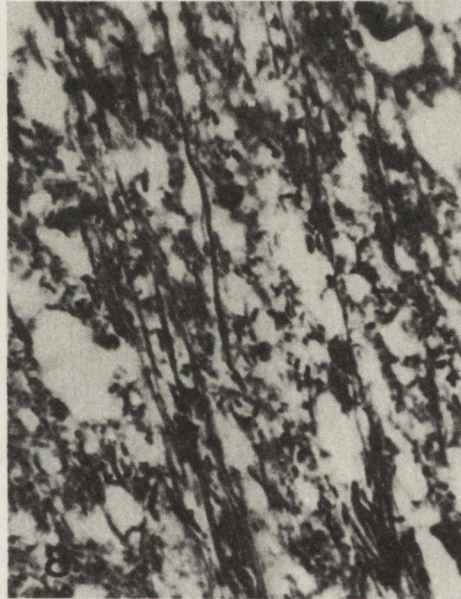
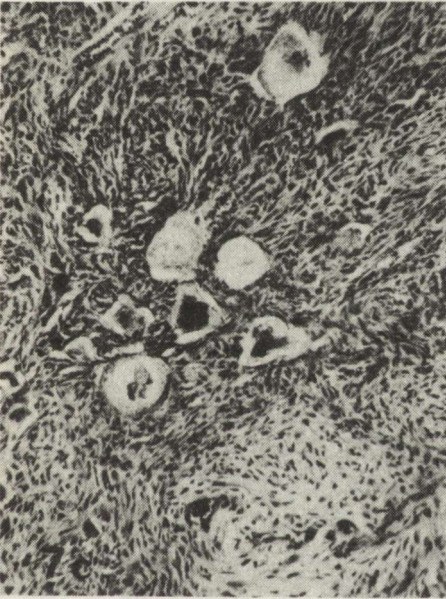
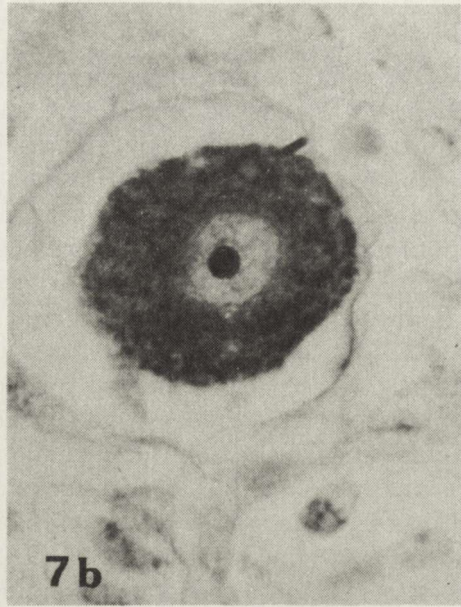
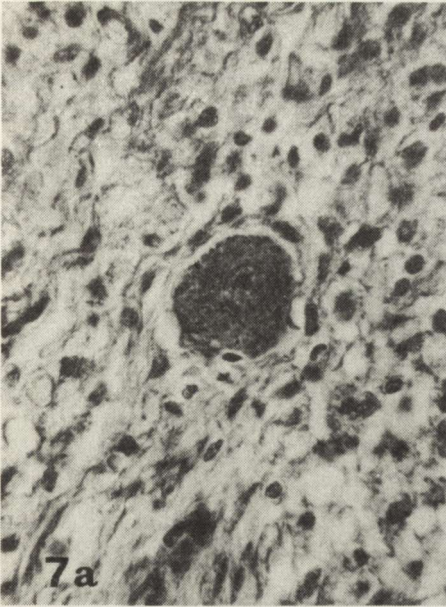


Fig. 7a. Typical, oval ganglion cell embedded in neoplastic tissue. H—E. $\times 400$

Ryc. 7a. Typowa, owalna komórka zwojowa w obrębie tkanki nowotworowej. H—E. Pow. $400 \times$

Fig. 7b. Ganglion cell presenting well-preserved organelles, especially plenty of tigroid. Cresyl violet. $\times 1200$

Ryc. 7b. Komórka zwojowa odznaczająca się obecnością dobrze zachowanych organelli komórkowych zwłaszcza dużej ilości tigroidu. Fiolet krezyłu. Pow. $1200 \times$

Fig. 7c. Group of degenerated ganglion cells partly devoid of tigroid. H—E. $\times 100$

Ryc. 7c. Grupa zwyrodniałych, częściowo pozbawionych tigroidu komórek zwojowych. H—E. Pow. $100 \times$

Fig. 8. Thin nerve fibers among ganglion cells. Bielschowsky, $\times 200$

Ryc. 8. Cienkie włókna nerwowe pomiędzy komórkami zwojowymi. Bielschowski. Pow. $200 \times$

DISCUSSION

The clinical course of the disease pointed to an unilateral cerebello-pontine tumor of the acoustic nerve. There was a lack of any clinical or post mortem evidence of Recklinghausen disease. The biopsy specimen was also that of neurinoma, Antony type A. Routine staining of necropsy material presented some diagnostic difficulties, which increased after obtaining serial sections confirming the presence of uncommon elements in the neoplastic neurinoma tissue, i.e. ganglion cells and collagen fibers.

Histological features such as type of the cells, tissue structure, peripheral nerve fibers and argyrophilic fibers commend for diagnosis of neurinoma. Against it are the abundant collagen fibers which since Penfield's time (Penfield 1932) are considered as the diagnostic sign of neurofibroma. In Zülch's and Christensen (1956) opinion the collagen fibers can proliferate from vascular walls and tumoral capsule into the stroma of the neurinoma. Another point of view concerns the staining ability of argyrophilic fibers as collagen fibers. According to Rubinstein (1972) the argyrophilic fibers of neurinoma possess sometimes this double staining property. In our understanding such a staining indicating collagen fibers greatly limits its value for diagnostic purpose.

The second unexpected component are numerous ganglion cells. Nerve cells in cerebello-pontine tumors are extremely rare and, to our knowledge, only a few such findings have been published. Gagel (1935) observed them in two cases of acoustic neurinoma, emphasizing the lack of immature and polynuclear neurons. Besides endorsing this observation, we have to stress the coexistence of degenerated and perfectly preserved ganglion cells. The normal healthy appearance of ganglion cells in the compact mass of extracerebral tumor is difficult to explain, but this feature is confirmed often in experimental anaplastic neurinomas of cranial nerves in rats (Mennel, Ivankovic 1975; Kroh 1985). The origin of ganglion cells in acoustic neurinomas is unknown. The lack of immature or binucleated neurons in our case and in Gagel's (1935) material indicates rather preexistent than active cells in neoplastic process. Gagel considered such neurons as split of cells in the acoustic nerve, though some of them were devoid of Nissl granules typical for the acoustic nucleus. The relation between the sympathetic nerve and the nerve cells along its trunk has been proved. The study on the development of the esophageal plexuses during foetal life in humans showed the migration of neuroblasts along the branches of the vagus nerve during embryonal and early foetal life (Woźniak et al. 1973). One can expect that a similar process of migration takes place along other cranial nerves and that the ganglion cells in cerebello-pontine tumors are remnants of these attached to the acoustic nerve. Tarlov 1937 observed ectopic ganglion cells in the central part of the trigeminal nerve in humans. In our case the distinct accumulation of ganglion cells at the periphery of the tumor near the nerve fibers can testify to this concept whereas the case of Zülch and

Christensen (1956) of the neurinoma of cauda equina containing an accumulation of "ganglioid" cells might be the effect of an ganglion engulfed by the tumor mass.

The concept that only the nerve fibers entrapped into the capsule are of diagnostic value of neurinoma has lately less and less supporters. The statement of Russel and Rubinstein (1977) represents a view that dispersed neurites in schwannoma are either regenerating or parent nerve fibers. Both in uni- and bilateral schwannomas neurites were found in the majority of cases in various relationship to the periphery of the tumor (Reid 1983). In a study of an block removed schwannomas on serial sections aggregates of nerve fibers dispersed from the capsule into the tumor substance were also found (Neely 1981). In our material nerve fibers were seen in the neoplastic mass at the periphery of the tumor. Segmented fibers in areas still containing variously preserved ganglion cells might represent in our opinion fibers of the parent nerve.

The authors are greatly indebted to Dr. I. Janota, Department of Neuropathology, Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, Denmark Hill, London, for valuable discussion.

NIETYPOWE ELEMENTY MORFOLOGICZNE W UTKANIU GUZA KĄTA MOSTOWO-MÓZDŻKOWEGO

Streszczenie

Przedstawiono przypadek guza kąta mostowo-mózdzkowego, który na podstawie przebiegu klinicznego oraz badania biopsyjnego rozpoznano jako nerwiak nerwu słuchowego typu Antony A. Badanie neuropatologiczne materiału autopsyjnego guza wykazało obecność nietypowych elementów morfologicznych, takich jak komórki zwojowe oraz włókna kolagenowe. Przedyskutowano pochodzenie dodatkowych elementów tkankowych w utkaniu nerwiaka.

АТИПИЧНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ СТРОЕНИЯ ОПУХОЛИ МОСТО-МОЗЖЕЧКОВОГО УГЛА

Резюме

Представлен случай опухоли мосто-мозжечкового угла, которая, на основании клинического течения и исследования биопсии была диагностирована как невринома слухового нерва типа Антони А. Патоморфологическое исследование секционного материала опухоли обнаружило нетипичные морфологические элементы в виде многочисленных ганглиозных клеток и коллагеновых волокон.

Обсуждается происхождение этих добавочных элементов в невриноме.

REFERENCES

1. Gagel O.: Tumoren der peripheren Nerven. In: Handbuch der Neurologie. Eds. O. Bumke, O. Foerster. Springer, Berlin, Heidelberg, 1935, pp. 216–240.
2. Kroh H.: Multifocal neoplasms of the nervous system induced with ethylnitrosourea in Wistar rats. *Neuropatol. Pol.*, 1985, 23, 389–410.

3. Mennel H., Ivankovic S. I.: Experimentelle Erzeugung von Tumoren des Nervensystem. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie. Ed. E. Grundmann, Springer, Berlin, Heidelberg, 1975, pp. 33–110.
4. Neely I. G.: Gross and microscopic anatomy of the eight cranial nerve in relationship to the solitary schwannoma. *Laryngoscope*, 1981, 91, 1512–1531.
5. Penfield W.: Tumors of the sheaths of the nervous system. *Arch. Neurol.*, 1932, 27, 1298–1309.
6. Reid H.: Neurites in bilateral schwannomas of the acoustic nerves. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1983, 9, 86.
7. Rubinstein L.: Tumors of the central nervous system. *Armed Forces Inst. Pathol. Washington*, 1972, pp. 205–213.
8. Russel D., Rubinstein L.: Pathology of tumors of the nervous system. Arnold E., Edinburgh, 1977, pp. 374–389.
9. Tarlov J. M.: Structure of the nerve root. 1. Nature of the junction between the central and the peripheral nervous system. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1937, 37, 555–583.
10. Woźniak W., Feliks M., Dudzińska B., Wawrzyniak S.: Intraneuronal plexuses of the esophagus during intrauterine development in man. *Ann. Med. Sect. Pol. Ac. Sci.*, 1973, 18, 191–199.
11. Zülch K. J., Christensen E.: Pathologische Anatomie der raumbeengenden intrakraniellen Prozesse. Springer, Berlin, Heidelberg, 1956, pp. 361–380.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

5 października 1988 r. Rada Państwa nadała tytuł naukowy profesora zwyczajnego prof. Jerzemu Wisławskiemu z Kliniki Neurochirurgii AM w Warszawie.

Dr nauk biolog. Andrzej Loesch z I-CMDiK PAN w Warszawie, uzyskał stopień naukowy doktora habilitowanego na podstawie pracy pt. Zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego oraz splotu Auerbacha jelita krętego szczura w doświadczalnej cukrzycy insulinozależnej.

Kolokwium habilitacyjne odbyło się 19 stycznia 1988 r., przed Radą Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Dr med. Maria Niewiadomska z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, uzyskała stopień naukowy doktora habilitowanego na podstawie pracy pt. Ocena stanu neuronu obwodowego u osób z zespołem uzależnienia od alkoholu — studium elektrofizjologiczne.

Kolokwium habilitacyjne odbyło się 10 października 1988 r., przed Radą Naukową Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Lek. Maria Binkiewicz z Zakładu Neuroradiologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, uzyskała stopień naukowy doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy pt. Badania radiologiczne w niewydolności krążenia mózgowego, angiografia i tomografia komputerowa.

Promotorem była doc. dr hab. med. Teresa Kryst. Obrona pracy odbyła się w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie 17 października 1988 r.

Lek. Wojciech Maksymowicz Kliniki Neurochirurgii AM w Warszawie, uzyskał stopień naukowy doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy pt. Leczenie nerwobólu nerwu trójdzielnego podaniem glicerydu do zbiornika trójdzielnego.

Promotorem był prof. dr hab. med. Jerzy Bidziński. Obrona odbyła się przed Radą I Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie 7 grudnia 1988 r.

Jerzy Dymecki

Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Myelin lipids in senile rat brain	555
Danuta Markiewicz, Ludwik Matuszkiewicz, Elżbieta Pawińska: Subacute sclerosing panencephalitis with diffuse cortical damage in a case with the head injury	561
Lech Iwanowski: Apoptosis and dark neurons	573
Ewa Matyja, Halina Kroh: Atypical morphological components in a tumor of the cerebello-pontine angle	581
Jerzy Dymecki: Chronicle and Information	589

СОДЕРЖАНИЕ

Эва Матыя, Эльжбета Кида: Динамика развития гиппокампа в органотипической культуре ткани	431
Барбара Гайковска, Роман Гадамски, Эльжбета Вавжиняк: Влияние кратковременной ишемии на ультраструктуру извилины гиппокампа у монгольских песчанок. Часть I. Ультраструктурная характеристика сектора CA ₁ Аммонова рога с особым учетом картины синаптических связей	555
Мечислав Вендер, Данута Ленарт-Янковска, Данута Прухник-Грабовска, Пётр Коваль: Зависимые от времени тенденции в появлении разных типов мозговых инсультов в секционном материале	477
Станислав Краевски, Эва Долинска, Янина Рафаловска: Кислый фибриллярный белок (GFAP) и гистоцитарные показатели в некоторых случаях инфаркта мозга человека	493
Эльжбета Кида, Эва Матыя, Леонид Хаспекон: Влияние хинолиновой кислоты на ультраструктуру гиппокампа <i>in vitro</i>	507
Марек Петжак: Влияние винкристина на гипоталамо-гипофизарную систему крысы в период постнатального развития	521
Ханна Вер, Ежи Вентель, Войтех Дзедзяк, Эльжбета Медыньска, Гражина Новицка: Морфологический анализ липопротеинов с очень низкой плотностью (VLDL) у людей зависящих от алкоголя	537
Изабела Кухна, Марек Кулерски, Иоанна Рут-Марчук: Невропатология синдрома Reye'a	547
Мечислав Вендер, Зофя Адамчевска-Гонджевич, Данута Тальковска, Ядвига Панкрац: Липиды миелина в мозгу старых крыс	555
Данута Маркевич, Людвик Матушкевич, Эльжбета Павиньска: Подострый склерозирующий паиэнцефалит (ПСПЭ) с диффузным повреждением коры в случае перенесенной черепно-мозговой травмы	561
Лех Ивановски: Темные нейроны и апоптозис	573
Эва Матыя, Халина Крох: Атипичные морфологические элементы строения опухоли мосто-мозжечкового угла	581
Ежи Дымецки: Отдел хроники и информации	589

SPIS TREŚCI

Ewa Matyja, Elżbieta Kida: Dynamika rozwoju hipokampa w warunkach organotypowej hodowli tkankowej	431
Barbara Gajkowska, Roman Gadamski, Elżbieta Wawrzyniak: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA ₁ rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych	455
Mieczysław Wender, Danuta Lenart-Jankowska, Danuta Pruchnik-Grabowska, Piotr Kowal: Trendy czasowe typów udarów mózgu w materiale autopsyjnym	477
Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: Kwaśne włóknkowe białko glejowe oraz znaczniki histiocytarne w wybranych przypadkach zawałów mózgu u człowieka	493
Elżbieta Kida, Ewa Matyja, Leonid Khaspekov: Wpływ kwasu chinolinowego na ultrastrukturę hipokampa <i>in vitro</i>	507
Marek Pietrzak: Wpływ winkrystyny na jądra neurosekrecyjne układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura w czasie rozwoju pozamacicznego	521
Hanna Wehr, Jerzy Węgiel, Wojciech Dziedziak, Elżbieta Medyńska, Grażyna Nowicka: Analiza morfometryczna lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) u ludzi uzależnionych od alkoholu	537
Izabela Kuchna, Marek Kulerski, Joanna Róg-Marczuk: Neuropatologia zespołu Reye'a	547
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Lipidy mieliny w starczym mózgu szczura	555
Danuta Markiewicz, Ludwik Matuszkiewicz, Elżbieta Pawińska: Podostre stwardniające zapalenie mózgu z rozlanym uszkodzeniem kory w przypadku z przebytych urazem czaszki	561
Lech Iwanowski: Ciemne neurony i apoptoza	573
Ewa Matyja, Halina Kroh: Nietypowe elementy morfologiczne w utkaniu guza kąta mostowo-mózdkowego	581
Jerzy Dymecki: Dział Kroniki i Informacji	589

CONTENTS

Ewa Matyja, Elżbieta Kida: Dynamics of rat hippocampus development in organotypic tissue culture. Light and electron-microscopic study	431
Barbara Gajkowska, Roman Gadamski, Elżbieta Wawrzyniak: Effect of short-term ischemia on ultrastructure of gyrus hippocampi. Part I. Ultrastructure of CA ₁ sector of Ammon's horn with special reference to the state of its synaptic contacts	455
Mieczysław Wender, Danuta Lenart-Jankowska, Danuta Pruchnik-Grabowska, Piotr Kowal: Different temporal trends in stroke types in the light of autoptic cases	477
Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: Glial fibrillary acidic protein and histiocytic markers in some cases of human brain infarct	493
Elżbieta Kida, Ewa Matyja, Leonid Khaspekov: The ultrastructure of rat hippocampal formation in organotypic tissue culture after exposure to quinolinic acid	507
Marek Pietrzak: Influence of vincristine on the neurosecretory nuclei of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the developing rat	521
Hanna Wehr, Jerzy Węgiel, Wojciech Dziedziak, Elżbieta Medyńska, Grażyna Nowicka: Morphometric analysis of very low density lipoproteins (VLDL) in chronic alcoholics	537
Izabela Kuchna, Marek Kulerski, Joanna Róg-Marczuk: Neuropathology of Reye's syndrome	547