

Okaz

~~0028-3894~~ 0022

PL ISSN 0028-3894



STOWARZYSZENIE
NEUROLOGÓW POLSKICH

NEUROLOGIA POLSKA

TOM 27

1989

ZESZYT 2

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

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 27

1989

ZESZYT 2

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓLPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Jochen 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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Maszynopis niniejszego nru przekazano Wydawcy 15.12.1988

Zakład Narodowy im. Ossolińskich – Wydawnictwo. Wrocław 1989.
Nakład: 595 egz. Objętość: ark. wyd. 10,20; ark. druk. 9,5; ark. A₁-25.
Papier offset. kl. III, 80 g, 70×100. Oddano do składania 1988.01.17.
Podpisano do druku 1989.07.17. Druk ukończono w sierpniu 1989.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 4041/89. F-4. Cena zł 260.–

JACEK LOSY

UKŁAD NERWOWY I IMMUNOLOGICZNY. WSPÓLNE STRUKTURY ANTYGENOWE

Katedra i Klinika Neurologii Akademii Medycznej, Poznań

Układ nerwowy i immunologiczny powiązane są siecią wzajemnych oddziaływań. Z jednej strony układ nerwowy poprzez hormony i neurotransmitery wywiera istotny wpływ na czynność komórek układu immunologicznego (Basedovsky i wsp. 1983), z drugiej strony sam pozostaje pod wpływem układu immunologicznego, co przejawia się stałą penetracją układu nerwowego przez niewielką ilość aktywowanych T limfocytów (Wekerle i wsp. 1986), a także zdolnością limfokin wydzielanych przez komórki układu immunologicznego, do wywierania wpływu na czynność komórek nerwowych (Farrar i wsp. 1987). Natura tych powiązań wydaje się być bardzo złożona.

Przedmiotem dużego zainteresowania oraz intensywnych badań w ostatnich latach, w kontekście powiązań układu nerwowego i immunologicznego, są wspólne struktury antygenowe tych układów.

Jednym z najlepiej poznanych antygenów wspólnych dla układu nerwowego i immunologicznego jest Thy-1. Thy-1 jest glikoproteiną, oryginalnie opisaną w mózgu i grasicy myszy (Reif, Allen 1964). Stwierdzenie jej występowania także na mysich limfocytach T, w przeciwieństwie do limfocytów B, posłużyło do rozróżnienia tych dwóch populacji limfocytów u myszy. U myszy Thy-1 występuje w dwóch postaciach allelicznych Thy-1.1 oraz Thy-1.2 różniących się tylko jednym aminokwasem. Thy-1 występuje u szczura tylko w postaci Thy-1.1 i obecny jest zarówno w mózgu (masa cząsteczkowa 17 500) oraz na tymocytach (masa cząsteczkowa 18 700). Różnice w wielkości molekuł wynikają z różnic w składzie części węglowodanowej tej glikoproteiny (Barclay i wsp. 1975). W ośrodkowym układzie nerwowym szczura Thy-1 występuje przede wszystkim w skupiskach neuronów, szeroko rozprzestrzeniając się od opuszki mózgowej po pień mózgu (Weber i wsp. 1987). Obecność Thy-1 wykazano także w układzie nerwowym obwodowym (Morris i wsp. 1983).

U człowieka Thy-1 opisano zarówno w mózgu (Dalchau, Fabre 1979) oraz w niewielkiej ilości na tymocytach (Arndt i wsp. 1978) i komórkach szpiku we wczesnych stadiach rozwoju limfocytów T i B (Ritter i wsp. 1983). Część białkowa Thy-1 składa się u człowieka i szczura ze 111 aminokwasów, a u myszy ze 112 aminokwasów. Przy, w zasadzie, stałej części białkowej

obserwuje się dużą zmienność części węglowodanowej molekule w zależności od rodzaju badanej tkanki, u tego samego gatunku, jak i w obrębie tej samej tkanki w zależności od stadium różnicowania (Carlsson, Stigbrand 1983). Sekwencja aminokwasów i dwa dwusiarczkowe mostki nadają molekule strukturę zbliżoną do pojedynczej immunoglobulinowej domeny (Williams, Gagnon 1982). Decyduje to o przynależności molekule do nadrodziny immunoglobulin obejmującej między innymi tak ważne struktury, jak antygeny zgodności tkankowej klasy I i II, antygeny T4 (CD4) i T8 (CD8) na limfocytach, N-CAM (neural cell adhesion molecule), receptory T limfocytów. Mimo wielu badań funkcja Thy-1 pozostaje niejasna. Biorąc pod uwagę powierzchniowe występowanie molekule oraz budowę zbliżoną do pojedynczej domeny immunoglobuliny, postuluje się jej rolę w interakcjach komórkowych np. między komórkami nerwowymi a glejowymi (Williams 1982). Thy-1 wykazuje wiele podobieństw do N-CAM, które obejmują zarówno przynależność obu molekule do nadrodziny immunoglobulin, zmienność części węglowodanowej w procesach różnicowania, jak i zdolność do własnej polimeryzacji, właściwość, która jak udowodniono w przypadku N-CAM umożliwia łączenie się komórek ze sobą (Crawford, Barton 1986). Rozważania o roli Thy-1 w reakcjach immunologicznych przeprowadzono między innymi na badaniach wykazujących, iż przeciwciała skierowane przeciwko Thy-1 wpływają na produkcję limfokin i ekspresję receptorów dla interleukiny 2 (Konaka *wsp.* 1981).

Do nadrodziny immunoglobulin należy także inna glikoproteina – MRC OX2. W odróżnieniu od Thy-1, MRC OX2 posiada 2 domeny, co nadaje jej strukturę zbliżoną do łańcucha lekkiego immunoglobuliny. MRC OX2 jest obecna na powierzchni neuronów (masa cząsteczkowa 41 000), tymocytów (masa cząsteczkowa 47 000), limfocytów B, a także endothelium i mięśniówki gładkiej (Webb, Barclay 1984). Antygenowość i skład aminokwasowy (248 aminokwasów) form pochodzących z tymocytów i mózgu są identyczne, a różnice w masach cząsteczkowych wynikają z różnic w zawartości części węglowodanowej molekule. Z uwagi na jej przynależność do nadrodziny immunoglobulin, rozważania co do funkcji, są podobne jak w przypadku Thy-1.

Leukosialina jest sialoglikoproteina występująca głównie na powierzchni ludzkich leukocytów (Carlsson, Fukuda 1986). Opisany poprzednio antygen W3/13 (Brown *i wsp.* 1981) na powierzchni tymocytów i T-limfocytów (marker T limfocytów u szczura), jest odpowiednikiem leukosialiny u szczura. Leukosialina posiada masę cząsteczkową 113 000 do 150 000, przy czym różnice w masach cząsteczkowych i tutaj, podobnie jak w przypadku Thy-1 i MRC OX2, wynikają z różnic w odniesieniu do części węglowodanowej molekule. Ta natomiast różni się w zależności od linii komórkowej leukocytów oraz stadium dojrzałości komórkowej (Carlsson *i wsp.* 1986; Fukuda *i wsp.* 1986). Badania immunohistochemiczne wskazały na obecność leukosialiny w ośrodkowym układzie nerwowym szczura (Losy *i wsp.* 1988). Immunoreaktywność leuko-

sialiny związana jest tutaj z włóknami nerwowymi i zakończeniami aksonów. Funkcja leukosialiny wymaga dalszych badań. Jedną z możliwości jest udział w interakcjach komórkowych. Wiadomo też, że leukosialina przypomina budową glikoforinę - główną, sialoglikoproteinę występującą na ludzkich erytrocytach, która może służyć jako receptor dla niektórych wirusów (Pauluson 1985). Czy leukosialina może służyć jako receptor dla wirusów w układzie nerwowym, na razie nie wiadomo.

Antygen T4 (CD4) jest kolejną glikoproteiną występującą zarówno w układzie immunologicznym, jak i nerwowym i tak jak Thy-1 oraz MRC OX2 należy do nadrodziny immunoglobulin, posiadając strukturę składającą się z czterech domen (Williams 1987). T4 jest obecny przede wszystkim na powierzchni limfocytów pomocniczych, różnicując je od innej subpopulacji-limfocytów cytotoksycznych i supresyjnych, charakteryzujących się powierzchniowym markerem T8 (CD8). To rozróżnienie nie jest absolutne, jako że niektóre T4⁺T limfocyty mają zdolność wywierania wpływu cytotoksycznego i supresyjnego (Thomas i wsp. 1981). T4⁺ limfocyty rozpoznają antygen tylko w połączeniu z antygenami układu zgodności tkankowej klasy II, podczas gdy T8⁺ limfocyty do rozpoznania antygeny wymagają antygenów zgodności tkankowej klasy I (Engleman i wsp. 1981).

Antygen T4 poza istotną rolę w interakcjach komórkowych, służy również jako receptor dla wirusa zespołu nabytej niewydolności immunologicznej (AIDS), łącząc się z osłonką glikoproteinową wirusa (Dalgleish i wsp. 1984). Obecność antygeny T4 wykazano ostatnio także w układzie nerwowym (Maddon i wsp. 1986). Ekspresję antygeny stwierdzono zarówno na komórkach nerwowych, jak i glejowych. W tym kontekście bardziej zrozumiałą jest fakt zarówno limfotropowego, jak i neurotropowego charakteru HIV (human immunodeficiency virus).

Do ciekawych odkryć w ostatnim czasie należy także wykazanie obecności determinant glikoproteiny związanej z mieliną (MAG) w układzie immunologicznym, a konkretnie na powierzchni limfocytów T i B (Peault i wsp. 1987).

Badania ostatnich lat dostarczyły dalszych przykładów wspólnych struktur antygenowych i zależności między układem nerwowym, neurohormonalnym i immunologicznym (Muranyi 1985; Weigent, Blalock 1987). Wykazano, że komórki układu immunologicznego mogą syntetyzować niektóre hormony i neuropeptydy oraz posiadają receptory dla nich (Pert i wsp. 1985). Przykładem może być ACTH syntetyzowany przez leukocyty pod wpływem infekcji wirusowej, identyczny, jak jego przysadkowego pochodzenia odpowiednik. ACTH oraz endorfiny poza leukocytami mogą być syntetyzowane przez makrofagi. Peptydy te posiadają zdolność istotnego wpływu na funkcje układu immunologicznego. ACTH wpływa hamująco na syntezę przeciwciał przez limfocyty B, zmniejsza też produkcję interferonu γ przez limfocyty T (Johnson i wsp. 1984). Peptydy opiatowe mogą natomiast wpływać modyfikująco na czynność limfocytów zwiększając proliferację cytotoksycznych limfocytów T, a także nasilając aktywność komórek NK. Hamują także chemotaksję mono-

cytów i leukocytów. Funkcje te pełnione są poprzez oddziaływanie na receptory opiatowe. Ich obecność, poza układem nerwowym, stwierdzono na monocytach, limfoblastach i limfocytach (Farrar i wsp. 1987a).

Układ immunologiczny syntetyzuje liczną grupę limfokin, wpływających immunomodulująco na czynność komórek tego układu. Przykładem może być interleukina 1 syntetyzowana między innymi przez makrofagi i aktywująca limfocyty T. Badania Fontany i wsp. (1982) oraz Giuliana i wsp. (1986) wykazały, że interleukina 1 może być również syntetyzowana przez astrocyty i komórki mikrogleju. Receptory dla interleukiny 1 wykazano zarówno na limfocytach T, jak i w układzie nerwowym (Farrar i wsp. 1987b). Funkcje interleukiny 1 w odniesieniu do układu nerwowego dotyczą jej wpływu na ośrodki termoregulacji (pirogen), jak również indukcji snu wolnofalowego i utraty łaknienia. Jak się wydaje, interleukina 1 może uczestniczyć w koordynacji czynności układu nerwowego i neurohormonalnego z reakcjami zapalnymi i immunologicznymi ustroju. Ostatnio wykazano w mózgu myszy obecność receptorów dla interleukiny 3 (Farrar i wsp. 1987a). Interleukina 3 wpływa na wzrost i różnicowanie multipotencjalnych komórek pnia. Obecność receptorów dla interleukiny 3 w układzie nerwowym sugeruje jej rolę w biologii tego układu.

Poza strukturami antygenowymi stale występującymi w układzie nerwowym, są również struktury indukowane tutaj pod wpływem reakcji immunologicznych, a wspólne dla omawianych układów. Do takich struktur należą antygeny układu zgodności tkankowej (MHC). Antygeny MHC klasy I zbudowane są z łańcucha ciężkiego (masa cząsteczkowa ok. 45 000) niekowalencyjnie połączonego z łańcuchem lekkim (masa cząsteczkowa ok. 12 000) β_2 mikroglobuliną. Łańcuch ciężki posiada 3 domeny i zakotwiczony jest w błonie komórkowej. Antygeny MHC klasy II zbudowane są z 2 łańcuchów: łańcucha α (masa cząsteczkowa ok. 33 000) i łańcucha β (masa cząsteczkowa ok. 28 000) połączonych niekowalencyjnie i posiadających dwie domeny. O ile antygeny MHC klasy I są szeroko reprezentowane w organizmie, o tyle antygeny MHC klasy II są obecne na powierzchni makrofagów, limfocytów B i aktywowanych limfocytów T. Antygeny MHC klasy I są w zasadzie nieobecne w normalnych warunkach na terenie układu nerwowego, lecz mogą być indukowane tutaj np. podczas neuroinfekcji wirusowej (Suzumura i wsp. 1986), czy też pod wpływem interferonu γ podawanego domózgowo (Wong i wsp. 1984). Antygeny MHC klasy II (Ia) mogą być indukowane na astrocytach również pod wpływem interferonu γ . Ich obecność wykazano na astrocytach w przewlekłej postaci EAE (Lassman i wsp. 1986), jak również na komórkach endothelium i astrocytach u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (Traugott i wsp. 1985). O roli MHC w procesach rozpoznawania antygeny przez limfocyty wspomniano wcześniej, indukcja więc ich w układzie nerwowym ma istotne znaczenie w patogenezie chorób układu nerwowego związanych z reakcjami zapalnymi i immunologicznymi.

NERVOUS AND IMMUNE SYSTEMS: SHARED ANTIGENIC STRUCTURES

Summary

Shared antigenic structures between the nervous and immune systems are described. Some of them like Thy-1 are known from many years, some, like leukosialin were recently found. Possible role of these molecules is discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Arndt R., Stark R., Klein P., Thiele H. G.: Serological and chromatographic analyses of antigenic structures detected in human brain, thymus and lymphnodes. *Immunology*, 1978, 35, 95–103.
2. Barclay A. N., Letarte-Muirhead M., Williams A. F.: Purification of the Thy-1 molecule from rat brain. *Biochem J*, 1975, 151, 699–706.
3. Basedovsky H. O., del Rey A. E., Sorkin E.: What do the immune system and the brain know about each other?: *Immunol Today*, 1983, 4, 342–346.
4. Brown W. R. A., Barclay A. N., Sunderland Ch. A., Williams A. F.: Identification of a glycophorin-like molecule at the cell surface of rat thymocytes. *Nature*, 1981, 289, 456–460.
5. Carlsson S. R., Stigbrand T. I.: Alternations in expression and glycosylation pattern of the Thy-1 glycoprotein during maturation and transformation of mouse T lymphocytes. *J Immunol*, 1983, 130, 1837–1842.
6. Carlsson S. R., Fukuda M. I.: Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem*, 1986, 261, 12779–12786.
7. Carlsson S. R., Sasaki H., Fukuda M. I.: Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid and T-lymphoid cell lines. *J Biol Chem*, 1986, 261, 12787–12791.
8. Crawford J. M., Barton R. W.: *Biology of Disease. Thy-1 Glycoprotein: structure, distribution and ontogeny.* *Lab Invest*, 1986, 54, 122–135.
9. Dalchau R., Fabre J. W.: Identification and unusual distribution of the canine and human homologues of Thy-1. *J Exp Med*, 1979, 149, 576–591.
10. Dalgleish A. G., Beverley P. C. L., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. A.: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 1984, 312, 763–766.
11. Engleman E. G., Benike C. J., Grumet C., Evans R. L.: Activation of human T lymphocyte subsets: helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. *J Immunol*, 1981, 127, 2124–2129.
12. Farrar W. L., Hill J. M., Bellan A. H., Vincour M.: The immune logical brain. *Immunol Rev*, 1987a, 100, 361–378.
13. Farrar W. L., Kilian P. L., Ruff M. R., Hill J. M., Pert C. B.: Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol*, 1987b, 139, 459–463.
14. Fontana A., Kristensen F., Dubs R., Gemsa D., Weber E.: Production of prostoglandin E and interleukin-1 factors by cultured astrocytes and C-6 glioma cells. *J Immunol*, 1982, 129, 2413–2419.
15. Fukuda M., Carlsson S. R., Klock J. C., Dell A.: Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells and acute myelogenous leukemic cells. *J Biol Chem*, 1986, 261, 12796–12806.
16. Giulian D., Baker T. J., Shih L. C., Lachman L. B.: Interleukin-1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med*, 1986, 164, 594–604.

17. Johnson H. M., Torres B. A., Smith E. M., Dion D., Blalock I. E.: Regulation of lymphokine (interferon) production by corticotrophin. *J Immunol*, 1984, 132, 246–250.
18. Konaka Y., Norcross M. A., Maino V. C., Smith R. T.: Anti Thy-1 mediated T cell activation. Role of soluble factors and expression of interleukin 2 receptors on T cells. *Eur J Immunol*, 1981, 11, 445–450.
19. Lassman H., Vass K., Brunner Ch., Seitelberger R.: Characterization of inflammatory infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis. W: *Progress in Neuropathology*. Red. H. M. Zimmermann. Raven Press, New York, 1986, vol. 6, 33–45.
20. Losy J., Machlen J., Olsson T., Kristensson K.: Distribution of leukosialin (W3/13)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Neurocytol*, 1988, (w druku).
21. Maddon P. J., Dagleish A. G., Mc Dougal J. S., Clapham P. R., Weiss R. A., Axel R.: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, 1986, 47, 333–348.
22. Morris R. J., Barber P. C., Beech J., Raisman G.: The distribution of Thy-1 antigen in the PNS of the adult rat. *J Neurocytol*, 1983, 12, 1017–1027.
23. Muranyi M.: Powiązania czynnościowe między układem neurohormonalnym a immunologicznym. *Neuropatol Pol*, 1985, 23, 1–21.
24. Paulson J. C.: Interactions of animal viruses with cell surface receptors. W: *The Receptors*. Red.: P. M. Conn Academic Press 1985, vol. 2, 131–219.
25. Peault B., Chen Ch., Cooper M. D., Barbu M., Lipiński M., Douarin N. M.: Phylogenetically conserved antigen on nerve cells and lymphocytes resembles myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 814–818.
26. Pert C. B., Ruff M. R., Weber R. J., Herkenham M.: Neuropeptides and their receptors: a psychosomatic network. *J Immunol*, 1985, 135, 820–826.
27. Reif A. E., Allen J. M.: The AKR thymi-antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med*, 1964, 120, 413–433.
28. Ritter M. A., Sauvage C. A., Delia D.: Human Thy-1 antigen: cell surface expression on early T and B lymphocytes. *Immunology*, 1983, 49, 555–564.
29. Suzumura A., Lavi E., Weiss S. R., Silberberg D. H.: Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes. *Science*, 1986, 232, 991–993.
30. Thomas Y., Rogozinski L., Irigoyen O., Friedman S. M., Kung P. C., Goldstein G., Chess L.: Functional analysis of human T cells subsets defined by monoclonal antibodies. *J Exp Med*, 1981, 154, 459–467.
31. Traugott U., Scheinberg L. C., Raine C. S.: On the presence of Ia-positive endothelial cells and astrocytes in multiple sclerosis lesions and its relevance to antigen presentation. *J Neuroimmunol*, 1985, 8, 1–14.
32. Webb M., Barclay N.: Lokalisation of the MRC OX2 glycoprotein on the surfaces of neurones. *J Neurochem*, 1984, 43, 1061–1067.
33. Weber R. J., Hill J. M., Pert C. B.: Regional distribution and density of Thy-1.1 in rat brain and its relation to subpopulations of neurons. *J Neuroimmunol*, 1987, 17, 137–145.
34. Weigent D. A., Blalock I. E.: Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. W: *Immunological Review*. Red.: E. G. Mölier, Munksgaard, Copenhagen, 1987, vol. 100, 79–108.
35. Wekerle H., Linington C., Lassman H., Meyermann R.: Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci*, 1986, 9, 271–277.
36. Williams A. F.: Surface molecules and cell interactions. *J Theor Biol*, 1982, 98, 221–234.
37. Williams A. F., Gagnon J.: Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science*, 1982, 216, 696–703.
38. Williams A. F.: A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today*, 1987, 8, 298–303.
39. Wong G. M., Barlett P. F., Clark-Lewis I., Battye F., Schrader J.: Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*, 1984, 310, 688–691.

Adres autora: Katedra i Klinika Neurologii A M, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

HANNA DRAC

ON THE SPECIFICITY OF FOCAL THICKENINGS OF MYELIN IN PERIPHERAL NERVES*

Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw, Neuromuscular Unit, Medical Research,
Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw

Focal thickening of myelin is a characteristic feature of hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP). The first description of the "sausage-like" swelling of the myelin sheath in a light and electron microscopical study of six nerve biopsies from patients with HNPP was given by Behse et al. (1972). Next Madrid and Bradley (1975) coined the term "tomaculous neuropathy" for such cases. A different type of swelling of myelin was found by Dayan et al. (1968) in the nerves of four patients suffering from chronic mixed (sensorymotor) neuropathy which the authors called "globular neuropathy". Some authors have mentioned sporadic incidence of focal thickenings of myelin in demyelinating and axonal neuropathy. The specificity of these thickenings is a matter of discussion.

It seemed interesting to check the frequency and type of focal myelin swelling in nerves taken from patients with various neuromuscular disorders and from apparently healthy subjects.

MATERIAL AND METHODS

The nerves taken from 320 subjects (age 5–65) with peripheral nerves system involvement and from 8 subjects (age 25–70) who died of amyotrophic lateral sclerosis were examined (Tab. 1.). The control group consisted of 5 subjects (age 6–42) who died without any symptoms of polyneuropathy (Tab. 2.). In each case a sural nerve taken from above the lateral malleolus was studied. In autoptic cases the nerves were removed 4–20 hrs after death.

The specimen was divided into 3 portions: for routine histological stainings, for thick cross epon sections and electron microscope study, and for teased fibers preparation. A part of specimen for routine histology was fixed in Baker's solution and then paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin,

* This work was supported by project NO 06.02.11.9.5.

Table 1. Material
Tabela 1. Materiał

Diagnosis Rozpoznanie	No of cases Liczba przypadków
Guillain-Barré syndrome Zespół Guillain-Barré	26
Polyneuropathy with features of vasculitis Polineuropatia z cechami zapalenia naczyń (vasculitis)	10
Toxic polyneuropathy Polineuropatia toksyczna	3
Polyneuropathy in connective tissue diseases Choroby tkanki łącznej z zajęciem nerwów obwodowych	10
Polyneuropathy of undetermined cause Polineuropatia o nieustalonej etiologii	116
Amyloid polyneuropathy Polineuropatia amyloidowa	2
Giant axonal polyneuropathy Polineuropatia z olbrzymimi aksonami	2
Hereditary sensory polyneuropathy Dziedziczna neuropatia czuciowa	3
Polyneuropathy of infancy Wrodzona neuropatia ruchowo-czuciowa	8
Hereditary motor-sensory neuropathy type I Dziedziczna ruchowo-czuciowa neuropatia typ I	49
Hereditary motor-sensory neuropathy type II Dziedziczna ruchowo-czuciowa neuropatia typ II	55
Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy Dziedziczna nadwrażliwość nerwów obwodowych na ucisk	5
CSN disorders with peripheral nerves involvement Choroby ośrodkowego układu nerwowego z zajęciem neuronu obwod.	25
Myotonic dystrophy Dystrofia miotoniczna	4
Spinal muscular atrophy of adults Rdzeniowy zanik mięśni dorosłych	2
Amyotrophic lateral sclerosis Stwardnienie zanikowe łoczne	8
Control cases Przypadki kontrole	5
	Total Razem 333

van Gieson method, toluidine blue, Congo red, methyl violet, Saturn and PAS. The second part of the specimen was fixed in 5% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Epon. Thick epon section (1–1,5 μ m) were cut with an LKB ultratome and stained with toluidine blue

Table 2. Control cases
Tabela 2. Przypadki kontrolne

Case Przypadek	Age (yrs) Wiek	Sex Płeć	Diagnosis or cause of death Rozpoznanie lub przyczyna zgonu
1. W.Z.	6	M	Infantile cerebral palsy Porażenie mózgowie dziecięce
2. P.J.	16	M	Road accident Uraz w wypadku ulicznym
3. Ł.E.	24	F	Cerebral aneurysm Tętniak mózgowy
4. Ł.Z.	29	M	Road accident Uraz w wypadku ulicznym
5. B.R.	42	M	Cerebral aneurysm Tętniak mózgu

(modified Pal-Kultschitzky method) or thionine and acridine orange. For histological measurements sections were photographed under the light microscope and magnified up to $\times 1000$. In some cases (Tab. 5 and 6) the density of myelinated fibers (m.f.) per 0.1 mm^2 fascicular area was calculated.

Thin epon sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEM 100 B electron microscope. The third part of the specimen was fixed in 5% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, washed in buffer and passed through glycerine in increasing concentrations (from 5–40%). Single fibers (30–250) were isolated then without preselection from each available fascicle (as a routine we assess 30 fibers consisting of at least 4 internodes). For details on methodology see Jędrzejowska et al. (1972). The percentage of demyelinating or remyelinating fibers as well as fibers with axonal degeneration was estimated on the base on single fibers, and so was number of normal, demyelinating, remyelinating segments and of myelin thickenings derived from teased fibers.

The demyelinating process was recognized if among teased fibers there were normal, demyelinating and remyelinating fibers. Axonal degeneration of nerve was considered if on thick cross epon section loss of myelinated fibers was visible and degenerating and regenerating fibers among teased fibers were encountered. A mixed lesion of nerve was assumed if loss of fibers, remyelinating fibers, groups of thin regenerating fibers on thick cross epon section were visible, which corresponded to the presence of demyelinating, remyelinating, regenerated and undergoing axonal degeneration fibers among teased fibers.

RESULTS

Basing on teased fibers and thick cross epon sections in 113 cases demyelinating lesion, in 105 cases axonal lesion and in 110 cases mixed lesion of nerve was recognized (Tab. 3). Focal thickenings of myelin in 13 cases

Table 3. Morphological changes in the nerves
Tabela 3. Typ morfologicznych zmian w nerwie

Morphological changes Zmiany morfologiczne	No of cases Liczba przypadków
Demyelination and/or remyelination Demielinizacja i/lub remielinizacja	113
Axonal degeneration Zwyrodnienie aksonalne	105
Mixed changes Zmiany mieszane	110

Table 4. Cases with focal thickenings of myelin in sural nerve
Tabela 4. Przypadki z odcinkowymi zgrubieniami mieliny we włóknach nerwu łydkowego

Case Przypadek	Age (yrs) Wiek (lata)	Sex Płeć	Diagnosis Rozpoznanie
1. Ł.E.	24	F	Cerebral aneurysm (control case) Tętniak mózgu (przypadek kontrolny)
2. Sz.M.	39	F	Amyotrophic lateral sclerosis Stwardnienie zanikowe boczne
3. S.E.	52	F	Distal spinal muscular atrophy Rdzeniowy zanik mięśni, postać odsiebna
4. T.A.	31	M	Polyneuropathy of obscure nature Polineuropatia o niejasnej etiologii
5. S.W.	29	M	Toxic polyneuropathy? Polineuropatia toksyczna?
6. P.A.	7	F	Hereditary motor-sensory neuropathy type I Dziedziczna ruchowo-czuciowa neuropatia typu I
7. Ż.A.	16	F	Hereditary motor-sensory neuropathy type I Dziedziczna ruchowo-czuciowa neuropatia typu I
8. T.W.	23	M	Hereditary motor-sensory neuropathy type I Dziedziczna ruchowo-czuciowa neuropatia typu I
9. P.Sz.	20	M	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy? Dziedziczna nadwrażliwość nerwów na ucisk?
10. Z.P.	17	M	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy Dziedziczna nadwrażliwość nerwów na ucisk
11. P.T.	25	M	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy Dziedziczna nadwrażliwość nerwów na ucisk
12. M.A.	32	M	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy Dziedziczna nadwrażliwość nerwów na ucisk
13. W.F.	45	M	Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy Dziedziczna nadwrażliwość nerwów na ucisk

(including 1 control case) were found (Tab. 4.). Out of these 13 cases in nine a demyelinating lesion, in 3 mixed type of lesion, in one case axonal type of lesion in the sural nerve were observed (Tab. 5.). The corresponding data for the control group are presented in Table 6.

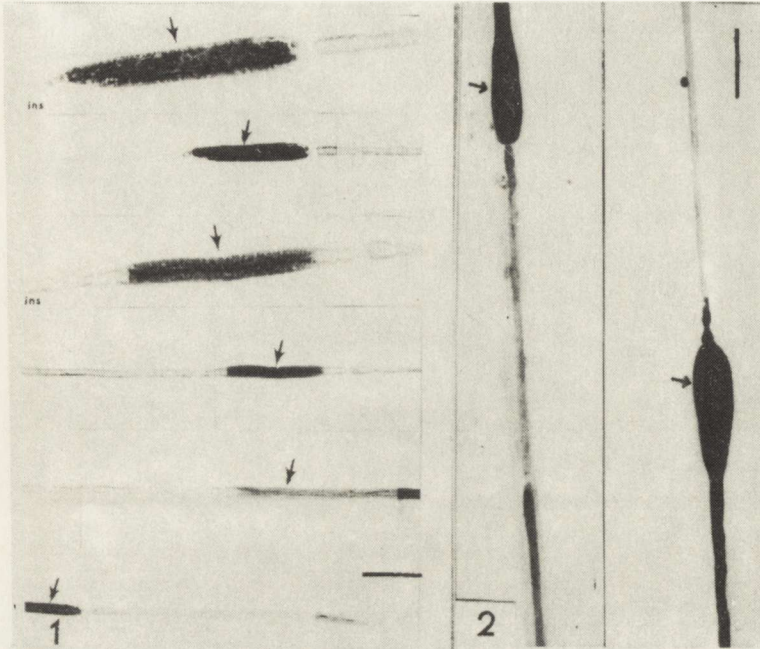


Fig. 1 and Fig. 2. Collection of focal swellings of myelin (arrows) localized at paranodal and internodal position. Teased fibers. Bar 50 μ m

Ryc. 1 i ryc. 2. Ogniskowe zgrubienia mieliny (strzałki) zlokalizowane około i wewnątrz przewężenia. Włókna czesane. Kreska 50 μ m

The number of focal thickenings of myelin per 100 internodes in mixed and axonal lesions of nerve was less than 1, it was much greater (up to 23) in the demyelinating type of lesion (Tab. 5.). Excluding mixed type of lesion of nerve, focal thickenings of myelin were present in normal, demyelinated and remyelinating fibers. In demyelinated and remyelinating fibers focal swellings were much more frequent than in normal fibers. Focal thickenings of myelin were located in the paranodal (Tab. 8.) and internodal (Tab. 8; Figs. 1, 2) region. Swellings of myelin varied in length and width (Figs 1, 2), however, swellings never occupied a whole internode. Some thickenings were well demarkated, others tapered down to normal myelin thickness (Figs 3, 4, 1). Myelin sheath disintegration was visible sometimes within swellings (Figs 5, 6). In some cases (Tab. 7.) bulb-shaped paranodal thickenings involving the axon as well as myelin sheath were visible (Figs 7, 8). They differed from physiological swelling of the proximal end of internode. On thick cross epon section the number of markedly enlarged myelinated fibers varied (Figs 9, 10). Some axons looked

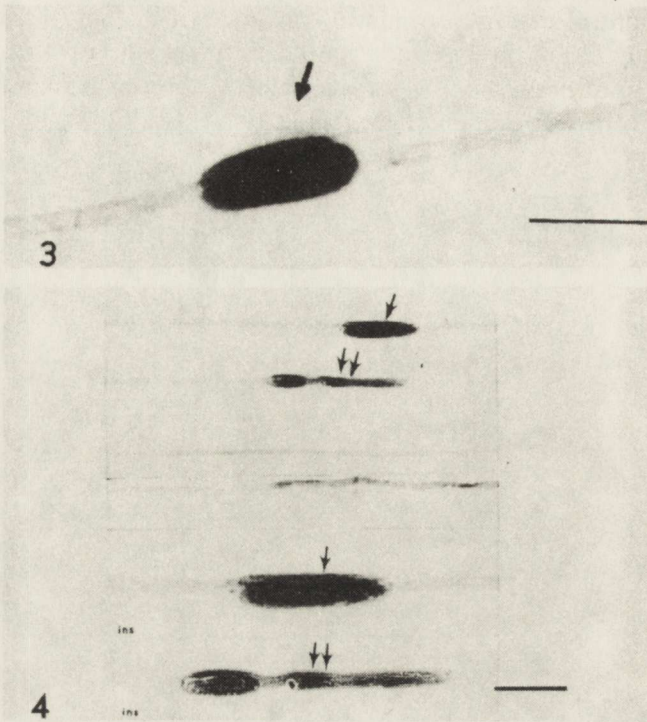


Fig. 3 and Fig. 4. Well demarkated swellings (arrows) and other taper down to normal myelin thickness (double arrows) in teased fibers. Bar 50 μm

Ryc. 3 i ryc. 4. Dobrze odgraniczone zgrubienia (strzałki) i zgrubienia zwężające się do właściwej dla międzywęźla grubości mieliny (podwójne strzałki). Włókna czesane. Kreska 50 μm

constricted and had a very thick myelin sheath (Fig. 10). Myelin sheaths with very many redundant loops were visible (Fig. 11).

Preliminary study of thickened fibers under the electron microscope was done in cases nr 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13. Many of the myelin sheaths showed grossly redundant loops varying from simple outpouching (Fig. 12) to various degrees of complex foldings (Figs 13, 14, 15). In the group of demyelinating type of lesion in the nerve cases nr 6 and 7 exhibited distinct morphological similarity and differed morphologically from cases nr 9, 10, 11, 12 and 13. In the former cases the loss of myelinated fibers was much pronounced. On the thick cross epon sections numerous onion-bulbs structures and remyelinating fibers with different arrangement of redundant myelin loops were visible, thickened fibers were not numerous (Fig. 16). Single, isolated fibers were very thin and pale exhibiting extensive segmental demyelination (Fig. 17) which made impossible to count the internodes. In these cases under the electron microscope various abnormalities of arrangement of myelin loops were visible (Figs 12, 13, 14, 15, 18). In the remaining cases (i.e. nos 9, 10, 11, 12, 13) a loss of myelinated fibers was rather small, onion-bulb formations rare. Teased fibers

Table 5. Morphological data in cases with focal thickenings of myelin in nerve fibers
Tabela 5. Dane morfologiczne w przypadkach ze zgrubieniem mieliny we włóknach nerwowych

Case	Density of mf/0.1 mm ²	No of isolat. fibers	Fibers with demiel. and/or remiel.	Fibers with axonal degener. and/or regener.	Morphol. changes in nerve	Fibers with thickening of myelin	No of thickenings per 100 internodes
Przypadek	Gęstość włókien miel. w 0.1mm ²	Liczba izol. włókien	Włókna z odciwkową demiel. i/lub remielin %	Włókna ze zwyrodnieniem aksonalnym i/lub regenerujące %	Typ morfol. uszkodzenia nerwu	Włókna ze zgrubieniem mieliny %	Liczba zgrubień przypadająca na 100 międzywęzli
1. L.E.	848	100	2.0 (2)*	2.0 (2)	mixed mieszany	2.0 (2)	0.4
2. Sz.H.	711	250	4.0 (10)	2.0 (5)	mixed mieszany	0.8 (2)	0.1
3. S.E.	764	100	13.0 (13)	1.0 (1)	mixed mieszany	1.0 (1)	0.2
4. T.A.	808	44	13.5 (6)	0.0 (0)	demyel. demiel.	9.1 (4)	1.2
5. S.W.	400	36	2.8 (1)	47.2 (17)	axonal aksonalny	2.8 (1)	0.7
6. P.A.	500	35	100.0 (35)	0.0 (0)	demyel. demiel.	100.0 (35)	? ** thickening of myelin numerous ** zgrubienia mieliny bardzo liczne
7. Ż.A.	350	64	93.8 (60)	0.0 (0)	demyel. demiel.	50.0 (32)	? ** as above ** jak wyżej
8. T.W.	700	100	20.0 (20)	2.2 (2)	demyel. demiel.	10.0 (10)	5.6
9. P.Sz.	790	100	12.0 (12)	2.0 (2)	demyel. demiel.	10.0 (10)	4.4
10. Z.P.	675	60	50.0 (30)	0.0 (0)	demyel. demiel.	66.5 (40)	33.4
11. P.T.	660	100	32.0 (32)	2.0 (2)	demyel. demiel.	45.0 (45)	15.0
12. M.A.	650	100	40.0 (40)	3.0 (3)	demyel. demiel.	50.0 (50)	30.0
13. W.F.	632	100	86.0 (86)	2.0 (2)	demyel. demiel.	66.6 (66)	31.0

* absolute number of fibers with morphological changes obtained from teased fibers
bezwzględna liczba włókien ze zmianami morfologicznymi obliczona z włókien czesanych

** extensive demyelination unabling to count internodes
rozległa demielinizacja uniemożliwiająca policzenie międzywęzli

Table 6. Control cases: density of myelinated fibers, morphological changes in teased fibers
 Tabela 6. Przypadki kontrolne: gęstość włókien mielinowych, zmiany morfologiczne we włóknach czesanych

Case	Age (yrs)	Sex	Density of mf/0.1 mm ²	No of isolated fibers	% of fibers with demyel. and/or remyel.	% of fibers with axonal degeneration and/or regenerating
Przypadek	Wiek (lata)	Płeć	Gęstość włókien mielin. w 0,1 mm ²	Liczba izolowanych włókien	% włókien z odcinkową demiel. i/lub remiel.	% włókien ze zwyrod. aksonalnym i/lub regenerujących
1. W.Z.	6	M	1285	150	0.0	0.0
2. P.J.	17	M	694	150	3.3	1.4
3. Ł.E.	24	F	848	100	2.2	2.0
4. Ł.Z.	29	M	686	150	5.0	2.1
5. B.R.	42	M	844	200	2.0	3.0

Table 7. Data on internodes, number and localization of thickenings of myelin
 Tabela 7. Dane dotyczące międzywęźli, liczby i lokalizacji zgrubień mieliny

Case Przypadek	Morphological changes in nerve Rodzaj morfolog. uszkodzenia nerwu	No of isolated fibers Liczba izolowanych włókien	No of internodes Liczba międzywęźli		No of thickenings in the fibers Liczba zgrubień we włóknach		Localization of thickenings Lokalizacja zgrubień	
			Normal Prawidłowy	Demyelin. and/or remyelin. Demielin. i/lub remielin.	Normal Prawidłowy	Demyelin. and/or remyelin. Demielin. i/lub remielin.	Paranodal Przy przewężeniu	Intranodal W między- węźlu
1. L.E.	mixed — mieszane	100	483	3	—	2	—	2
2. Sz.H.	mixed — mieszane	250	990	10	—	3	2*	1
3. S.E.	mixed — mieszane	100	430	30	—	1	—	1
4. T.A.	demyel. — demiel.	44	253	25	2*	1	3*	1
5. S.W.	axonal — aksonalny	36	278	2	2*	—	2*	—
6. P.A.	demyel. — demiel.	35	—	?	—**	485		485
7. Ż.A.	demyel. — demiel.	64	275	95+?		358		358
8. T.W.	demyel. — demiel.	100	550	50	—	30	25	5
9. P.Sz.	demyel. — demiel.	100	415	35	5	15	11	9
10. Z.P.	demyel. — demiel.	60	280	80	40	80	70	50
11. P.T.	demyel. — demiel.	100	560	120	35	65	43 + 2*	55
12. M.A.	demyel. — demiel.	100	370	130	52	98	78	72
13. W.F.	demyel. — demiel.	100	420	160	70	110	88	92

* - thickening of myelin and axon
 zgrubienie mieliny i aksonu

** - normal fibers not found
 nie znaleziono prawidłowych włókien

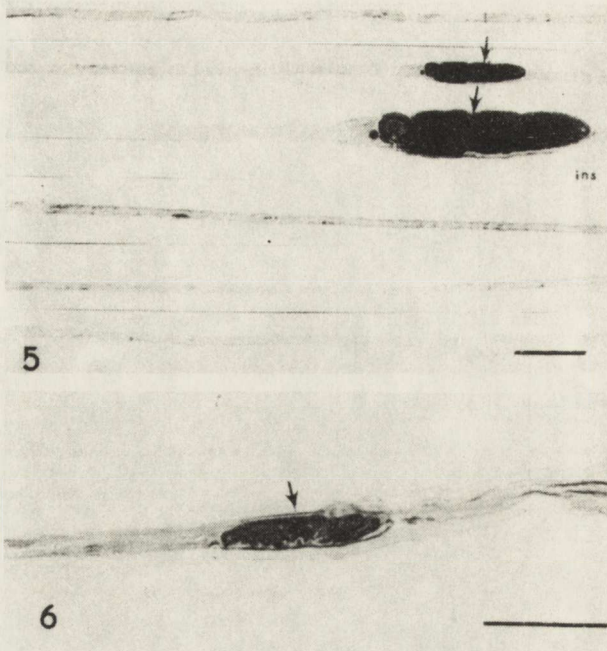


Fig. 5 and Fig. 6. Myelin sheath disintegration (arrows) in teased fibers. Bar 50 μ m
Ryc. 5 i ryc. 6. Rozpad osłonki mielinowej w obrębie zgrubień (strzałki) we włóknach czesanych.
Kreska 50 μ m

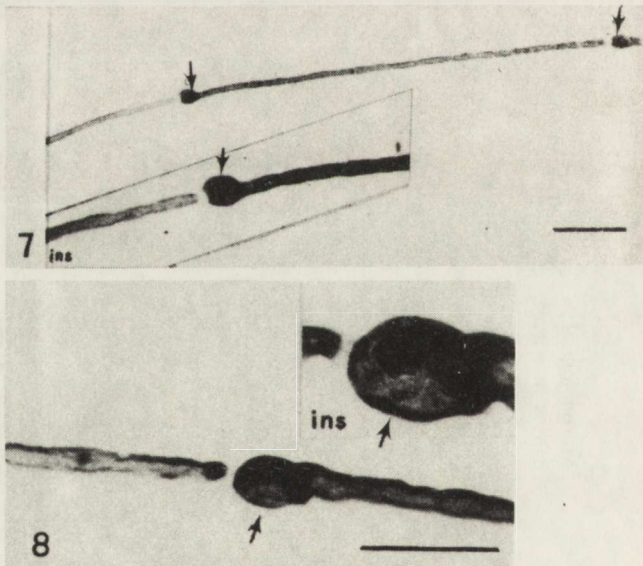


Fig. 7 and Fig. 8. Bulb-shaped paranodal thickenings (arrows) involving axon and myelin sheath.
Teased fibers. Bar 50 μ m
Ryc. 7 i ryc. 8. Kolbowate zgrubienia okołoprzewężeniowe (strzałki) obejmujące akson i osłonkę mielinową. Włókna czesane. Kreska 50 μ m

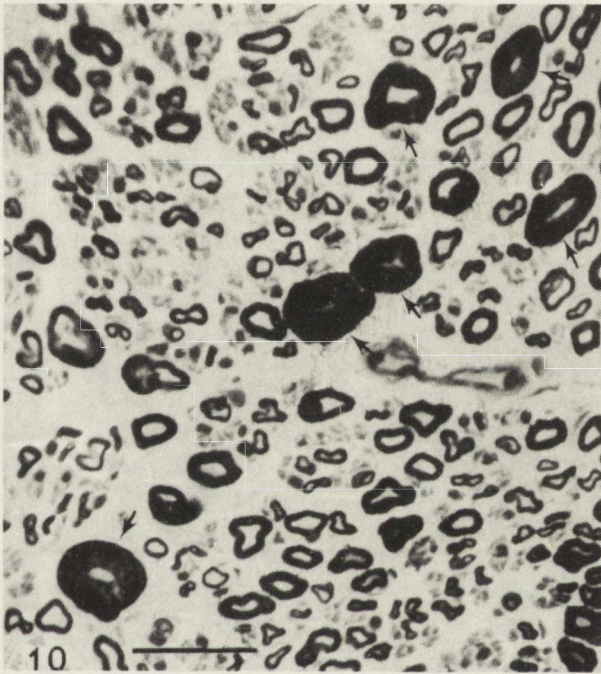
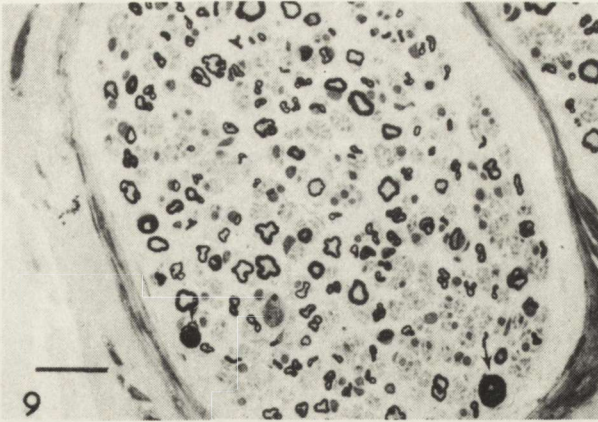


Fig. 9 and Fig. 10. Enlarged myelinated fibers with thick myelin sheath and constricted axon (arrows). Thick cross epon sections. Bar 50 μ m

Ryc. 9 i ryc. 10. Włókna ze znacznie pogrubiałą osłonką mielinową i uciśniętym aksonem (strzałki). Poprzeczny przekrój eponowy. Kreska 50 μ m

revealed a moderate degree of segmental demyelination. Focal swellings of myelin were longer and thicker than in the former group (Figs 1, 2, 3). Under the electron microscope banded appearance of myelin sheaths prevailed among the abnormalities of myelin sheaths (Fig. 19).

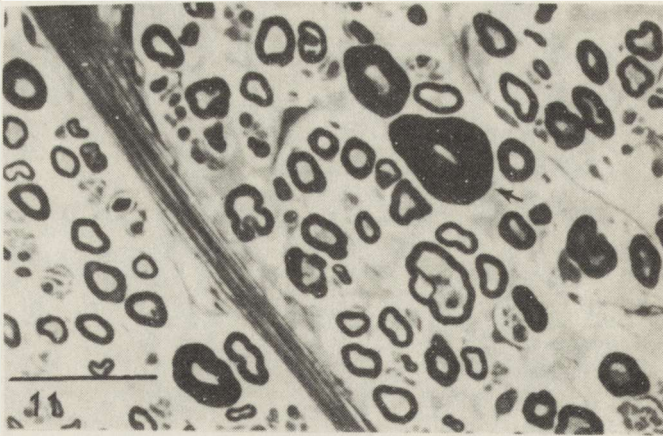


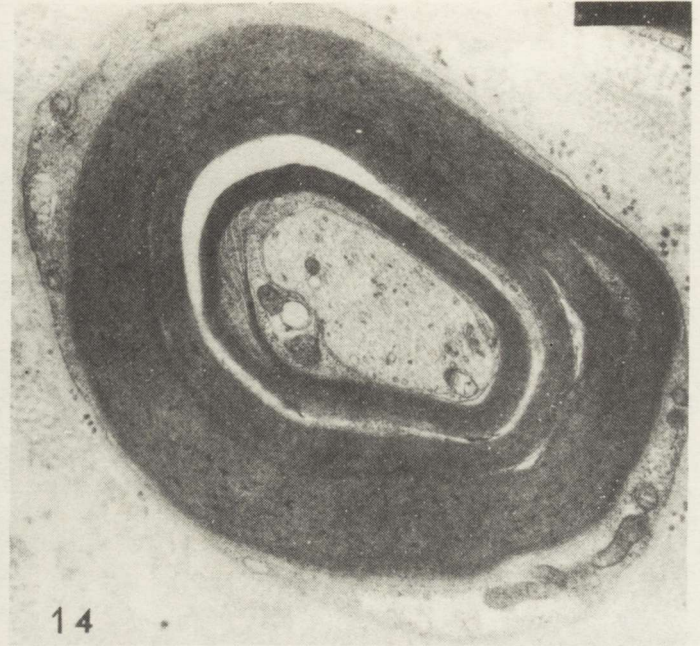
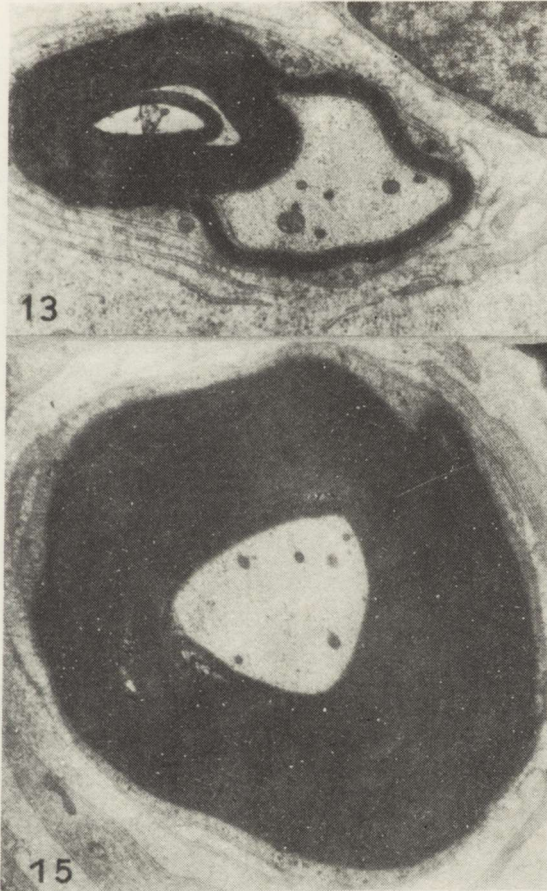
Fig. 11. Myelin sheath with many redundant loops of myelin (arrow). Thick cross epon section. Bar 50 μm

Ryc. 11. Osłonka mielinowa z nadmierną liczbą pętli mieliny (strzałka). Poprzeczny przekrój eponowy. Kreska 50 μm



Fig. 12. Electron micrograph of fiber with outpouching of myelin loops (arrow). $\times 18000$

Ryc. 12. Włókno z „wybrzuszeniem” pętli mieliny (strzałka). Elektronogram. Pow. 18000 \times



Figs 13, 14 and 15. Electron micrographs of fibers exhibiting complex foldings of myelin loops. $\times 12000$, 18000 and 12000
Ryc. 13, 14 i 15. Elektronogramy włókien ze złożonymi zagięciami pętli mieliny. Pow. 12000 , 18000 i $12000 \times$

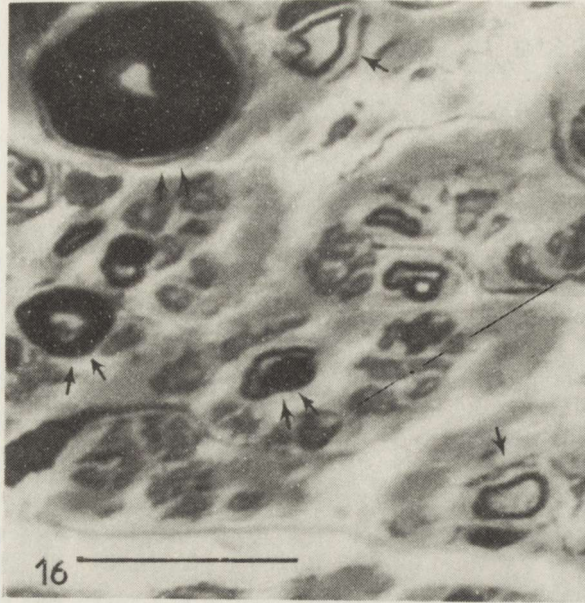


Fig. 16. Onion-bulb structures (arrow) and fibers with different arrangement of redundant myelin loops (double arrows). Thick cross epon section. Bar 100 μm
Ryc. 16. Struktury cebulopodobne (strzałka) i włókna z różnym układem dodatkowych pętli mieliny (podwójne strzałki). Poprzeczny przekrój eponowy. Kreska 100 μm

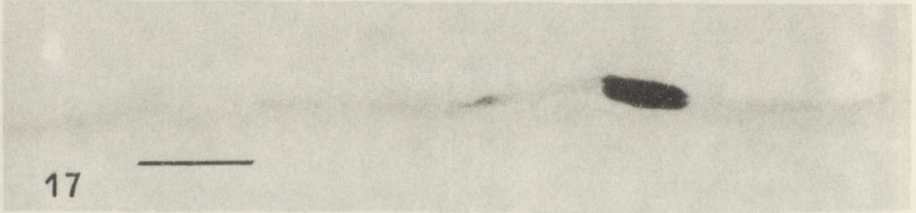


Fig. 17. Teased fiber exhibiting extensive segmental demyelination. Bar 50 μm
Ryc. 17. Włókno czesane z rozległą odcinkową demielinizacją. Kreska 50 μm



Fig. 18. Electron micrograph of fiber with abnormality of arrangement of myelin loops. $\times 18\,000$
Ryc. 18. Elektronogram włókna z nieprawidłowym układem pętli mieliny. Pow. $18\,000 \times$



Fig. 19. Electron micrograph of fiber with banded appearance of myelin sheath. $\times 4\,800$
Ryc. 19. Elektronogram włókna z pasmowatym układem warstw mieliny. Pow. $4\,800 \times$

DISCUSSION

In the presented material focal thickenings of myelin in the sural nerve were not very frequent (13 out of 333 examined cases, i. e. about 4% of nerves). They were most frequent in demyelinating lesions (about 8% of nerves with this type of damage) and in mixed type lesion of nerves (about 3%). Independently of the type of the nerve lesion focal thickenings of myelin were present in remyelinating or demyelinating and very rarely in normal fibers. In mixed type of the nerve they involved about 2% of fibers and the number of thickenings per 100 internodes was less than 1. In the demyelinating type of lesion the percentage of fibers with focal thickenings of myelin varied from 9 to 100 and the number of thickenings per 100 internodes exceeded 30.

In all types of lesion of the nerves bulb-shape swellings at the end of internode were visible (Lubińska, Łukaszewska 1956). They were localized at the vicinity or within intercalated internodes which are the result of remyelination (Lubińska 1958). This might suggest accumulation of different organelles at the sites closely connected with remodelling of new Ranvier nodes. The nodal processes of Schwann cells may provide a pathway for metabolic exchanges between the mitochondrion-rich paranodal Schwann cell cytoplasm and the nodal axon, which is relatively poorly supplied with mitochondria (London, Williams 1963; Williams, London 1964). The Schwann cell might thus provide the energy supplies for the axolemmal ionic pump.

Segmental remyelination in normal fiber is in some approximation relevant to remyelination of nerve fiber during development. Physiologic characteristic of adult fiber is among others the ability to transmit impulses at high frequencies which coincides with accumulation of paranodal Schwann cell mitochondria.

There were no differences in localization of thickenings of myelin with regard to the type of lesion in the nerve. Analysis of material points to the unspecificity of thickenings as they were found occasionally in subjects deceased from cerebral aneurysm (case 1) amyotrophic lateral sclerosis (case 2) and in subject suffering from distal spinal atrophy of adults (case 3) and acute axonal probably toxic neuropathy (case 5). It seems that thickenings of myelin should be rather connected with the type of pathological process in the fiber (demyelination/ remyelination).

It is evident from the studies (Webster, Spiro 1960) that the myelin sheath is not a regular tube surrounding the axon. Normal myelin outpouchings and foldings of myelin are found and these irregularities are the earliest changes in diphtheric neuropathy (Webster et al. 1961). Thickenings of myelin in the presented material differed from physiological irregularities of myelin in width and length (Webster 1971, 1975). As they were mainly found in acquired and inherited demyelinating disorders it might suggest a relation with failure of myelination. Aberrant myelination was observed experimentally (Dyck 1969; King et al. 1975) as well as in biopsy material taken from cases with peripheral nerve disorders (personal observation).

In this material there are two groups of disorders exhibiting especially a striking abnormality of myelin. To the first group corresponding to hereditary motor sensory neuropathy (HMSN) type I (Harding, Thomas 1980) belong cases nos 6, 7, 8. On the other hand cases nos 9, 10, 11, 12, 13 fulfil criteria of hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP) (Behse et al. 1972; Madrid, Bradley 1975; Meier, Fall 1982). Morphological changes in cases of HMSN were similar to those described by Dayan et al. (1968) in globular neuropathy. Numerous redundant loops of myelin were seen under the electron microscope in these cases (nos 7, 8). Formation of redundant loops myelin is a relatively common phenomenon during myelinogenesis in a man and in animals (Meier, Bischoff 1975; Webster 1971, 1975). Remodelling of myelin sheath takes place with maturation of nerve fiber and myelin sheath becomes adjusted to the axonal size. Thickenings of myelin in HNPP differed from those in HMSN in size and their presence not only within demyelinated or remyelinating, but also within normal internodes. Morphologically HMSN type I and HNPP are demyelinating disorders due to failure of the Schwann cell or/and of the axon. Thus, focal thickenings of myelin might be a result of an abnormal relation between axon and Schwann cell: sending of false signals by axon with involvement of feedback mechanism for adjustment of the myelin sheath to axonal size? Eventually disorder in the Schwann cell might have been expressed by formation of an excess of myelin of little value which wraps around the axon and partly undergoes breakdown which is observed under the electron microscope especially in cases of HMSN. Observation of similarities and differences of formation of focal thickenings of myelin in various disorders need examination of serial sections under the electron microscope.

CONCLUSIONS

1. Focal thickenings of myelin are relatively rare in nerve fibers.
2. Focal thickenings are present mainly in demyelinating disorders of nerves but also in mixed and axonal type processes.
3. Focal thickenings are not specific, but are most frequently observed in HNPP and in some cases of HMSN type I.
4. The presence of thickenings of myelin first of all within demyelinated and remyelinating fibers might point to an abnormality of myelination due to inherited or acquired failure of the Schwann cell as well as of the Schwann cell and/or axon.

SWOISTOŚĆ OGNISKOWYCH ZGRUBIEŃ MIELINY W NERWACH OBWODOWYCH

Streszczenie

Ocenie poddano 333 wycinki nerwów, pobranych od osób z chorobami nerwowo-mięśniowymi i od osób bez klinicznego uszkodzenia neuronu obwodowego. Na podstawie analizy włókien czesanych i poprzecznych skrawków eponowych w 113 przypadkach rozpoznano

uszkodzenie demielinizacyjne nerwu, w 105 przypadkach uszkodzenie aksonalne nerwu i w 110 przypadkach uszkodzenie mieszane nerwu. Odcinkowe zgrubienie mieliny stwierdzono w 13 przypadkach (ok. 4% badanych nerwów), w tym przede wszystkim w uszkodzeniu demielinizacyjnym nerwu (9 przypadków na 13). Niezależnie od typu podstawowego uszkodzenia nerwu zgrubienia występowały zwykle we włóknach remielinizujących lub zdemielinizowanych (wokół i w obrębie przewężenia). W badaniu mikroskopowo-elektronowym zgrubienia składały się z nadmiernej liczby pętli mieliny ułożonych nieprawidłowo. Zgrubienia mieliny były nieswoiste, ale szczególnie często obserwowano je w dziedzicznej nadwrażliwości na ucisk i w dziedzicznej ruchowo-czuciowej neuropatii typu I. Występowanie zgrubień mieliny, głównie we włóknach zdemielinizowanych i remielinizujących, wskazywało by na zaburzenie procesu mielinizacji w wyniku nabytego lub genetycznie uwarunkowanego uszkodzenia komórki Schwanna oraz komórki Schwanna i/lub aksonu.

REFERENCES

1. Behse F., Buchthal F., Carlsen F., Knappeis G. G.: Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Electrophysiological aspects. *Brain*, 1972, 95, 777–794.
2. Dayan A. D., Graveson G. S., Robinson P. K., Woodhouse M. A.: Globular neuropathy. A disorder of axons and Schwann cells. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968, 31, 552–560.
3. Dyck P. J.: Experimental hypertrophic neuropathy. *Arch Neurol* 1969, 21, 73–95.
4. Harding A. E., Thomas P. K.: The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*, 1980, 103, 259–285.
5. Jędrzejowska H., Sawicka E., Drac H., Glinka Z.: Metody badania histopatologicznego nerwów obwodowych. *Neuropatol Pol*, 1972, 10, 87–98.
6. King R. H. M., Pollard J. D., Thomas P. K.: Aberrant remyelination in chronic relapsing experimental allergic neurotosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1975, 1, 367–378.
7. Landon D. N., Williams P. L.: The ultrastructure of the node of Ranvier. *Nature*, 1963, 199, 575–580.
8. Lubińska L., Łukaszewska Z.: Shape of myelinated nerve fibers and proximo-distal flow of axoplasm. *Acta Biol Exp (Warsz)* 1956, 17, 115–125.
9. Lubińska L.: "Intercalated" internodes in nerve fibers. *Nature*, 1958, 181, 957–958.
10. Madrid R., Bradley W. G.: The pathology of neuropathies with focal thickening of the myelin sheath (tomaculous neuropathy). Studies on the formation of the abnormal myelin sheath. *J Neurol Sci*, 1975, 25, 415–488.
11. Meier C., Fall C.: Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Report of two families and review of the literature. *J Neurol*, 1982, 228, 73–93.
12. Meier C., Bischoff A.: Oligodendroglial cell development in jimpy mice and controls. *J Neurol Sci*, 1975, 26, 517–528.
13. Webster H.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J Cell Biol*, 1971, 48, 348–367.
14. Webster H. F.: Development of peripheral myelinated and unmyelinated nerve fibres. In: *Peripheral neuropathy*. Eds.: P. J. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert, Saunders W. B., Philadelphia, 1975, 37–61.
15. Webster H. F., Spiro D.: Phase and electron microscopic studies of experimental demyelination. Part 1 (Variations in myelin sheath contour in normal guinea-pig sciatic nerve). *J Neuropathol Exp Neurol*, 1960, 19, 42–69.
16. Webster H. F., Spiro D., Walcsman B., Adams R. D.: Phase and electron microscopic studies of experimental demyelination. Part 2 (Schwann cell changes in guinea-pig sciatic nerves during experimental diphtheric neuritis). *J Neuropathol Exp Neurol*, 1961, 20, 5–31.
17. Williams P. L., Landon D. N.: The energy source of the nerve fibers. *Nerve Scientist*, 1964, 21, 166–174.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 1a Banacha Str., 02-097 Warszawa

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

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL ACUTE HYPOXIA ON MYELIN PROTEINS*

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Biochemical investigations have revealed that acute hypoxia is followed by several alterations in the composition and metabolism of proteo-lipid membranes of myelin sheaths, which may occur even in the absence of microscopically visible lesions in the white matter. In some circumstances known from case descriptions in human pathology and in experimental models, as cyanide or carbon monoxide intoxication, hypoxia may lead to marked alterations of myelin sheaths, in the form of marked disseminated or diffuse demyelination (Raine 1984; Traugott, Raine 1984). In our previous studies concerning myelin in acute hypoxia (Wender et al. 1987) we have found some deviations in the composition of its lipids. Most pronounced were increased cholesterol esterification, the increase of lysophosphatidylcholine and some other phospholipid fractions.

The pathomechanism of myelin lesions in hypoxia is not fully understood. That is why, studying the sequence of events leading to myelin sheath alterations in hypoxia we have evaluated the composition of myelin proteins. Changes in the latter have been noticed in several studies concerning experimental lesions of the myelin (Wender et al. 1978; 1983a, 1983b; Norton, Camer 1984).

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed on white rats of Wistar strain, each weighing 200–250 g. Acute hypoxia was induced by placing the animals for 3 min in an airtight glass chamber with gas mixture containing 2% O₂ in 97.9% N₂ and 0.1% CO₂, passing through the chamber at 2.8 l. per min flow rate. The animals in groups of 10 each were sacrificed after 4 min, 4 h, 24 h, 14 days or

*The studies were supported by a grant from the Polish Academy of Sciences Research Programm No 06-02. II. 1. 3

2 months after hypoxia, by decapitation in light halotan anesthesia. The heads were immediately placed in liquid nitrogen.

Biochemical methods. Homogenization of the nervous tissue was performed at the temperature 0–4°C in a glass homogenizer (clearance 0.18 mm). The myelin fraction was obtained by fractionation in a discontinuous sucrose density gradient (0.32 and 0.85 M at pH 7.0) by the method of Norton and Paduslo (1973). The myelin fraction was washed three times with distilled water, each time followed by centrifugation at 75 000 g for 20 minutes. Myelin was lyophilized and stored at –20°C.

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Agrawal (1974). The myelin proteins were extracted by means of 0.4% sodium dodecylsulfate (SDS) in 0.01 M tris-HCl buffer, pH 7.0 (2 ml/mg of myelin proteins). The protein extract was separated from the insoluble residue by means of centrifugation at 100 000 g, and then subjected to electrophoretic separation on 12% polyacrylamide gel prepared immediately before use according to Waehneltd and Mandel (1972).

0.1 ml of the protein solution, containing 30–35 µg of protein was layered on top of the gel. Electrophoresis was starting at a current of 0.1 mA per gel. As soon as the marker dye penetrated the gel, the current was increased stepwise to 2 mA per gel. The electrophoretic separation was stopped as soon as the marker dye reached the bottom of the gel. The separated proteins were then stained for 18 to 24 h by means of Coomassie Brilliant Blue B-250 followed by a thorough rinsing of the gel in 50% methanol, alternatively with 10% acetic acid, as described by Agrawal et al. (1972) (See Fig. 1).

The obtained gels were stored in 7% acetic acid until they were scanned by means of densitometry at 610 nm, using a Kipp-Zonen, Holland microdensitometer with integrating device, and the results were expressed as percentage of total proteins.

Myelin proteins separated on polyacrylamide gels were identified using standard proteins of known molecular mass (Fig. 2). The protein were identified as follows: molecular mass $5.5 \cdot 10^4$ daltons as Wolfram protein, molecular mass $2.3 \cdot 10^4$ daltons as proteolipid Folch-Lees, molecular mass $2.1 \cdot 10^4$ daltons as Agrawal protein, molecular mass $1.7 \cdot 10^4$ daltons as large component of basic protein and molecular mass $1.38 \cdot 10^4$ daltons as small component of basic protein.

RESULTS

The clinical observations and morphological pattern of the brain after acute hypoxia in experimental animals were identical to those reported in our previous publications (Wender et al. 1987). A well defined myelinopathy was never found.

The results obtained in electrophoretic studies of myelin proteins in rats after acute hypoxia are presented in Table 1. Most pronounced changes

Table 1. Results of proteins estimation in the rat myelin after acute hypoxia (in % of total myelin proteins)
 Tabela 1. Wyniki oznaczeń białek w mielinie u szczurów poddanych ostremu niedotlenieniu (w % całkowitych białek mieliny)

		Control	4 hrs	24 hrs	2 weeks	2 months
		Kontrola	4 godz.	24 godz.	2 tygodnie	2 miesiące
Wolfgram Protein	(WP)	30.1 ± 1.6	26.7 ± 0.7**	28.2 ± 1.2**	25.3 ± 1.5**	25.8 ± 0.8**
Białko Wolfgrama	(WP)	30.1 ± 1.6	26.7 ± 0.7**	28.2 ± 1.2**	25.3 ± 1.5**	25.8 ± 0.8**
Folch-Lees Proteolipid	(PLP)	40.7 ± 2.1	45.5 ± 1.7**	35.8 ± 0.9**	35.4 ± 1.7**	46.5 ± 1.3**
Proteolipid Folch-Lees	(PLP)	40.7 ± 2.1	45.5 ± 1.7**	35.8 ± 0.9**	35.4 ± 1.7**	46.5 ± 1.3**
Agrawal Protein	(AP)	12.0 ± 0.1	8.3 ± 0.7**	13.4 ± 0.6	12.3 ± 2.0	8.5 ± 0.5**
Białko Agrawala	(AP)	12.0 ± 0.1	8.3 ± 0.7**	13.4 ± 0.6	12.3 ± 2.0	8.5 ± 0.5**
Large Basic Protein	(LBP)	5.8 ± 0.7	6.8 ± 1.0	10.5 ± 1.0**	9.6 ± 1.4**	8.2 ± 1.0**
Cięższe białko zasadowe	(LBP)	5.8 ± 0.7	6.8 ± 1.0	10.5 ± 1.0**	9.6 ± 1.4**	8.2 ± 1.0**
Small Basic Protein	(SBP)	11.4 ± 0.5	12.7 ± 1.9	12.1 ± 0.7*	17.4 ± 1.4**	11.0 ± 1.3
Lżejsze białko zasadowe	(SBP)	11.4 ± 0.5	12.7 ± 1.9	12.1 ± 0.7*	17.4 ± 1.4**	11.0 ± 1.3
SBP/LBP ratio		2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3**	1.2 ± 0.2*	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3
Stosunek SBP/LBP		2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3**	1.2 ± 0.2*	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3

Results are presented in % as means from 10 estimations ± SEM

Wyniki przedstawiono w % jako średnie z 10 oznaczeń ± średni błąd średniej

* Statistically significant differences in comparison with normal values at the level $p \leq 0.05$ (Students "t" test)

Statystycznie istotne różnice w stosunku do wartości normalnych przy poziomie $p \leq 0.05$ (test „t” Studenta)

** Statistically significant differences in comparison with normal values at the level $p \leq 0.01$ (Students "t" test)

Statystycznie istotne różnice w stosunku do wartości normalnych przy poziomie $p \leq 0.01$ (test „t” Studenta)

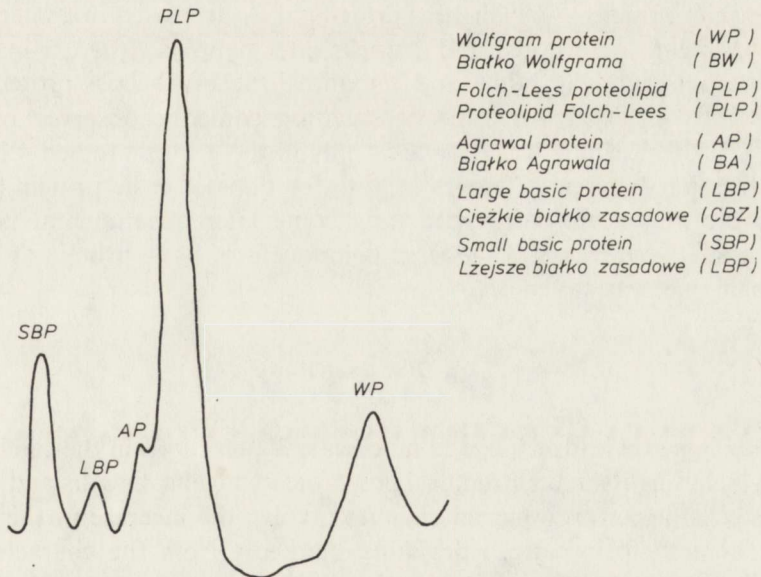


Fig. 1. Densitogram of myelin proteins of normal rat
 Ryc. 1. Denzytogram białek mieliny normalnego szczura

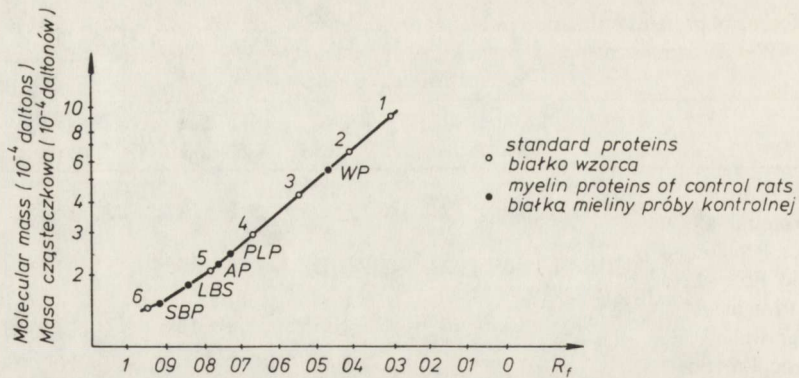


Fig. 2. Estimation of molecular mass of myelin proteins of normal rat. Log₁₀ of molecular mass of protein standard presented as R_f function. Every point represents the mean of 10 estimations from myelin or control rats: 1. phosphorylase, 2. bovine serum albumin, 3. ovalbumin, 4. carbonic anhydrase, 5. inhibitor of topsoil tripsine, 6. α-lactalbumin. WP – Wolfgram protein, PLP – Folch-Lees proteolipid, AP – Agrawal protein, LBP – large basic protein, SBP – small basic protein

Ryc. 2. Oznaczenie masy molekularnej białek osłonki mielinowej normalnego szczura. Log₁₀ masy molekularnej standardów białkowych wykreślono jako funkcję R_f. Każdy punkt przedstawia średnią z 10 oznaczeń mieliny szczurów kontrolnych: 1. fosforylaza, 2. albumina surowicy wołu, 3. owoalbumina, 4. anhidraza węglanowa, 5. inhibitor trypsyny sojowej, 6. α-laktalbumina. WP – białko Wolfgrama, PLP – proteolipid Folch-Lees, AP – białko Agrawala, LBP – cięższe białko zasadowe, SBP – lżejsze białko zasadowe

concern the high molecular weight Wolfgram protein, showing a decrease as early as 4 hours after acute hypoxia, reaching peak values in the late experimental periods (2 weeks and 2 months after experimental hypoxia). The main myelin protein – Folch-Lees proteolipid – decreased in a later period of the experiment – 24 hours and 2 weeks after hypoxia, whereas in the other experimental groups (4 hours and 2 months) the Folch-Lees proteolipid was even slightly elevated. An opposite situation could be observed concerning Agrawal protein, which was decreased only in the groups studied 4 hours and 2 months after hypoxia. Changes in both fractions of basic protein (LBP and SBP) were minor and concerned only some later experimental periods, in which a relative increase of the large component of basic protein as well as of the small one was noted.

DISCUSSION

Acute hypoxia leads to several biochemical alterations in the cerebral white matter including its main structural components myelin sheaths and oligodendroglia cells. Most pronounced changes involve the increase in the free fatty acid pool with their pattern deviating markedly from the characteristic for normal white matter (Strosznajder et al. 1972; Guisto, Bazan 1984; Wender et al. 1988). The most visible change is the pronounced rise of arachidonic acid

content (20:4). Arachidonic acid produced in excess may be used for overproduction of prostaglandins involved in the pathomechanism of brain lesions after hypoxia. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol represent the main source of fatty acids release, by the mechanism yielding diglycerides and lysophospholipids further transformed into fatty acids (De Medio et al. 1980).

Cytophotometric analysis of the relative DNA content in all nuclei of oligodendroglia demonstrated an increased extinction of DNA in the early period and a decreased one in the late phase after acute hypoxia (Wender et al. 1988). The changes are interpreted as reflecting alterations in DNA configuration associated with some shift between the metabolically more active loose and less active heterochromatin fractions.

Of two basic chemical components of the myelin membranes, lipids exhibit only minor changes concerning increased esterification of cholesterol and rise in the content of lysophosphatidylcholine and some other phospholipid fractions (Wender et al. 1987). The heretofore presented studies of myelin proteins in the experimental model of acute hypoxia have shown that most sensitive is the high molecular weight fraction: Wolfgram protein, whereas Folch-Lees proteolipid and Agrawal protein showed only a transitory decrease. The elevation of the percentage of both fractions of the basic protein (LBP and SBP) seems to be of minor importance. These changes should be considered as reflecting only the relative shift in the protein pattern, and not a real increase in the content of basic proteins in the myelin membranes.

An important element found in biochemical studies of the brain in hypoxia is the long lasting effect of this noxious agent on the chemistry of nervous tissue. In our previous studies we have noticed a very high level of free fatty acids in the white matter 14 days after hypoxia, and even 2 months after it (Wender et al. 1988). The increase was associated with a high degree of cholesterol esterification (Wender et al. 1987). In the present studies we have also noted an abnormal pattern of myelin proteins as late as 2 months after the action of hypoxia, and even the appearance of some new alterations in that period. Full explanation of these observations is not easy, and we may only say, that the degradation processes of biological membranes in the brain, which start immediately after the action of hypoxia, continue for months. This may be one of the important factors explaining the late progress of clinical and pathological symptoms observed in some cases of ischemic stroke.

It is assumed, though not entirely documented, that the basic myelin proteins are primarily responsible for the development of demyelination (Norton et al. 1978). However, the question whether the basic myelin protein functions as a general target component in all demyelinating processes or whether its role is limited only to those evoked by the neuroallergic reaction remains still an open question. It was established that transplacental intoxication with ethylnitrosourea leads to development of animals defective with respect to the protein composition of the central myelin (Wender et al. 1978). In

triethyltin (TET) intoxication the Agrawal protein of the myelin sheath happened to be most markedly affected, showing a considerably reduced percentage (Wender et al. 1983a). The myelin protein spectrum in Wallerian degeneration of the optic nerve remained essentially unchanged for 32 days after enucleation, to show a decrease of the relative content of basic myelin proteins accompanied by an increased percentage of the Wolfgram protein during the forthcoming development of Wallerian degeneration (Wender et al. 1983b).

A completely different pattern of changes in myelin protein was found as a sequel of acute hypoxia with most marked deviations in Wolfgram protein and in Folch-Lees proteolipid.

The lack of changes of the basic protein, considered as an early event, weakening the molecular structure of the myelin membrane, might be at least one of the factors explaining why hypoxia only rarely leads to demyelination. The other conclusion from our studies is that various noxious agents acting on the brain, produce specific to some degree, and not unique changes in the myelin proteins.

WPŁYW OSTREGO DOŚWIADCZALNEGO NIEDOTLENIENIA NA BIAŁKO MIELINY

Streszczenie

Przebadano obraz elektroforetyczny białek mieliny izolowanej z mózgow szczerów zabitych w 4 i 24 godziny, 14 dni oraz 2 miesiące po ostrym krótkotrwałym (3 min) niedotlenieniu.

Stwierdzono, że ostre niedotlenienie prowadzi do wyraźnego spadku zawartości białka Wolfgrama, podczas gdy główne białko mieliny — proteolipid Folch-Lees — wykazał spadek dopiero w późnym okresie doświadczenia (24 godziny i 2 tygodnie po niedotlenieniu).

Brak zmian białek zasadowych, traktowanych jako wczesne zjawisko osłabiające strukturę molekularną błon mieliny, może być uważane za jeden z czynników wyjaśniających, dlaczego niedotlenienie tylko rzadko prowadzi do demielinizacji. Z przeprowadzonych badań wynika także, że różne czynniki szkodliwe działające na mózg, wywołują do pewnego stopnia swoiste zmiany białek mieliny.

REFERENCES

1. Agrawal H. C., Burton R. M., Fishman M. A., Mitchel R. F., Prensky A. L.: Partial characterization of a new myelin protein component. *J Neurochem*, 1972, 19, 2083–2089.
2. Agrawal H. C.: Analysis of membrane proteins by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Fundamentals in lipid chemistry*. Eds.: R. M. Burton, B. F. Guerra. Science Publication Division, Webster Groves, Missouri, 1974, pp. 511–543.
3. De Medio G., Goracci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Mazzari S., Porcelatti G., Strosznajder J., Trovarelli G.: The effect of transient ischemia on fatty acids and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital J Biochem*, 1980, 29, 412–432.
4. Guisto N., Bazan N.: Anoxia-induced production of methylated and free fatty acids in retina, cerebral cortex and white matter. *Neurochem Pathol*, 1983, 1, 17–41.
5. Norton W. T., Poduslo S. E.: Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J Neurochem*, 1973, 21, 749–758.

6. Norton N., Cammer W., Bloom B., Gordon S.: Neutral proteinase secreted by macrophages degrade basic proteins: a possible mechanism of inflammatory demyelination. In: Myelination and demyelination. Ed. J. Palo. Plenum Publ. Corpor., New York, 1978, 365–381.
7. Norton W., Cammer W.: Chemical pathology of diseases involving myelin. In: Myelin. Ed.: P. Morell. Plenum Press, New York, London, 1984, 389–403.
8. Raine C.: The neuropathology of myelin diseases. In: Myelin. Ed. P. Morell, Plenum Press, New York, London, 1984, 289–310.
9. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J.: Wpływ niedotlenienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnki morskiej. *Neuropat Pol*, 1972, 10, 447–455.
10. Traugott U., Raine C.: The neurology of myelin disease. In: Myelin, Ed.: P. Morell, Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 311–335.
11. Wachneldt T. V., Mandel P.: Isolation of rat brain myelin, monitored by polyacrylamide gel electrophoresis of dodecyl sulfate extracted proteins. *Brain Res*, 1972, 40, 419–436.
12. Wender M., Piechowski A., Sędzik J., Mularek O., Talkowska D.: Myelin proteins after transplacental intoxication with ethylnitrosourea. *Neuropatol Pol*, 1978, 16, 339–346.
13. Wender M., Zgorzalewicz B., Śniatała-Kamasa M., Piechowski A.: Myelin proteins in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Exp. Pathol*, 1983a, 23, 215–217.
14. Wender M., Zgorzalewicz B., Piechowski A., Spieszalski W., Bucholc M.: The pattern of myelin proteins in triethyltin (TET) intoxication. *Exp Pathol*, 1983b, 23, 193–195.
15. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipids. *Neuropat Pol*, 1987, 25, 107–115.
16. Wender M., Szczech J., Godlewski A., Grochowalska A.: Karyometric and cytophotometric studies of the oligodendroglia in the corpus callosum of the rat after hypoxia. *Exp Pathol*, 1988, 33, 249–255.
17. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A., Sroczyński E., Grochowalska A.: Influence of experimental hypoxia on content and composition of free fatty acids in cerebral white matter. *Exp Pathol*, 1988 (in press).

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

KOMUNIKATY

W okresie od 12 do 14 grudnia 1989 r. odbędą się w Magdeburgu XI Dni Towarzystwa Neuropatologów NRD.

Głównymi tematami będą:

- zapalenie OUN,
- neurotransplantacje i regeneracja układu nerwowego,
- tematy wolne.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

11. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR, Institut für Pathologische Anatomie der Medizinischen Akademie, Abteilung für Neuropathologie. Leipziger Strasse 44, Magdeburg GDR – 3090.

*

W okresie od 17 do 20 kwietnia 1990 r. odbędzie się w Jenie VII Kollokwium Miologiczne.

Głównym tematem będą miopatie metaboliczne (w aspekcie fizjologicznym, biochemicznym i morfologicznym).

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr sc. med. A. Schmidt, Institut für Pathologie der Zentralklinik für Herz- und Lungenkrankheiten, Robert-Koch-Alle 9, Bad Berka, DDR 5303

Jerzy Dymecki

GRAŻYNA M. SZPAKOWA

TOPOGRAFIA I STRUKTURA WTÓRNYCH USZKODZEŃ MÓZGU W PRZEBIEGU OBRZĘKU TOWARZYSZĄCEGO NADNAMIOTO- WYM OGNISKOM ROZMIĘKANIA MÓZGU*

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Objętość czaszki jest wielkością stałą, na którą składa się suma objętości mózgu, płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi w śródczaszkowym łożysku naczyniowym. Wzrost objętości jednej z tych składowych odbywa się kosztem innych. Przy wzroście objętości mózgu w przebiegu zawału i obrzęku pierwszymi buforami występujących wówczas przemieszczeń są płyn mózgowo-rdzeniowy i krew, następnie dochodzi do przemieszczeń tkanki mózgu w rejonie niepełnych przegród wewnątrzczaszkowych, oponowych bądź kostnych. Tworzące się przepukliny baka i zakrętu hipokampa, zakrętu obręczy, migdałków i robaka mózdzku są początkowo wyrazem mechanizmów kompensacyjnych (mózg korzysta z „zapasowych wyjść”). Przy narastającym obrzęku dochodzi do przemieszczenia struktur głębokich mózgu wraz z pniem mózgu poza linię środkową i ku dołowi, w wyniku narastania różnicy ciśnień pomiędzy przestrzenią nad- i podnamiotową. Towarzyszy im przemieszczanie naczyń, co prowadzi do niedotlenienia i niedokrwienia oraz wtórnych krwotoków i martwic.

Wgłobienia i towarzyszące im wtórne uszkodzenia mózgu są przedmiotem badań najczęściej w przebiegu procesów rozrostowych, krwotoków pourazowych oraz masywnych krwotoków śródmózgowych z towarzyszącym narastaniem masy śródczaszkowej w przestrzeni nadnamiotowej (Bromowicz 1953; Lindenberg 1955; Friede, Roessmann 1966). Natomiast rzadko bywają one rozpatrywane jako następstwo rozległych rozmiękań w półkulach mózgu, a wtedy najczęściej jako przyczyna wtórnych krwotoków do pnia mózgu (Kulczycki 1964; Cohen, Aronson 1968; Tarnowska-Dziduszko, Ostrowska 1981), bardzo rzadko jako przyczyna wtórnych martwic w półkulach mózgu (Dymecki 1967) i w ich strukturach głębokich (Rap, Zaremba 1970). W piś-

*Praca wykonana w ramach Problemu Resortowego R-13-1 i wygłoszona na V Polsko-Węgierskim Sympozjum Neuropatologicznym w Gdańsku 5 czerwca 1987 r.

miennictwie klinicznym podkreśla się, że obrzęk mózgu rozwijający się w przebiegu rozmiękania w OUN może naśladować procesy rozrostowe (King 1951; Scarcella 1956; van Trotsenburg, Vinken 1966; Greenwood 1968).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono systematycznego opracowania tego zagadnienia. Podjęto więc badania topografii i struktury wtórnych uszkodzeń mózgu w obszarach przemieszczeń oraz wgłobień w przebiegu narastającego obrzęku mózgu, towarzyszącego rozmiękaniu półkulowemu do ustalenia związku pomiędzy nasileniem obrzęku mózgu i obrazem tych właśnie uszkodzeń.

MATERIAŁ I METODY

Materiał obejmował 70 przypadków sekcyjnych (44 kobiety i 26 mężczyzn) w wieku od 39 do 96 lat. Średnia wieku wynosiła 68 lat, mediana 72 lata. Czas przeżycia od wystąpienia udaru do zgonu wynosił od 20 godz. do 42 dni. Klinicznie rozmiękanie mózgu rozpoznano w 65 przypadkach, w 3 przypadkach podejrzewano krwotok mózgowo-oponowy, a w 2 przypadkach – guz mózgu. Nadciśnienie tętnicze odnotowano w wywiadzie u 34 chorych, cukrzyce w 10 przypadkach a zaburzenia rytmu serca stwierdzono u 29 osób. Sekcja ogólna wykazała w 15 przypadkach świeży zawał mięśnia sercowego, w 4 przypadkach zator tętnicy płucnej, w 6 przypadkach wadę mitralną serca, w 3 przypadkach zatory w tętnicach kończyn, a w 2 przypadkach zatory w tętnicach nerkowych.

Do badania histopatologicznego pobrano wycinki z obu półkul mózgu na poziomie przednich i tylnych zwojów podstawy, z obu półkul mózdzku i z pnia mózgu. Po zatopieniu w parafinie skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną (HE), fioletem krezyłu, met. van Gieson, Mallory'ego, Klüvera – Barrery, Spielmeyera i Kanzler – Arendta. Skrawki mrożone impregnowano metodą Cajala.

Do oceny nasilenia obrzęku przyjęto trzystopniową skalę zmian makroskopowych, zgodnie z którą za I stopień obrzęku uznano spłaszczenie zakrętów i zaciśnięcie rowków, poszerzenie istoty białej oraz zwężenie komory bocznej po stronie zawału mózgu, za II stopień – występowanie ponadto wgłobień tkanki mózgu, a za III stopień – stwierdzenie dodatkowo przemieszczeń struktur głębokich wraz z komorą III poza linię środkową. Na podstawie danych z piśmiennictwa (Jacob 1940; 1967; Zülch 1967; Mossakowski 1981; Hirano 1983) i badań własnych, do uchwytnych mikroskopowo zmian strukturalnych związanych z ostrym obrzękiem mózgu zaliczono obrzmienie oligodendrocytów i astrogleju oraz osłonek mielinowych i występowanie okołonaczyniowych jeziorzek bogatobiałkowego płynu. Za przebyłym bądź przewlekłym obrzękiem przemawiało poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych oraz pól martwicy obrzękowej ze zgąbczeniem istoty białej, ubytkiem jąder oligodendrogleju i rozpadem osłonek mielinowych.

WYNIKI

Ognisko pierwotnego zawału półkulowego było zlokalizowane w 53 przypadkach w obszarze unaczynienia tętnicy mózgu środkowej, w 17 przypadkach obejmowało ponadto obszar unaczynienia tętnicy mózgu przedniej. W 39 przypadkach zawał był blady, a w 31 ukrwotoczony. W 47 przypadkach występowały cechy zaniku mózgu. Miażdżycę naczyń podstawy mózgu I i II stopnia stwierdzono w 44 przypadkach, a III i IV stopnia w 18 przypadkach. Stwardnienie ścian tętniczek śródmiaższowych III i IV stopnia odnotowano w 28 przypadkach, a w 42 stwierdzono przebudowę włóknistą I lub II stopnia. W obszarze pierwotnego zawału obserwowano zazwyczaj różne stadia rozwoju martwicy.

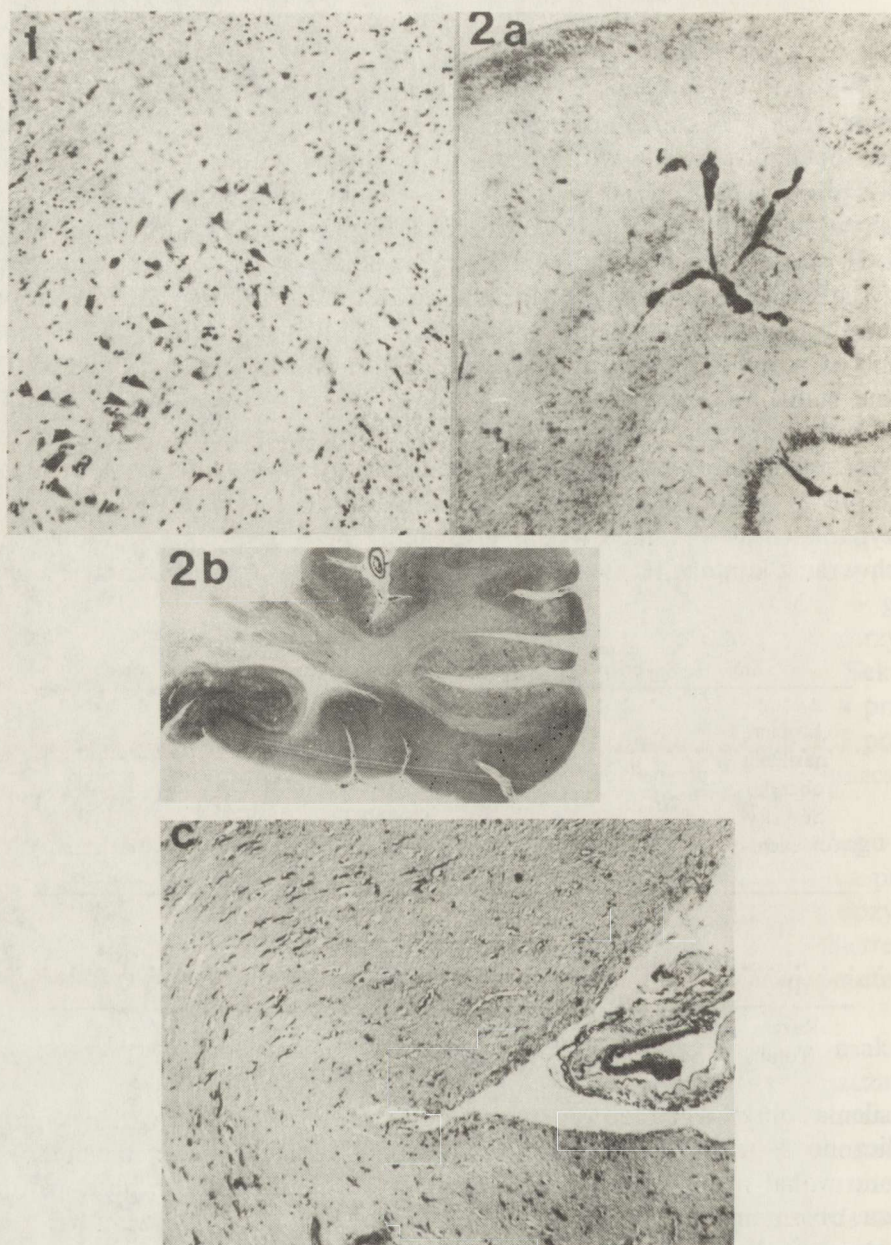
Obrzęk mózgu ze spłaszczeniem zakrętów, zaciśnięciem rowków oraz poszerzeniem istoty białej był często obustronny i zawsze obecny, lub bardziej nasilony w półkuli z zawałem. Wgłobienie tkanki mózgu stwierdzono w 65 przypadkach, w 47 z nich wystąpiło ponadto przemieszczenie struktur głębo- kich wraz z komorą III poza linię środkową (tab. 1). Zgodnie z przyjętą skalą

Tabela 1. Stopień nasilenia obrzęku a topografia wgłobień
Table 1. Severity of brain edema and topography of herniation

Stopień nasilenia obrzęku Severity of edema	Liczba przypadków No of cases	Wgłobienie Herniation			
		Zakręt obręczy Cingular gyrus	Hak hipokampa Hippocampal uncus	Migdałki mózdzku Cerebellar tonsils	Robak mózdzku Cerebellar vermis
I°	5	0	0	0	0
II°	18	3	18	10	0
III°	47	43	47	30	12
Razem Total	70	46	65	40	12

nasilenia obrzęku badany materiał podzielono na 3 grupy. Do I grupy zaliczono 5 przypadków. Czas przeżycia chorych od wystąpienia udaru do zgonu wahał się od 24 do 42 dni. We wszystkich przypadkach obserwowano, poza obszarem zawału, ubytki neuronów, głównie w III warstwie kory, w warstwie komórek Purkiniego oraz w warstwie komórek piramidowych rogu Amona, szczególnie w strefie Sommera (ryc. 1). W polach plackowatych opustoszeń neuronalnych w hipokampie – obserwowano rozplem gleju astrocytarnego.

Grupa II obejmowała 18 przypadków z czasem przeżycia od 1 do 42 dni. W 10 przypadkach stwierdzono jedno-, a w 8 obustronne wgłobienie haka zakrętu hipokampa. W 10 przypadkach wystąpiło ponadto wgłobienie migdałków mózdzku, a w 3 przepuklina zakrętu obręczy. W obrębie przepuklin



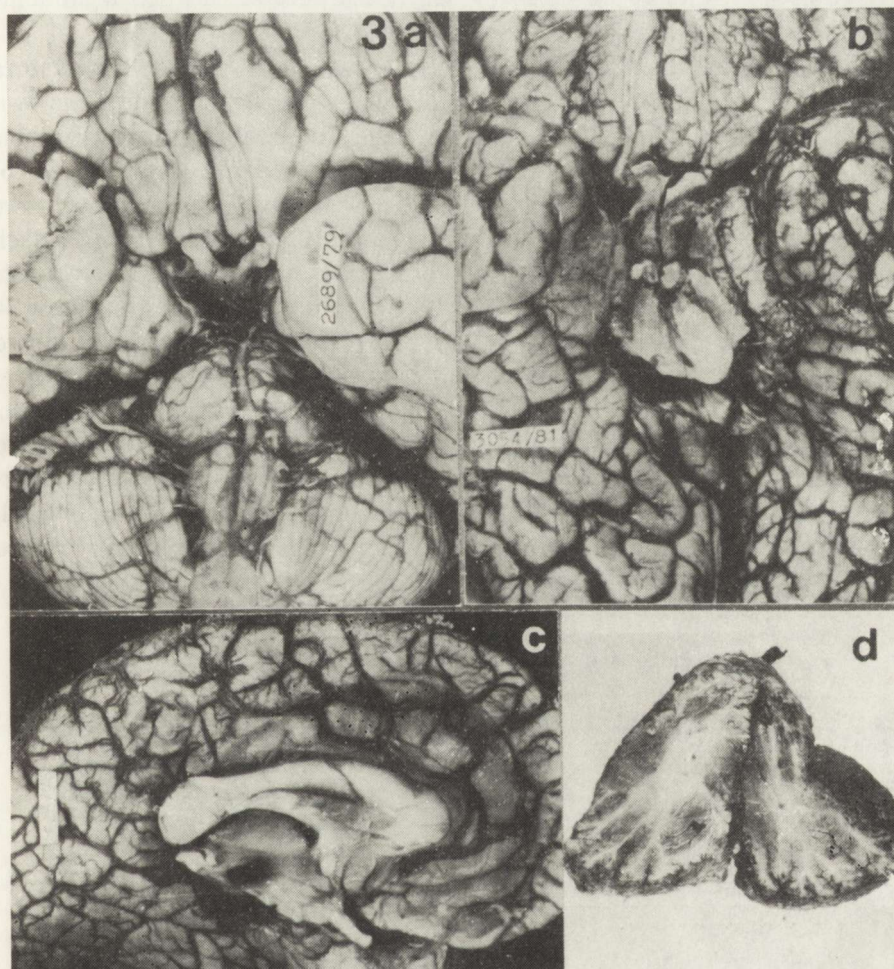
Ryc. 1. Grupa I, wtórne martwice. Ubytki neuronów w sektorze Sommera. Klüver – Barrera. Pow. lupowe

Fig. 1. Group I, secondary necroses. Neuronal loss in Sommer's sector. Klüver – Barrera. Magn. glass

Ryc. 2. Grupa II, wtórne martwice. 2a. Zastój w naczyniach rogu Amona i ubytki neuronów. Klüver – Barrera. Pow. 25 ×. 2b. Bruzda po wgłobieniu w zakręcie hipokampa. Mallory. Pow. lupowe. 2c. Martwica wybiórcza z ucisku w korze zakrętu hipokampa. HE. Pow. 60 ×

Fig. 2. Group II, secondary necroses. 2a. Stasis in Ammon's horn vessels and loss of neurons. Klüver – Barrera. × 25. 2b. Noth left by herniation in hippocampal gyrus. Mallory. Magn. glass. 2c. Selective necrosis due to tissue pressure in hippocampal cortex. HE × 60

oraz w ich otoczeniu obserwowano przekrwienie naczyń, zwłaszcza żylnych i włośniczek (ryc. 2a). Wokół głębszych bruzd po wgłobieniu (ryc. 2b) stwierdzano wybiórczą martwicę neuronów ze zgęszczeniem podłoża, a także bardziej rozległe martwice, zwykle ukrwotocznione, przy czym zachowane jeszcze, ale zniekształcone neurony układały się kuliście wokół bruzdy (ryc. 2c). Tylko w 3 przypadkach obecna była rozległa martwica wybiórcza w obrębie przepukliny: w 2 przypadkach w zakręcie hipokampa, w 1 przypadku w migdałkach mózdzku.



Ryc. 3. Grupa III, zróżnicowane nasilenie wgłobień. 3a. Wgłobienie haka zakrętu hipokampa i migdałków mózdzku. 3b. Bruzda okrężna; przepuklina obejmuje tylną część zakrętu hipokampa. 3c. Nisza po rozległym wgłobieniu zakrętu obręczy. 3d. Wgłobienie robaka i płacików prostych mózdzku

Fig. 3. Group III, differences in severity of herniation. 3a. Herniation of hippocampal uncus and cerebellar tonsils. 3b. Circular notch encompassing posterior part of hippocampal gyrus. 3c. Niche left by extensive herniation of cingulate gyrus. 3d. Herniation of vermis and straight cerebellar lobules

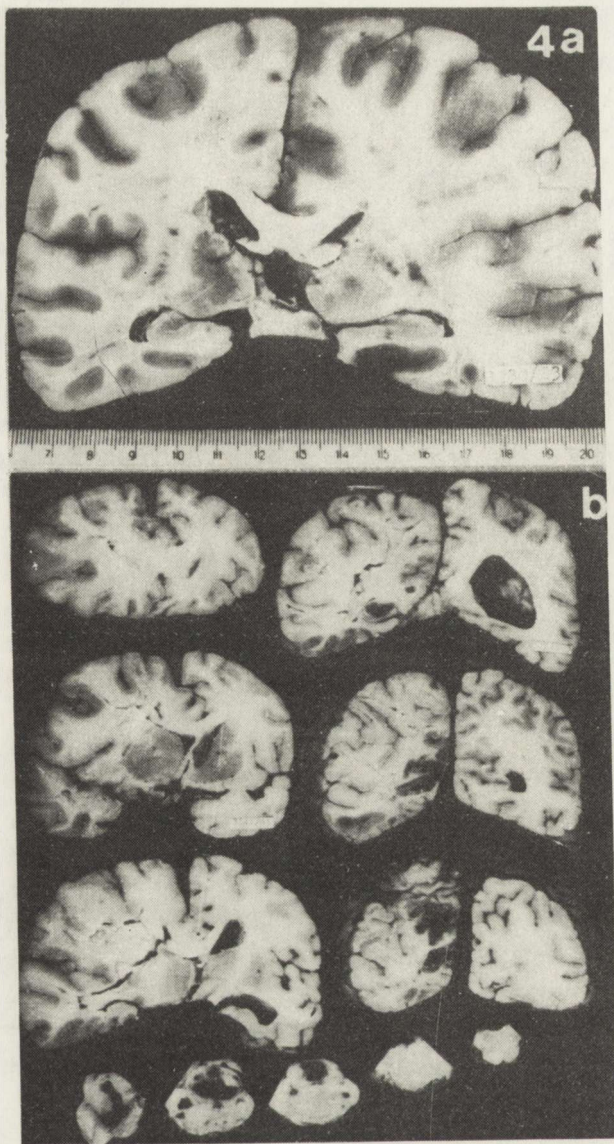
Grupa III obejmowała 47 przypadków z czasem przeżycia od 20 godz. do 20 dni. W 11 przypadkach stwierdzono jednostronną, a w 36 obustronną przepuklinę haka zakrętu hipokampa (ryc. 3a). W 14 przypadkach przepuklina była bardzo rozległa, obejmowała także jego część tylną, a wówczas obserwowano okrężnie przebiegającą bruzdę na podstawie mózgu (ryc. 3b). Przepuklinę zakrętu obręczy stwierdzono w 43 przypadkach. W 6 z nich była bardzo rozległa, sięgała aż do cieśni zakrętu. W przeciwległej półkuli widoczna była w tych przypadkach równie rozległa nisa (ryc. 3c). Wgłobienie migdałków mózdzku stwierdzono w 30 przypadkach, a w 12, tzw. „górne” wgłobienie robaka mózdzku w obręb wcięcia w namiocie mózdzku (ryc. 3d).

Zarówno w obrębie przepuklin, jak i poza ich obszarem, zwłaszcza w strukturach przemieszczonych lub uciśniętych, występowały wtórne martwice i bezodczynowe krwotoki (ryc. 4a–b, tab. 2 i 3). Krwotoki w obrębie przepuklin stwierdzono tylko w 2 przypadkach: 1 w zakręcie obręczy i 1 w robaku mózdzku. Natomiast w 13 przypadkach obserwowano krwotoki we wzgórzu, a w pojedynczych przypadkach w ciałkach suteczkowatych, ciałach kolankowatych bocznych, w skrzyżowaniu nerwów wzrokowych, w ciele migdałowatym oraz w hipokampie. Krwotoki w pniu mózgu odnotowano w 34 przypadkach, a w półkulach mózdzku w 2 przypadkach. Nadnamiotowo najczęściej uszkodzeniu krwotocznemu ulegały przyśrodkowe jądra wzgórza, w 6 przypadkach obustronnie, a w 3 tylko w półkuli przeciwległej do zawału, w której w 8 przypadkach miały one kształt wrzecionowaty, były ostro odgraniczone od otoczenia i ułożone równolegle do włókien pęczka suteczkowo-wzgórzowego (ryc. 5a–b). Krwotoki te przebijały się do komory III, drażyły do podwzgórza i śródmózgowia, a w ich obrębie obserwowano

Tabela 2. Topografia wtórnych krwotoków i martwic w obszarach wgłobień w przypadkach z III^o obrzęku mózgu

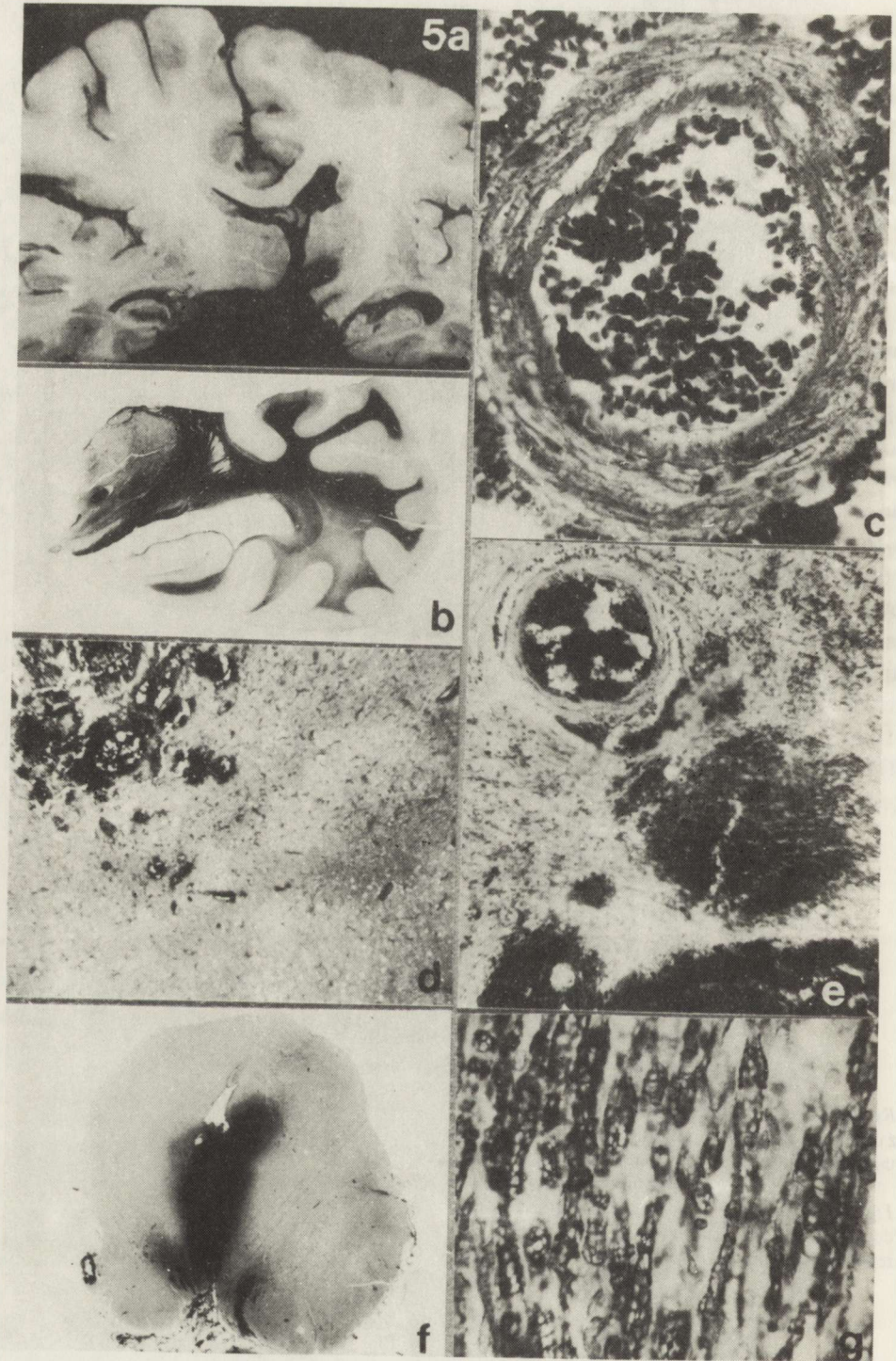
Table 2. Topography of secondary hemorrhages and necroses in regions of herniation in cases of IIIrd degree severity of brain edema

Umiejscowienie przepukliny Localization of herniae	Krwotoki Hemorrhages	Martwice Necroses		
		Ukrwotoczniowe Hemorrhagic	Blade Pale	Łącznie Jointly
Zakręt obręczy Cingular gyrus	1	16	0	16
Zakręt hipokampa Hippocampal gyrus	0	12	0	12
Robak mózdzku Cerebellar vermis	1	12	2	14
Migdałki mózdzku Cerebellar tonsils	0	3	2	5
Razem Total	2	43	4	47



Ryc. 4. Grupa III. Topografia wtórnych martwic i krwotoków. 4a. Ukrwotoczona martwica z ucisku w zakręcie hipokampa. 4b. Martwice w obrębie przepukliny zakrętu obręczy i w obszarze unaczynienia tętnicy tylnej mózgu lewej (zawał pierwotny w obszarze unaczynienia tętnicy mózgu środkowej lewej) i krwotoki do pnia mózgu

Fig. 4. Group III, Topography of secondary necroses and hemorrhages 4a. Hemorrhagic necrosis due to compression in hippocampal gyrus. 4b. Necroses within cingulate gyrus hernia and in the region of vascularization of left posterior cerebral artery (primary infarction in region of left middle cerebral artery) and hemorrhages into brain stem



niekiedy krwawiące tętniczki (ryc. 5c). We wzgórzu po stronie zawału, w 6 przypadkach, ogniska krwotoczne powstały ze zlewania się drobnych wynaczynień w martwiczo zmienionej tkance (ryc. 5d). Obustronnie występowały ponadto krwawienia z naczyń żylnych (ryc. 5e).

W strukturach podnamiotowych wtórne masywne krwotoki do pnia mózgu (34 przypadki) niszczyły głównie śródmózgowie (28 przypadków), rzadziej most (22 przypadki), a tylko w 1 przypadku opuszkę. W śródmózgowiu były one często umiejscowione w linii środkowej niszcząc niekiedy jądra nerwu okoruchowego i jego włókna (ryc. 5f–g). W moście natomiast były one ułożone równoległe do włókien poprzecznych części podstawnej. W mózdzku obserwowano w 2 przypadkach różnoczasowe krwawienia do martwiczo zmienionej tkanki.

Martwice wtórne, stwierdzone w 47 przypadkach w obrębie wgłobionych tkanek, były zlokalizowane w 16 przypadkach w zakręcie obręczy, w 12 przypadkach w haku i zakręcie hipokampa (w 4 obustronnie), w 12 przypadkach w robaku, a w 5 w migdałkach mózdzku. Ponadto, obserwowano martwice morfologicznie „młodsze” od pierwotnego zawału w przestrzeni nadnamiotowej w 36 przypadkach: w zakrętach skroniowo-potylicznych i w potylicznych (po 9 przypadków), w rogu Amona (8 przypadków), we wzgórzu (3 przypadki) oraz w zakręcie obręczy drugiej półkuli (4 przypadki). W przestrzeni podnamiotowej martwice stwierdzono w 15 przypadkach: w śródmózgowiu (8 przypadków), w moście (2 przypadki) i w półkuli mózdzku (5 przypadków). Martwice poza obszarem przepuklin, zarówno w płatach skroniowych, potylicznych i wzgórzu, jak i w półkulach mózdzku były zwykle ukrwotocznione (ryc. 6a, b). Wybroczyny występowały w polach martwicy niepełnej, wśród rozsianych zgąbczeń typu „krople deszczu” z groniastym

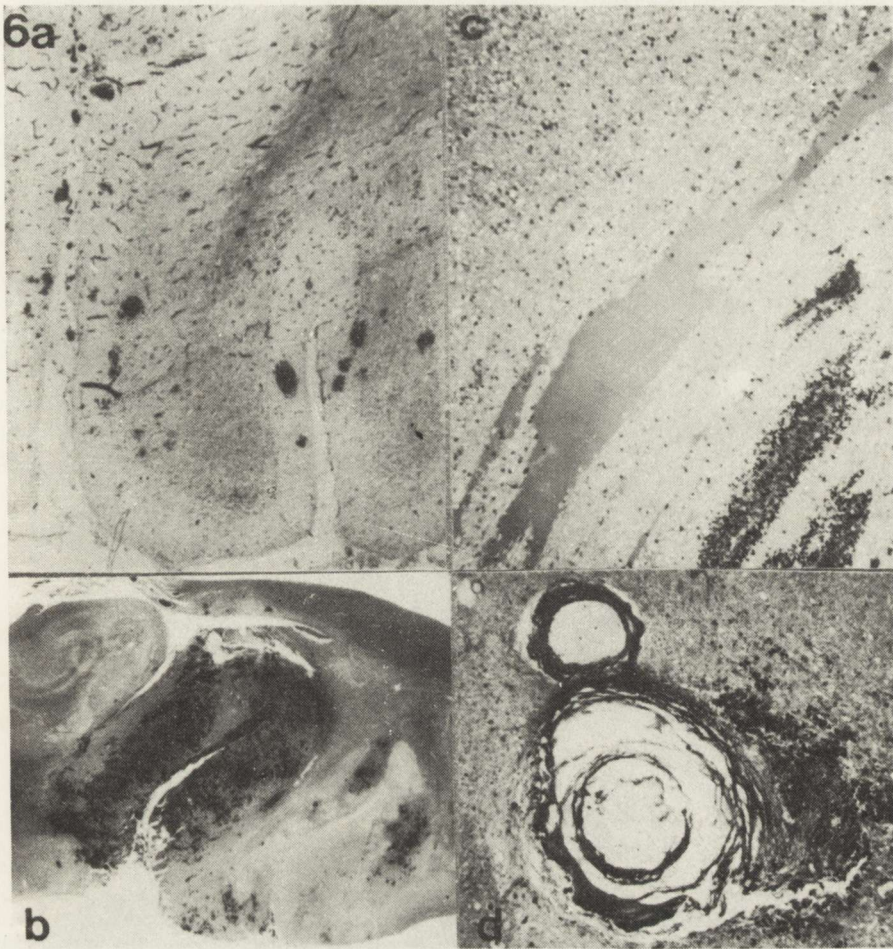
Ryc. 5. Grupa III. Topografia i struktura wtórnych krwotoków. 5a. Ognisko krwotoczne we wzgórzu w półkuli przeciwstronnej do pierwotnego zawału. 5b. To samo ognisko. Klüver–Barrera. Pow. lupowe. 5c. Tętnica z rozwarstwowaną ścianą w ognisku krwotocznym we wzgórzu po stronie przeciwnej do zawału. Mallory. Pow. 400 ×. 5d. Zlewające się krwotoki we wzgórzu po stronie zawału w polu martwicy obrzękowej typu „krople deszczu”. Mallory. Pow. 100 ×. 5e. Naczynie żylnie w ognisku krwotocznym we wzgórzu półkuli przeciwległej do zawału. Mallory. Pow. 100 ×. 5f. Wtórny krwotok w śródmózgowiu i we włóknach nerwu okoruchowego. HE. Pow. lupowe. 5g. Obrzmienie i rozpad osłonek mielinowych włókien nerwu okoruchowego. Klüver–Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 5. Group III. Topography and structure of secondary hemorrhages. 5a. Hemorrhagic focus in the thalamus the hemisphere contralateral to the infarct. 5b. The same as above. Klüver–Barrera. Magn. glass. 5c. Artery with delaminated wall in hemorrhagic focus in thalamus on side contralateral to infarction. Mallory. ×400. 5d. Merging hemorrhages in thalamus on infarction side in area of edematous necrosis of „rain drop” type. Mallory. ×100. 5e. Venous vessel in hemorrhagic focus in thalamus in hemisphere contralateral to infarction. Mallory. ×100. 5f. Secondary hemorrhage in midbrain and oculomotor nerve fibers. HE. Magn. glass. 5g. Swelling and disintegration of myelin sheaths of oculomotor nerve fibers. Klüver–Barrera. ×100

Tabela 3. Topografia wtórnych krwotoków i martwic poza obszarem wgłobień w przypadkach z III^o nasilenia obrzęku mózgu

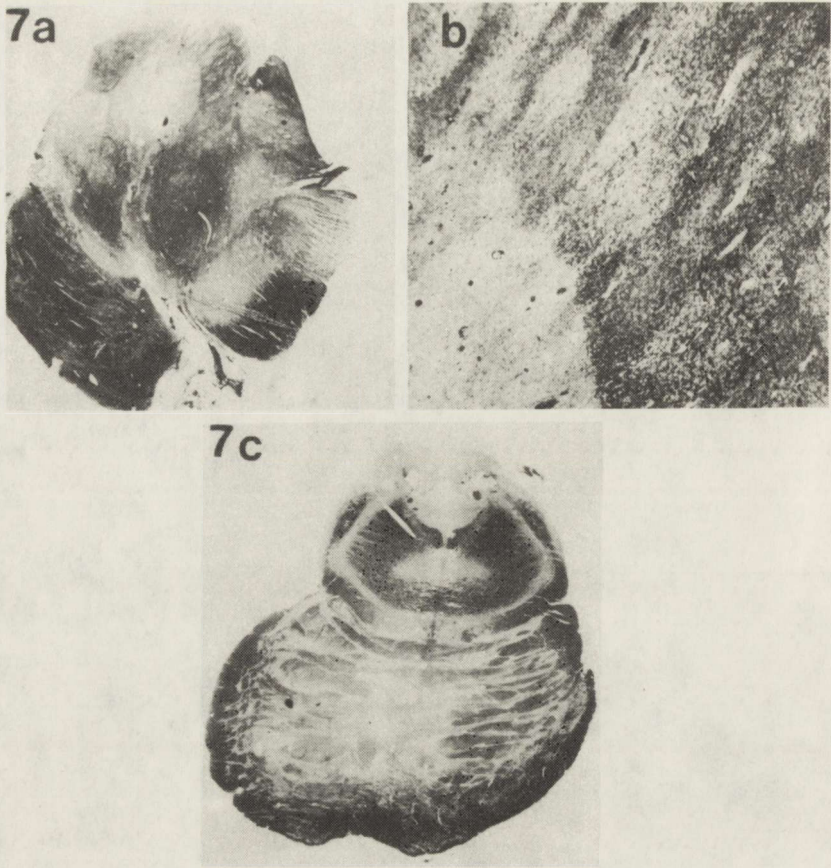
Table 3. Topography of secondary hemorrhages and necroses beyond the area of herniation in cases with IIIrd degree of severity of brain edema

Topografia uszkodzeń Topography of lesions	Krwotoki Hemorrhages	Martwice Necroses		Łącznie Jointly
		Ukrwotocznione Hemorrhagic	Blade Pale	
Nadnamiotowo: Supratentorial:				
Róg Amona Ammon's horn	0	2	6	8
Ciało migdałowe Amygdaloid body	1	0	3	3
Zakręty skroń.-potyl. Temporal-occipital gyri	0	9	0	9
Kora ostrogowa Calcarinae cortex	0	9	0	9
Wzgórze Thalamus	13	3	0	3
Zakręt obręczy drugiej półkuli Cingular gyrus of other hemisphere	0	1	3	4
	Razem Total	14	24	36
Podnamiotowo: Subtentorial:				
Śródmózgowie Midbrain	9	6	2	8
Śródmózgowie i most Midbrain and pons	20	0	0	0
Most Pons	4	0	2	2
Most i opuszka Pons and medulla	1	0	0	0
Półkule mózdzku Cerebellar hemispheres	2	5	0	5
	Razem Total	36	11	15
Ogółem Total	50	35	16	51



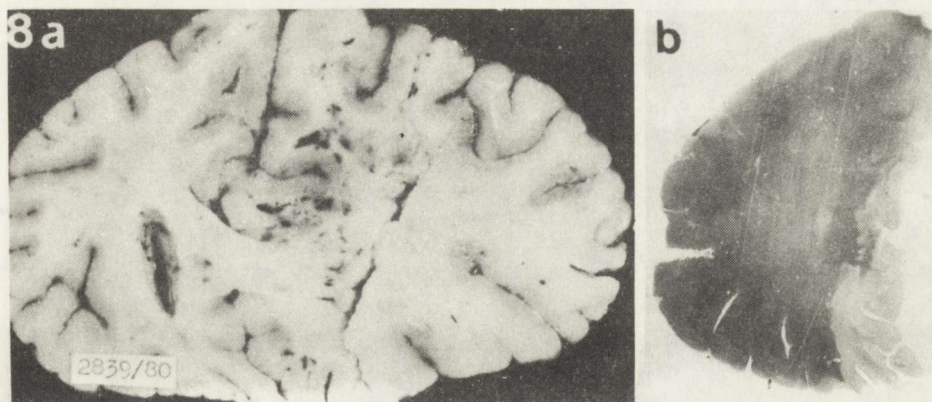
Ryc. 6. Grupa III. Struktura wtórnych martwic. 6a. Ukrwotocziona martwica migdałka mózdzku. HE. Pow. 25 ×. 6b. Martwica krwotoczna w zakręcie skroniowo-potylicznym bocznym. Mallory. Pow. lupowe. 6c. Wybroczyny i jeziora płynu w polu martwicy obrzękowej typu „krople deszczu”. Mallory. Pow. 100 ×. 6d. Krwawienie z tętnicy o martwiczo zmienionych ścianach. Mallory. Pow. 200 ×

Fig. 6. Group III. Structure of secondary necroses. 6a. Hemorrhagic necrosis of herniated cerebellar tonsils. HE. × 25. 6b. Hemorrhagic necrosis in lateral temporal-occipital gyrus. Mallory. Magn. glass. 6c. Extravasations and lakes of edematous fluid in area of edematous necrosis of “rain drop” type. Mallory. × 100. 6d. Bleeding from artery with necrotically changed wall. Mallory. × 200



Ryc. 7. Grupa III. Struktura wtórnych martwic w pniu mózgowym. 7a. Pola zgąbczeń w blaszce czworaczej i martwica w odnodze mózgu przeciwstronnej do pierwotnego zawału oraz ucisk nerwu okoruchowego. Klüver-Barrera. Pow. lupowe. 7b. Pola martwicy obrzękowej ze zgąbczeniem tkanki. Klüver-Barrera. Pow. 60 \times . 7c. Splowienie mieliny w części podstawnej mostu. Klüver-Barrera. Pow. lupowe

Fig. 7. Group III. Structure of secondary necroses in brain stem. 7a. Areas of spongiosis in lamina quadrigemina and necrosis of crus cerebri contralateral to primary infarction and compression of oculomotor nerve. Magn. glass. 7b. Areas of edematous necrosis with tissue spongiosis. Klüver-Barrera. $\times 60$. 7c. Myelin pallor in basal part of pons. Klüver-Barrera. Magn. glass

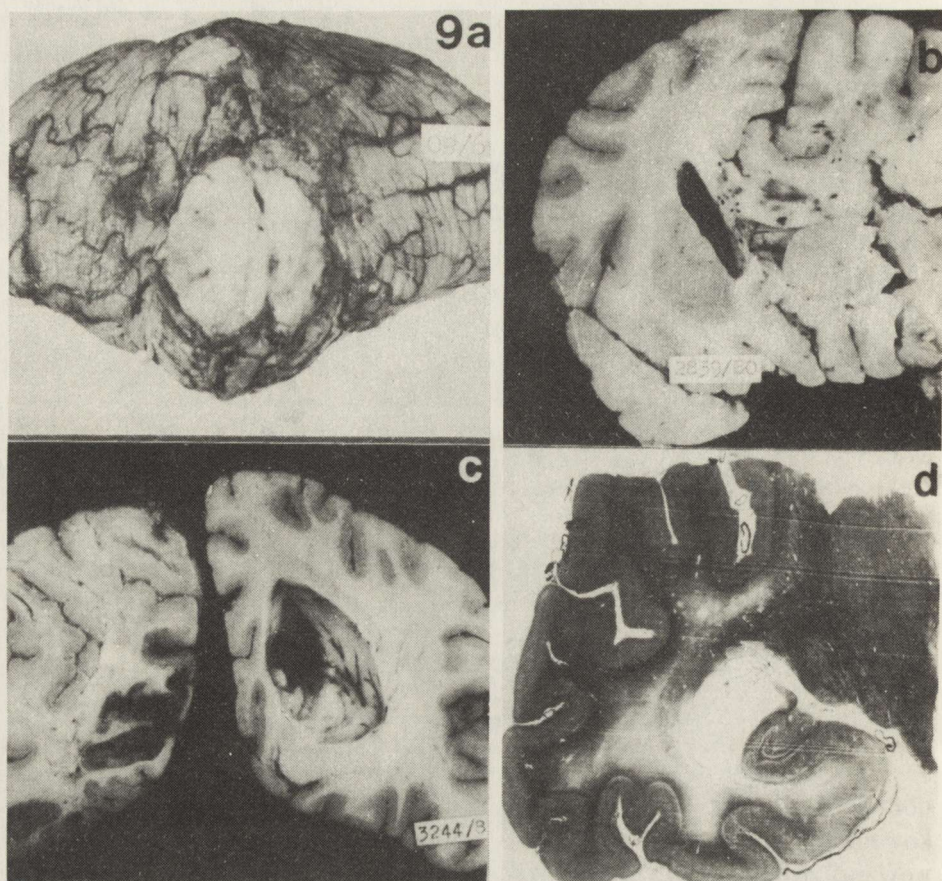


Ryc. 8. Grupa III. Martwica wtórna w półkuli mózgu przeciwstronnej do zawału. 8a. Przemieszczenie i zaciśnięcie gałęzi tętnic mózgu przednich przez rozległą przepuklinę zakrętu obręczy z wybroczynami w prawym zakręcie obręczy, zakrętach prostych, spoidle wielkim i wokół rogu czołowego komory bocznej lewej półkuli mózgu. 8b. Martwica niedokrwienna w zakręcie obręczy i w zakręcie prostym w półkuli przeciwległej do zawału w rejonie niszy po wgłobieniu zakrętu obręczy. HE. Pow. lupowe

Fig. 8. Group III. Secondary necrosis in hemisphere on contralateral side to infarction. 8a. Displacement and compression of branches of anterior cerebral arteries by extensive cingulate hernia with extravasations in right cingulate gyrus, straight gyri, corpus callosum and around the frontal horn of the lateral ventricle of the left hemisphere. 8b. Ischemic necrosis contralateral to infarction in the area of the hernial niche of the cingulate gyrus. HE. Magn. glass

obrmieniem i rozpadem osłonek mielinowych oraz z jeziorkami bogatobiałkowego płynu (ryc. 6c) i w polach martwicy rozplywnej. Niekiedy obserwowano różnoczasowe wynaczynienia krwi do martwiczo zmienionej tkanki (ryc. 6d). W 5 przypadkach pola martwicy niedokrwiennej poprzedzielane były pasmami lepiej zachowanej tkanki (ryc. 7a, b), a wokół przekrwionych włóścików i żył widoczne były wybroczyny. W odnogach mózgu obserwowano bezodczynowe ogniska martwicy, zarówno po stronie zawału, jak i po stronie przeciwnej (ryc. 7a), a w moście w linii środkowej części podstawnej stwierdzano ogniska spłowienia mieliny (ryc. 7c). Na wszystkich poziomach pnia mózgu obserwowano ubytki neuronów zarówno w jądrach nerwów czaszkowych, jak i w tworze siatkowatym, a także w jądrach oliw.

W przypadkach rozległych przepuklin zakrętu obręczy powodujących przemieszczenie i zaciśnięcie tętnic okołomodzelowatych (ryc. 8a), często zmienionych miażdżycowo, obserwowano anemizację kory i istoty białej w obrębie niszy wytworzonej w zakręcie obręczy przeciwległej półkuli.



Ryc. 9. Grupa III. Wtórne wodogłowie wewnętrzne. 9a. Niesymetryczne obrzmienie konarów mózgu z zaciśnięciem i przemieszczeniem wodociągu oraz przepuklina robaka mózdzku. 9b. Wtórne rozdęcie rogu czołowego komory bocznej półkuli przeciwstronnej do zawału. 9c. Wtórne rozdęcie rogu potylicznego prawej półkuli mózgu. W półkuli lewej zawał pierwotny w obszarze tętnicy środkowej mózgu i martwica wtórnie ukrwotoczniowa w otoczeniu bruzdy ostrogowej. 9d. Zblednięcie mieliny w płacie skroniowym wokół rozdętego wtórnie rogu skroniowego komory bocznej w półkuli przeciwstronnej do zawału. Klüver–Barrera. Pow. lupowe

Fig. 9. Group III. Secondary internal hydrocephalus. 9a. Unsymmetric swelling of cerebral peduncles with compression and displacement of aqueduct and cerebellar vermis hernia. 9b. Secondary dilatation of frontal horn of lateral ventricle of hemisphere contralateral to infarction. 9c. Secondary dilatation of occipital horn of the lateral ventricle of the right hemisphere. Primary infarct in the left hemisphere in area of middle cerebral artery and secondary hemorrhagic necrosis around fissura calcarina. 9d. Myelin pallor in temporal lobe around secondarily dilated lateral ventricle horn of hemisphere contralateral to infarction. Klüver–Barrera. Magn. glass

W 4 przypadkach stwierdzono w tym obszarze rozległe martwice niedokrwienne z pasmami zgąbczeń na obrzeżu (ryc. 8b), z groniastym obrzmieniem i rozpadem osłonek mielinowych, obrzmieniem gleju astrocytarnego wzdłuż przebiegu włóśniczek i zniekształceniem komórek nerwowych w korze ponad krawędzią nisy. W przypadkach współistnienia znacznych przemieszczeń struktur głębokich mózgu i rozległych przepuklin w rejonie wcięcia namiotu mózdzku oraz przemieszczenia i zaciśnięcia wodociągu mózgu, obserwowano rozdęcie komory bocznej półkuli przeciwległej do zawału. Towarzyszyły im wybroczyny oraz spłowienie mieliny w spoidle wielkim, w sklepieniu i w okołokomorowej istocie białej (ryc. 9a–d).

OMÓWIENIE

Wzrost objętości mózgu, w przebiegu rozległego półkulowego zawału i towarzyszącego mu obrzęku, prowadzi do zmian w śródczaszkowych stosunkach topograficznych. Na skutek przemieszczenia mózgu w stosunku do przegród opony twardej i krawędzi podstawy czaszki dochodzi do wystąpienia przepuklin mózgu w tzw. „cieśniach życia” oraz do przesunięcia jego struktur głębokich wraz z zaciśniętym układem komorowym poza linię środkową, co prowadzi do rozwoju wtórnych martwic i krwotoków, komplikujących przebieg pierwotnego zawału mózgu.

W warunkach prawidłowych ciśnienie śródczaszkowe u dorosłego człowieka nie przekracza poziomu 2,2 kPa (20 mm Hg). Przy jego wzroście, zwłaszcza powyżej 5,3 kPa (40 mm Hg) pojawiają się martwice z ucisku w rejonie bruzdy po wgłobieniu haka i zakrętu hipokampa pod namiot mózdzku oraz zakrętu obręczy pod sierp mózgu (Adams, Graham 1976). W badanym materiale obrzęk obejmował obie półkule mózgu, osiągał jednak większe nasilenie w półkuli z zawałem, tak jak wielokrotnie podkreślano w piśmiennictwie (Feigin 1968; Meyer i wsp. 1970; Słąter i wsp. 1977 i inni). Obrzękowo-pochodne uszkodzenia tkanki były najbardziej nasiloné w obszarach wgłobień i przemieszczeń, przy czym zmiany stanowiące następstwo wgłobień tkanki i ucisku naczyń nakładały się na nieprawidłowości spowodowane zarówno istniejącym, jak i przebyłym obrzękiem mózgu. Już w przypadkach bez wgłobień obserwowano wybiórcze martwice neuronów III warstwy kory, komórek Purkinjego oraz komórek piramidowych strefy Sommera hipokampa, szczególnie wrażliwych na niedotlenienie i niedokrwienie (Friede 1966). Ostatnia z wymienionych struktur zasługuje na szczegółowe omówienie ze względu na częstość zmian, jej znaczenie fizjologiczne oraz specyficzne warunki budowy i unaczynienia.

Od klasycznych prac Uchimury (1928), znane były niekorzystne warunki dopływu krwi do strefy Sommera pozbawionej praktycznie krążenia obocznego i narażonej często na niedokrwienie, zwłaszcza w tylnej części zwiniętej w róg, która otrzymuje krew głównie z tętnicy tylnej mózgu poprzez tętnice

strefowe długie. Naczynia te, przebiegające w bocznej części zbiornika okalającego są w przypadkach wgłobień bardziej narażone na ucisk przez krawędź namiotu mózdzku, niż tętnice grzbietowe krótkie doprowadzające krew z tętnicy mózgu tylnej do innych stref warstwy komórek piramidowych hipokampa. W części przedniej rogu Amona warstwa komórek piramidowych ułożona faliście, równolegle do szponów hipokampa, ma nieco lepsze możliwości ukrwienia, chociaż sąsiaduje bezpośrednio z wgłobionym hakiem. Hak jednak i sąsiedni zakręt zębaty otrzymują krew głównie z gałązek tętnicy naczyniówkowej, której liczne anastomozy wzbogacają ukrwienie przedniej części rogu Amona.

Przepukliny w rejonie wcięcia namiotu mogą przemieszczać i zaciskać zarówno naczynia tętnicze, jak i żyłne. Pojawienie się plackowatych ubytków neuronów, charakterystycznych dla strefy Sommera wraz z towarzyszącą im glejową astrocytarną łączy Lindenberg (1968) z zaburzeniami odpływu żylnego. Przepukliny w rejonie wcięcia namiotu mózdzku występowały w naszym materiale najczęściej, bo w 65 przypadkach na 70 przebadanych. Wszystkie te przypadki należały do grup II lub III nasilenia obrzęku. Najczęściej obserwowano wgłobienie haka (65 przypadków), rzadziej także przedniej części zakrętu hipokampa (32 przypadki), a najrzadziej jego tylnej części (14 przypadków). W przypadkach z nasileniem obrzęku mózgu III stopnia obserwowano niekiedy rozległe martwice niedokrwienne, obejmujące całą strukturę amonalną, zwłaszcza gdy oprócz przemieszczenia i ucisku tętnicy tylnej mózgu, w obszarze wgłobienia, widoczne było zwężenie jej światła przez zmiany miażdżycowe.

W ciele migdałowatym unaczynionym przez trzy tętnice: naczyniówkową przednią, mózgu środkową i mózgu tylną (Earle i wsp. 1953; Lindenberg 1968) zmiany wtórne ograniczały się zazwyczaj do ubytków neuronów i zgąbczeń tkanki, mimo bezpośredniego sąsiedztwa z wgłobionym hakiem zakrętu hipokampa.

W obszarach wpuklonych tkanek i w obszarze bruzdy po wgłobieniu stałym objawem było przekrwienie. Występujące w ich obrębie ogniska martwic były zwykle ukrwotocznione, wybroczyny obserwowano wokół żył i włóścików. Stopień uszkodzenia był zróżnicowany: od ogniskowego ubytku neuronów, ze zgąbczeniem podłoża wokół bruzdy z ucisku, do rozległych pól zgąbczeń z wybroczynami i jeziorzami bogatobiałkowego płynu w obrębie przepuklin oraz martwic w obszarze unaczynienia skroniowych i potylicznych gałęzi tętnicy mózgu tylnej, i tętnicy mózdzku górnej krzyżujących się z krawędzią namiotu mózdzku. Obok mozaiki pól zgąbczeń i martwicy skrzepowej obserwowano również obszary licznych drobnych zgąbczeń typu „krople deszczu” van Bogaert’a będących wyrazem mikrowakuolizacji. Obserwowane w tych polach obrzmienie osłonek mielinowych z tworzeniem się „gron”, Zülch (1967) wiąże z obecnością wodniczek w osłonkach. Według Zülcha (1967) obrzęk z przesięciem bogatobiałkowego płynu może spowodować znaczną destrukcję tkanki, nawet w krótkim czasie wówczas, gdy na

pierwotnie obrzękowopochodne uszkodzenia nakładają się zmiany spowodowane niedotlenieniem. Obserwowano również ogniskowe zmiany, których obraz odpowiadał martwicy obrzękowej Jacoba (1940; 1967). Niekiedy w tych obszarach obok wybroczyn z włóściczek i żył, widoczne były różnoczasowe krwawienia z tętnic, o martwiczo zmienionych ścianach.

Struktura przedstawionych zmian i zestawienie ich występowania z topografią i rozległością wgłobień w obszarze wcięcia namiotu pozwala przypuszczać, że w patomechanizmie rozwoju zarówno wgłobień, jak i wtórnych martwic decydujące znaczenie może mieć narastanie różnicy ciśnień pomiędzy przestrzenią nad- i podnamiotową, pogłębione przez zaciśnięcie i blokadę zbiornika okalającego, do którego wpuklają się przepukliny, z naciąganiem i uciskiem przebiegających w nich naczyń tętniczych i żylnych (Cannon 1951; Lindenberg 1955; Dymecki 1967, 1981; Adams, Graham 1976). Podobnym patomechanizmem tłumaczy się występowanie wtórnych krwotoków do pnia mózgu (Kulczycki 1964; Dymecki 1967; Yates 1976; Tarnowska-Dziduszko, Ostrowska 1981) oraz rzadko opisywanych wtórnych ognisk w strukturach głębokich półkul mózgu (Rap, Zaremba 1970; Yates 1976; Okazaki 1983). W badanym materiale najczęściej obserwowano krwotoki do śródmózgowia i mostu. Poza tym występowały one w przemieszczonych bądź uciskanych strukturach: we wzgórzu, podwzgórzu, ciałkach suteczkwatych, i nerwach czaszkowych, zwłaszcza okoruchowych.

Wybiórce umiejscowienie wtórnych krwotoków w jądrach przyśrodkowych wzgórza nasuwa przypuszczenie, że źródłem tych krwawień penetrujących wzdłuż pasm istoty białej, rozdzielających jądra wzgórza może być, obok naczyń żylnych i włóściczek, tętnica wzgórzowo-dziurkowata (*arteria thalamo-perforata*), gałązka tętnicy śródmózgowiowej odchodzącej w dole międzykonarowym od tętnicy mózgu tylnej (Goetzen 1970; Jędrzejewski i wsp. 1984). W naszym materiale wtórne krwotoki uszkadzały wyłącznie przyśrodkowe i śródblaszkowe jądra wzgórza, mające powiązanie z układem limbicznym i z tworem siatkowatym. Dane przytoczone przez Watsona i Heilmana (1979) wskazują, że tak zlokalizowane uszkodzenia wzgórza mogą w razie przeżycia chorego indukować głębokie zaburzenia pamięci. Wtórne uszkodzenia wzgórza występowały w naszym materiale tylko w przypadkach z maksymalnie nasilonym obrzękiem mózgu, z współistniejącymi krwotokami do pnia mózgu, lub istoty białej mózdzku. Obserwowane w tych przypadkach również przepukliny migdałków, a zwłaszcza robaka mózdzku, którego wgłobienie jest charakterystyczne dla procesów zwiększających ciśnienie w tylnej jamie czaszki, nasuwa przypuszczenie, że w tych przypadkach ciśnienie śródczaszkowe wzrosło wtórnym w tylnej jamie czaszki tak znacznie, że przeważało wcześniejszy wzrost ciśnienia w przestrzeni nadnamiotowej.

Przepukliny robaka mózdzku stwierdzono w badanym materiale tylko w 12 przypadkach, wszystkich z III stopniem nasilenia obrzęku mózgu. Znacznie częstsze, ale rzadko rozległe, były wgłobienia migdałków mózdzku do otworu potylicznego wielkiego. Rozległe wgłobienia w tym obszarze, które

występują przy wzroście ciśnienia w tylnej jamie czaszki, mogą być bezpośrednią przyczyną zgonu wskutek ucisku na okolicę złącza opuszkowo-rdzeniowego i zatrzymania oddechu przy zachowanej czynności serca (Okazaki 1983; Miller, Adams 1984). Ogniska wtórnych, zwykle ukrwotoczonych martwic rozwijały się w migdałkach mózdzku, tylko w obszarze rozległych przepuklin. W opuszcze zniekształconej i zanemizowanej przez wklinowane migdałki mózdzku występowały ubytki neuronalne w jądrach nerwów czaszkowych i tworze siatkowatego oraz w oliwach, zaliczanych do struktur szczególnie wrażliwych na niedotlenienie (Brierley, Graham 1984). W śródmózgowiu i moście ogniska wtórnych martwic występowały znacznie rzadziej niż krwotoki. Spotykano je głównie w blaszce czworaczej, rzadziej w odnogach mózgu, w których występowały również po stronie przeciwległej do zawału półkulowego, w wyniku bocznego przemieszczenia mózgu i ucisku przeciwstronnej odnogi przez krawędź namiotu mózdzku w przypadkach rozległych przepuklin zakrętu hipokampa (Kernohan, Woltman 1929).

Przepukliny zakrętu obręczy pod sierp mózgu, znajdowały się na drugim miejscu pod względem częstości występowania. Martwice w ich obszarze były zawsze ukrwotoczne. Do ich powstania mogą przyczyniać się wahania ciśnienia tętniczego krwi, poza miejscem ucisku, na przemieszczone naczynia (Sohn, Levine 1967; Yates 1976). W przypadku znacznych przemieszczeń, tętnic modzelowatych, występowały martwice niedokrwienne w drugiej półkuli mózgu w obrębie niszy powstającej po ucisku przepukliny zakrętu obręczy. Martwice wtórne w przypadkach rozległych przepuklin podsierpowych występowały zatem zarówno w półkuli z zawałem, jak i w półkuli przeciwległej. Berry i Alpers (1957), Sohn i Levine (1967) oraz Feigin (1968) zwracają uwagę na powiększanie się wówczas obszaru martwicy, a Kernohan i Woltman (1929) oraz Adams i Miller (1984) wskazują na pojawianie się drugostronnych klinicznych objawów ubytkowych.

W patomechanizmie powstawania wtórnych martwic w obrębie drugiej półkuli mózgu odgrywa zapewne znaczną rolę rozwój wtórnego wodogłowia wewnętrznego, które obserwowaliśmy we wszystkich przypadkach ze znacznym przemieszczeniem struktur głębokich, a zwłaszcza w przypadkach z wgłobieniami zarówno zakrętu hipokampa, jak i robaka mózdzku, z niesymetrycznym wówczas obrzękiem konarów mózgu i zaciśnięciem oraz przemieszczeniem wodociągu mózgu. Proces ten rozpoczyna się od zwężenia i zaciśnięcia przestrzeni podpajęczynówkowej w rowkach oraz na powierzchni spłaszczonego zakrętów. Wystąpienie wgłobień, zwłaszcza we wcięciu namiotu mózdzku, zwiększa utrudnienie przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego do zbiorników podstawy, a przemieszczenie struktur głębokich może dodatkowo zaciskać otwory pomiędzy komorami i wodociąg mózgu. Prowadzi to do rozdęcia układu komorowego, przede wszystkim komory bocznej półkuli przeciwległej do zawału, a potem i komory III, co przyczynia się do dalszego zwiększenia objętości mózgu i wzrostu ciśnienia śródczaszkowego (Yates 1976; Okazaki 1983).

Na uwagę zasługuje fakt, że wtórne martwice (wybiórcze i bardziej rozległe) uszkadzały często obustronnie zakręty obręczy, sklepienie, hipokampy oraz ciała suteczkowate, a więc struktury należące do układu limbicznego, który ma szczególne znaczenie dla prawidłowej funkcji pamięci i orientacji. Ponadto liczne rozsiane obustronnie ubytki neuronów w korze, zwłaszcza płatów czołowych oraz na różnych poziomach tworzą siatkowatego pnia mózgu, nasuwają przypuszczenie, że zespół zmian tkankowych występujących w przebiegu obrzęku, nazywany encefalopatią obrzękową (Hirano 1980, 1893), może mieć udział w rozwoju zespołu psychoorganicznego po przebytych udarach mózgu.

WNIOSKI

1. W przebiegu obrzęku mózgu towarzyszącego rozległym zawałom półkulowym dochodzi do powstania wgłobień i przemieszczeń tkanki oraz do rozwoju wtórnych uszkodzeń strukturalnych mózgu, mózdzku i pnia mózgowego.

2. Najczęściej występującym wgłobieniem jest przepuklina haka i zakrętu hipokampa pod wcięcie namiotu mózdzku, i większość wtórnych zmian można łączyć z jej wystąpieniem.

3. Zmiany morfologiczne, w strukturach wgłobionych lub uciśniętych i przemieszczonych, mogą mieć charakter ognisk krwotocznych lub martwic o różnym nasileniu: od wybiórczych ubytków neuronalnych, do rozległych zgąbceń istoty białej z ich ewolucją aż do martwicy obrzękowej Jacoba.

4. W przestrzeni nadnamiotowej częściej powstają ogniska wtórnych martwic, w przestrzeni podnamiotowej częściej występują krwotoki, głównie do pnia mózgu.

5. Do najważniejszych czynników patogenetycznych w rozwoju wtórnych zmian morfologicznych w uciśniętych, wgłobionych i przemieszczonych strukturach mózgu należą zaburzenia w ukrwieniu tkanek, wynikające z ucisku i przemieszczenia naczyń tętniczych, uszkodzenia ich ścian i utrudnionego odpływu żylnego oraz rozwój wtórnego wodogłowia wewnętrznego.

6. O rozległości i nasileniu uszkodzeń decyduje, między innymi, specyfika unaczynienia wgłobionego obszaru, nasilenie zmian zwyrodnieniowych w ścianach naczyń warunkujące zakres wyrównywania zaburzeń ukrwienia, jak również stopień wrażliwości tkanki na niedotlenienie i niedokrwienie.

7. Rozległe wtórne zmiany mogą przyczynić się do zwiększenia objętości mózgu oraz obszaru martwicy, do nasilenia uszkodzeń w obrębie drugiej półkuli oraz mogą powodować narastanie ciśnienia śródczaszkowego.

8. Wybiórcze martwice neuronalne występują często obustronnie w strukturach należących do układu limbicznego i tworzą siatkowatego.

9. Zespół zmian tkankowych będących wynikiem obrzęku, przebytych wgłobień i przemieszczeń może mieć udział w rozwoju zespołu psychoorganicznego po przebytych udarach mózgu.

TOPOGRAPHY AND STRUCTURE OF SECONDARY BRAIN LESIONS
IN THE COURSE OF EDEMA ASSOCIATED WITH SUPRATENTORIAL
FOCI OF ENCEPHALOMALACIA

Summary

The paper comprises 70 cases of extensive supratentorial infarctions. The topography and structure of secondary lesions occurring in the region of herniation and displacements caused by the coexisting brain edema were analysed. The extent of edema served as criterion in the division of the material into three groups in dependence on the occurrence of herniations and displacements. Most frequent was herniation of hippocampal uncus and most rare that of the cerebellar vermis. In group I showing no herniations selective necrosis was noted of neurons particularly sensitive to ischemia and anoxia, especially in Sommer's sector of the hippocampus. In group II secondary necrosis was visible in the regions of herniae, and in the group III also in the translocated deep brain structures in the hemisphere contralateral to the infarct and in the brain stem where, moreover, secondary hemorrhages were present. Supratentorial secondary hemorrhages were less frequent. They were noted in the thalamus both on the side of the infarct and in the contralateral hemisphere. Supratentorial necroses were more frequent. Their intensity varied from selective necrosis to Jacob's edematous necrosis. Severe displacement of deep structures and of the brain stem was associated with development of secondary internal hydrocephalus, especially in the hemisphere contralateral to the herniation.

To the most important pathogenetic factors causing development of secondary morphological lesions belong disturbances of blood supply occurring as the result of pressure differences between the supra- and infratentorial space, resulting from pressure and displacement of arterial vessels, damage of their walls and disturbances of venous flow and also development of secondary internal hydrocephalus. Extensive necroses and hemorrhages increase the area of primary necrosis. Lesions resulting from herniation, displacement and compression of vessels were superposed on the picture of brain edema both present or passed. Secondary necroses damaging bilaterally structures belonging to the limbic system and reticular formation may be an additional factor in the development of edematous encephalopathy and the development of a psychoorganic syndrome after stroke.

PIŚMIENICTWO

1. Adams J. H., Graham D. I.: The relationship between ventricular fluid pressure and the neuropathology of raised intracranial pressure. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1976, 2, 322–332.
2. Berry R. G., Alpers B. J.: Occlusion of the carotid circulation. Pathologic consideration. *Neurology*, 1957, 7, 223–237.
3. Brierley J. B., Graham D. I.: Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. W: *Greenfield's neuropathology*. Red.: J. H. Adams, J. A. N. Corsellis, L. W. Duchen. E. Arnold, London, 1984, 125–156.
4. Bromowicz J.: Podnamiotowe wgłobienie w przebiegu guzów mózgu. *Neurol Neurochirurg Pol*, 1953, 2, 137–146.
5. Cannon B. W.: Acute vascular lesions of the brain stem: complication of supratentorial space occupying lesions. *Arch Neurol*, 1951, 66, 687–696.
6. Cohen S. J., Aronson S. M.: Secondary brain stem hemorrhages. Predisposing and modifying factors. *Arch Neurol*, 1968, 19, 257–263.
7. Dymecki J.: Zaburzenia krążenia mózgowego w następstwie wgłobień do otworu w namiocie mózdzku. *Neurol Neurochirurg Pol*, 1967, 1, 309–318.
8. Dymecki J.: Zmiany naczyniopochodne w mózgu. W: *Podstawy neuropatologii*. Red.: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa 1981, 227–244.

9. Earle K. M., Baldwin M., Penfield W.: Incisural sclerosis and temporal lobe seizures produced by hippocampal herniation at birth. *Arch Neurol Psychiatr*, 1953, 69, 27–33.
10. Feigin I.: Intracranial tension and cerebral edema. W: *Pathology of the nervous system*. Red. J. Minckler. McGraw-Hill, New York, 1968, 1, 424–433.
11. Friede R. L.: The histochemical architecture of the Amon horn as related to its selective vulnerability. *Acta Neuropathol*, 1966, 6, 1–13.
12. Friede R. L., Roessmann U.: The pathogenesis of secondary midbrain hemorrhages. *Neurology*, 1966, 16, 1210–1216.
13. Goetzen B.: Unaczynienie wewnętrzne mózgowia człowieka i niektórych zwierząt. W: *Atlas neuropatologiczny*. Red. E. Osetowska. PZWL, Warszawa, 1970, 41–50.
14. Greenwood J.: Acute brain infarctions with high intracranial pressure: surgical indications. *John Hopkins Med J*, 1968, 122, 254–260.
15. Hirano A.: Fine structure of edematous encephalopathy. *Adv Neurol*, 1980, 28, 83–99.
16. Hirano A.: Morphological aspects of brain edema. *Adv Cell Neurobiol*, 1983, 4, 223–247.
17. Jacob H.: Über die diffuse Markdestruktion im Gefolge eines Hirnödems (Diffuse Ödemnekrose des Hemisphärenmarkes). *Z Ges Neurol Psychiatr*, 1940, 168, 382–402.
18. Jacob H.: Course and sequelae of brain edema. W: *Brain edema*. Red. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer, New York, 1967, 117–127.
19. Jędrzejewski J., Gutowska-Maciągowa A., Kałuża J.: Występowanie i topografia krwotoków wzgórza. *Neuropatol Pol*, 1984, 22, 535–547.
20. Kernohan J. W., Woltman H. W.: Incisura of the crus due to contralateral brain tumor. *Arch Neurol Psychiatr*, 1929, 21, 274–287.
21. King A. B.: Massive cerebral infarction producing ventriculographic changes suggesting brain tumor. *J Neurosurg*, 1951, 8, 536–541.
22. Kulczycki J.: Typy i analiza morfologiczna pierwotnych i wtórnych krwotoków do pnia mózgu. *Neuropatol Pol*, 1964, 2, 35–54.
23. Lindenberg R.: Compression of brain arteries as pathogenetic factor for tissue necrosis and their areas of predilection. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1955, 14, 223–243.
24. Lindenberg R.: Patterns of lesions primarily determined by local vascular compressions. W: *Pathology of the nervous system*. Red. J. Minckler. McGraw-Hill, New York, 1968, 2, 1604–1617.
25. Meyer J. S., Schinchara Y., Kandta T.: Diaschisis resulting from acute unilateral cerebral infarction. Quantitative evidence for man. *Arch Neurol*, 1970, 23, 241–247.
26. Miller J. D., Adams J. H.: The pathophysiology of raised intracranial pressure. W: *Greenfield's neuropathology*. Red.: J. H. Adams, J. A. N. Corsellis, L. W. Duchon. E. Arnold, London, 1984, 53–84.
27. Mossakowski M. J.: Obrzęk mózgu. W: *Podstawy neuropatologii*. Red. M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa, 1981, 252–256.
28. Okazaki H.: Cerebral herniations and their secondary vascular effects. Natural history of ischemic cerebral vascular diseases. W: *Fundamentals of neuropathology*. Red. H. Okazaki, Igaku-Shoin, New York, Tokyo, 1983, 46–51; 81–85.
29. Rap Z., Zaremba J.: Patomechanizm wtórnych zmian morfologicznych w układzie podwzgórzowo-przysadkowym w przypadkach wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego. *Neuropatol Pol*, 1970, 8, 399–414.
30. Scarcella G.: Encephalomalacia simulating the clinical and radiological aspects of brain tumor. *J Neurosurg*, 1956, 13, 278–282.
31. Slater R., Reivich M., Goldberg H.: Diaschisis with cerebral infarction. *Stroke*, 1977, 8, 684–690.
32. Sohn D., Levine S.: Frontal lobe infarcts caused by brain herniation. Compression of anterior cerebral artery branches. *Arch Pathol*, 1967, 84, 509–512.
33. Tarnowska-Dziduszko E., Ostrowska D.: Analiza kliniczno-morfologiczna wtórnych krwotoków do pnia mózgu w przebiegu nadnamiotowych ognisk rozmiękania. *Neuropatol Pol*, 1981, 19, 308–321.

34. Uchimura J.: Zur Pathogenese der örtlich elektiven Ammonshornerkrankung. *Z Ges Neurol Psychiatr*, 1928, 114, 567–601.
35. Van Trotsenburg L., Vinken P. J.: Fatal cerebral infarction simulating an acute expanding lesion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1966, 29, 241–243.
36. Watson R. T., Heilman K. M.: Thalamic neglect. *Neurology*, 1979, 29, 690–694.
37. Yates P. O.: Vascular lesions with supratentorial space-occupying lesions. W: *Greenfield's neuropathology*. Red.: W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. E. Arnold, Edinburgh, 1976, 121–124.
38. Zulch K. J.: Neuropathological aspects and histological criteria of brain edema and brain swelling. W: *Brain edema*. Red. I. Klatzo, F. Seitelberger. Springer, New York, 1967, 95–116.

Adres autorki: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

WOJCIECH ROKICKI, MAREK ROKICKI, KAZIMIERZ KAMIŃSKI
BOŻENA PECIAK, EDYTA GĘBSKA

BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD PATOMECHANIZMEM
ENCEFALOPATII WROTNEJ.

I. ZMIANY AKTYWNOŚCI MONOAMINOOKSYDAZY (MAO)
W KORZE MÓZGOWEJ I W MÓZDŻKU SZCZURÓW
PO CHIRURGICZNYM WYTWORZENIU PRZETOKI
WROTNO-CZCZEJ

Katedra i Zakład Biochemii w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice

Jednym z następstw chirurgicznego zespolenia żyły wrotnej z żyłą próżną dolną, jest przeciek krwi wrotnej do krążenia ogólnego, co wywołuje szereg zaburzeń psychicznych określanых mianem encefalopatii wrotnej. Patomechanizm tego schorzenia nie jest całkowicie wyjaśniony. W badaniach doświadczalnych, w wyżej wymienionym problemie, szczury z wykonaną przetoką wrotno-czczą sposobem koniec do boku, stanowią podstawowy model eksperymentalny. Po zespoleniu tego typu powstają zmiany biochemiczne prawie identyczne, jak u ludzi z przewlekłymi schorzeniami wątroby (James i wsp. 1978). Charakteryzują się one, między innymi, zaburzeniami wzorca i poziomu niektórych aminokwasów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Wzrost stężenia aminokwasów aromatycznych w OUN wywołuje szereg zaburzeń w zawartości neuroprzekaźników. Powstające „fałszywe”, względnie nieczynne neuroprzekaźniki (oktopamina, serotonina, tyramina i inne), których prekursorami są aminokwasy aromatyczne, wypierają z zakończeń synaptycznych prawidłowe, endogenne neuroprzekaźniki takie jak, dopamina i noradrenalina oraz dodatkowo hamują syntezę dopaminy (Fisher, Baldessarini 1971; Simert i wsp. 1978; Różga, Szczerbań 1980; Bengtsson i wsp. 1985, 1986). Ten typ zaburzeń metabolicznych stanowi dominujący element w patogenezie zaburzeń mózgowych (Lam, McClain 1973).

Katabolizm amin biogenych dokonuje się głównie na drodze dezaminacji oksydatywnej, a jednym z kluczowych enzymów tej reakcji jest monoaminooksydaza (MAO) - EC 1. 4. 3. 4. Na uwagę zasługuje fakt, że w korze ludzkiego i szczurzego mózgu oraz w mózdku najbardziej wybiórczymi substratami dla

MAO jest 5 hydroksytryptofan, beta-fenyloalanina oraz tyramina (Arai i wsp. 1986; Sullivan, Mc Donnell 1986).

Rozważania powyższe skłoniły nas do przebadania zachowania się aktywności MAO w homogenatach kory i mózdzku szczurów, w różnym czasie po zespoleniu wrotno-czczym. Celem pracy było wykazanie, czy istnieje zależność pomiędzy ewentualnymi zmianami aktywności MAO a czasem jaki upłynął od dnia zabiegu. W założeniach naszych upływający czas miał być miarą narastania zmian metabolicznych w OUN.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczenia użyto 32 szczury szczepu Wistar, samce w wieku 3 miesięcy, o masie ciała 190–200 g. Przez czas eksperymentu zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o temperaturze 21–23°C, wilgotności względnej około 60–70% oraz w cyklu dzień/noc: 12/12 godzin, otrzymując dietę standardową i wodę do woli. Po tygodniu adaptacji do warunków otoczenia zwierzęta podzielono na 4 grupy, po 8 szczurów w każdej. W grupie 1 kontrolnej, w dniu oznaczonym jako dzień „0” w znieczuleniu eterowym wykonywano operację pozorowaną. Zabieg polegał na otwarciu jamy brzusznej z cięcia środkowego, wypreparowaniu żyły wrotnej z otaczających ją tkanek, a następnie założeniu mikrozacisku naczyniowego na żyłę wrotną na 10 minut. Okres 10 minut stanowi średni czas potrzebny do wykonania przetoki wrotno-czczej sposobem koniec do boku u szczura. Po tym czasie zacisk zdejmowano i zamykano jamę brzuszną szwem ciągłym jednowarstwowym. Zwierzętom grup badanych 2, 3, 4 w znieczuleniu eterowym wykonywano przetokę wrotno-czczą sposobem koniec do boku metodą Lee i Fishera (1961). Zespolenie żyły wrotnej z żyłą prózną dolną wykonywano szwem ciągłym Novafil grubości 10/0 firmy Davis and Geck. Dzień zabiegu oznaczano również jako dzień „0”. Wszystkie zabiegi na zwierzętach wykonywano w godzinach przedpołudniowych między 8.00 a 11.00. Szczury zabijano przez dekapitację po 18 godzinnej głodówce w następujących przedziałach czasowych: grupę 2 po 20 dniach, grupę 3 po 40 dniach, a grupę kontrolną i grupę 4 po 60 dniach od zabiegu. Natychmiast po dekapitacji głowy szczurze umieszczano w zamrażarce na okres 20 minut. Po tym czasie zdejmowano skórę wraz z powięzią, otwierano jamę czaszki i po przecięciu nerwów wzrokowych wyjmowano mózgowie na szklaną płytkę umieszczoną w łaźni lodowej (mieszanina lodu z solą kuchenną w proporcji 1:1). Pod kontrolą lupy operacyjnej, usuwano opony mózgowie wraz z naczyniami krwionośnymi, następnie oddzielano mózdzek oraz bardzo dokładnie preparowano korę mózgową, oddzielając ją od reszty mózgowia. Wypreparowane w ten sposób tkanki ważono, umieszczano w ściśle określonej ilości 0,15 M KCl oziębionego do temperatury 0°C i sporządzano ostatecznie 1 % homogenat w homogenizatorze typu Potter-Elvehjem w układzie szkło-teflon przy 2000 obrotów tłoka na minutę, przez okres 3 minut. Całość homogenizacji prowadzono

również w temperaturze 0°C. W tak przygotowanych homogenatach kory mózgowej oraz mózdzku oznaczano aktywność MAO metodą Mc Evena i Hawkinsa (1963), wyrażając ją w nanomolach benzaldehydu na g tkanki. Uzyskane w ten sposób wyniki poddano analizie statystycznej, posługując się testem *t* Studenta, przyjmując za poziom istotności $p < 0,05$. Wyniki obliczeń statystycznych zestawiono w tabelach 1 i 2 oraz przedstawiono graficznie na rycinie 1.

WYNIKI

Analizując zachowanie się aktywności MAO, w homogenatach kory mózgu, uderza systematyczny wzrost jej aktywności do 40 dnia po zabiegu. Po 20 dniach od zespolenia wrotno-czczego aktywność ta była o połowę wyższa niż w grupie kontrolnej, natomiast w 40 dniu już prawie dwukrotnie przekroczyła tę wartość. Przyrost aktywności MAO w 60 dniu był najwyraźniejszy i przekroczył ponad trzykrotnie wartości grupy kontrolnej. Nieco inne spostrzeżenia poczyniliśmy obserwując aktywność enzymu w homogenatach mózdzku. Po pierwszych 20 dniach od zabiegu aktywność enzymu wzrosła ponad dwukrotnie, a w 40 dniu była trzykrotnie wyższa w stosunku do wartości grupy kontrolnej. Narastanie zmian aktywności MAO między 40 a 60 dniem po operacji było wolniejsze i pod koniec eksperymentu przekroczyło ponad dwukrotnie wartości grupy kontrolnej (tab. 1).

Wyniki przedstawione w tabeli 2 porównują zmiany aktywności MAO, w korze mózgu i w mózdzku, pomiędzy grupami zwierząt z wykonanym zespoleniem wrotno-czczym. Różnice w aktywności enzymu w korze mózgowej między 20 a 40 dniem były mniejsze niż między 20 a 60 dniem po zabiegu. Największy przyrost aktywności MAO obserwowano między 40 a 60 dniem po operacji. Inaczej prezentują się wyniki oznaczeń aktywności MAO w homogenatach mózdzku. Największe przyrosty aktywności obserwowano między 20 a 40 oraz 20 a 60 dniem po zabiegu. Różnice w aktywności tego enzymu pomiędzy grupą z 40 a 60 dniowym przeżyciem po operacji były niskie i nie mieściły się w granicach znamienności statystycznej.

Zmiany aktywności MAO, w korze mózgu i mózdzku szczurów, po zespoleniu wrotno-czczym narastają podobnie do 20 doby po zabiegu i dopiero po tym czasie występują wyraźne różnice w aktywności tego enzymu pomiędzy tymi dwiema strukturami (ryc. 1).

OMÓWIENIE

Przyczyn encefalopatii wrotnej u operowanych zwierząt należy upatrywać głównie w przecieku żylnym krwi wrotnej do krążenia ogólnego oraz w następowym upośledzeniu czynności metabolicznych wątroby. Mając na uwadze niedostateczny katabolizm związków neurotoksycznych takich jak: amoniak, aminokwasy aromatyczne, aminy biogenne czy metionina (Cascino i wsp. 1978;

Tabela 1. Aktywności MAO w homogenatach kory mózgu i mózdzku w 20, 40, 60 dobie po zespoleniu wrotno-cieczym (PCS) sposobem koniec do boku
Table 1. MAO activities in homogenates of cerebral cortex and cerebellum 20, 40 and 60 days after end to side portacaval shunt (PCS)

Tkanka Tissue	Grupa kontrolna Control group (1)	Czas przeżycia po PCS Survival time after PCS			Różnice między średnimi i znamienność Differences and significance between control and experimental groups					
		20 dni days (2)	40 dni days (3)	60 dni days (4)	1 - 2	t	1 - 3	t	1 - 4	t
Kora mózgu Cerebral cortex	2,67 ± 0,61	3,91 ± 0,55	4,72 ± 0,82	9,38 ± 0,21	1,24	++++	2,05	++++	6,71	++++
Mózdzek Cerebellum	2,21 ± 0,46	4,07 ± 0,77	6,56 ± 1,66	7,27 ± 1,03	1,86	++++	4,35	++++	5,06	++++

Wartości podano jako średnie badanych grup (nM/g tkanki) ± odchylenie standardowe. Każda grupa liczyła 8 szczurów.

Values are means (nM/g tissue) ± SD. Number of animals in each group 8.

n. s. — nieznamienne

n. s. — non significant

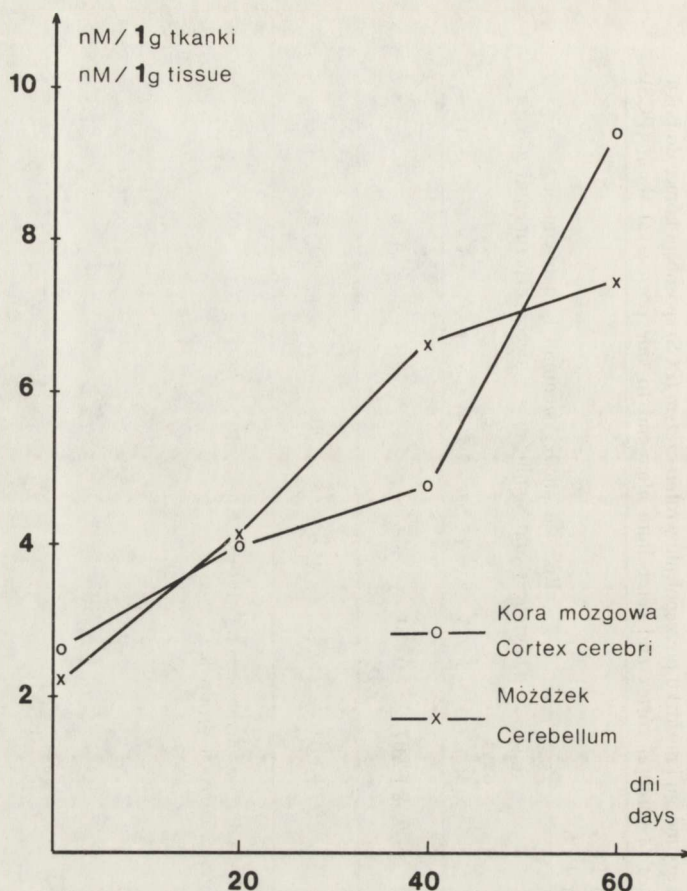
p < 0,001 - +++++

Tabela 2. Porównanie aktywności MAO w homogenatach kory mózgu i mózdzku po zespoleniu wrotno-czczym (PCS) sposobem koniec do boku
 Table 2. Comparison of MAO activities in homogenates of cerebral cortex and cerebellum after end to side portacaval shunt (PCS)

Tkanka Tissue	Czas przeżycia po PCS Survival time after PCS			Różnice między średnimi i znamienność Differences and significance between experimental groups					
	20 dni days	40 dni days	60 dni days	2 - 3	t	2 - 4	t	3 - 4	t
	(2)	(3)	(4)						
Kora mózgu Cerebral cortex	3,91 ± 0,551	4,72 ± 0,822	9,38 ± 2,07	0,810	++	5,47	++++	4,66	++++
Mózdzek Cerebellum	4,07 ± 0,770	6,56 ± 1,66	7,27 ± 1,03	2,49	+++	3,20	++++	0,710	n. s.

Wartości podano jako średnie badanych grup (nM/g tkanki) ± odchylenie standardowe. Każda grupa liczyła 8 szczurów.
 Values are means (nM/g tissue) ± SD. Number of animals in each group 8.

n. s. — nieznamienne
 n. s. — non significant
 p < 0,02 - ++
 p < 0,01 - +++
 p < 0,001 - ++++



Ryc. 1. Aktywność MAO w homogenatach mózgu i mózdzku szczura po zespoleniu wrotno-czczym sposobem koniec do boku

Fig. 1. MAO activity in homogenates of brain cortex and cerebellum after end to side portacaval shunt

James i wsp. 1979; Ehrlich i wsp. 1980; Yuzo i wsp. 1981). Badania różnych regionów mózgu szczurzego potwierdziły wybitne zwiększenie ilości nieczynnych neuromediatorów po zespoleniu wrotno-czczym sposobem koniec do boku (Mans i wsp. 1984; Mans, Hawkins. 1986; Mans i wsp. 1987). Najbardziej charakterystyczne dla encefalopatii zmiany metaboliczne, cytowani autorzy obserwowali około 5 tygodnia po wykonanym zespoleniu. Wybrane przez nas przedziały czasowe badań celowo objęły ten i następny po nim czas. Jednocześnie było wiadome, że najbardziej selektywnymi substratami dla MAO pochodzącej z kory mózgu i mózdzku szczura są właśnie 5-hydroksytryptofan, beta-fenylalanina oraz tyramina (Arai i wsp. 1986; Sullivan, Mc Donnell.

1986), a więc „fałszywe”, względnie nieczynne neuroprzekazniki, którym przypisuje się zasadniczą rolę w powstawaniu encefalopatii wrotnej. Dodatkową zachętą do podjęcia naszych badań były spostrzeżenia Bengtssona i wsp. (1985, 1986), którzy już od pierwszej doby po zabiegu, w większości struktur mózgu szczura, obserwowali wzrost magazynowania 5-hydroksytryptofanu, połączony ze wzrostem aktywności hydroksylazy tryptofanowej. Opisywane zmiany były najwyraźniejsze w korze mózgu i śródmózgowiu. Liczne prace odnoszące zmiany poziomu określonych amin w poszczególnych strukturach mózgu do uwarunkowań behavioralnych (Björklund i wsp. 1973; Tricklebank i wsp. 1981; Martin i wsp. 1983) i równocześnie całkowity brak w dostępnym nam piśmiennictwie doniesień o enzymach degradujących te aminy skłoniły nas do przebadania tego problemu. Teoretycznie zakładany przez nas wzrost poziomu amin, w badanych strukturach mózgu, miał stymulować wzrost aktywności MAO odpowiedzialnej za ich degradację na zasadzie aktywowania enzymu przez zwiększenie poziomu substratu. Nie mamy bezpośrednich dowodów na podwyższenie poziomu tych amin w korze mózgu i w mózdzku szczurów, ale na podstawie prac Mansa i wsp. (1986, 1987), można przyjąć powyższe dane za wysoce prawdopodobne. Śledzenie dynamiki zmian enzymatycznych pozwoliło nam monitorować wzrastającą aktywność enzymu w miarę upływu czasu od wytworzenia przetoki wrotno-czczej. W świetle powyższych danych wydaje się, że najbardziej realną przyczyną wzrostu aktywności MAO był podwyższony poziom amin, wybiórczych substratów tego enzymu. Różnice w narastaniu zmian aktywności MAO między korą mózgową a mózdzkiem trudne są do wyjaśnienia, warto jednak zaznaczyć, że istnieją również wyraźne różnice w narastaniu zmian anatomopatologicznych między tymi dwiema strukturami po zespoleniu wrotno-czczym (Kyu, Cavanagh 1970; Mossakowski i wsp. 1977). U podłoża tych zmian leżą prawdopodobnie poważne zaburzenia metaboliczne. Wyniki naszych badań jednoznacznie wykazały, że po zespoleniu wrotno-czczym sposobem koniec do boku dochodzi do zmian aktywności MAO, jednego z enzymów odpowiedzialnych za degradację amin biogennych w OUN.

WNIOSKI

1. Chirurgiczne wytworzenie przetoki wrotno-czczej inicjuje wzrost aktywności MAO w korze mózgu i w mózdzku szczurów.
2. Wzrost aktywności MAO w obydwu badanych tkankach koreluje z czasem, jaki upłynął od wykonania przetoki.
3. Istnieją wyraźne różnice w narastaniu zmian aktywności badanego enzymu pomiedzy tymi dwiema tkankami.

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON THE PATHOMECHANISM
OF PORTAL ENCEPHALOPATHY.

I. ACTIVITY OF MONOAMINE OXIDASE (MAO) IN BRAIN CORTEX
AND CEREBELLUM OF RATS AFTER PORTACAVAL SHUNT.

Summary

Rats with portacaval shunt (PCS) were used as a model of hepatic encephalopathy and compared to sham operated controls. Neurochemical studies in rats have demonstrated increased activity of MAO in brain cortex and cerebellum at 20, 40 and 60 days after surgery. The greatest increase of MAO activity was seen 60 days after PCS.

PIŚMIENICTWO

1. Arai R., Kimura H., Maeda T.: Topographic atlas of monoamine oxidase-containing neurons in the rat brain studied by an improved histochemical method. *Biochem Pharmacol*, 1986, 35, 3255–3260.
2. Bengtsson F., Gage F. H., Jeppsson A., Nobin A., Rosengreen E.: Brain monoamine metabolism and behavior in portacaval-shunted rats. *Exp Neurol*, 1985, 90, 21–35.
3. Bengtsson F., Nobin A., Falck B., Gage F. H., Jeppsson B.: Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*, 1986, 24, 1611–1616.
4. Björklund A., Nobin A., Stenevi U.: The use of neurotoxic dihydroksytryptamines as tools for morphological studies and localized lesioning of central indolamine neurons. *Z Zellforsch*, 1973, 145, 479–501.
5. Cascino A., Cangiano C., Calcaterra V., Rossi-Fanelli F., Capocaccia L.: Plasma amino acid imbalance in patients with liver disease. *Am J Dig Dis*, 1978, 23, 591–598.
6. Ehrlich M., Plum F., Duffy T. E.: Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia loading. *J Neurochem*, 1980, 34, 1538–1542.
7. Fisher J. E., Baldessarini R. J.: False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet*, 1971, 2, 75–80.
8. James J. H., Escourrou J., Fisher J. E.: Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science*, 1978, 200, 1395–1397.
9. James J. H., Jeppsson B., Zipara V., Fisher J. E.: Hyperammonemia, plasma amino acid imbalance, and blood-brain amino acid transport: a unified theory of portal-systemic encephalopathy. *Lancet*, 1979, 772–775.
10. Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rat. *Br Exp Pathol*, 1970, 51, 217–227.
11. Lam K. C., Mc Clain C. J.: Role of a false neurotransmitter octopamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Scand J Gastroenterol*, 1973, 8, 465–472.
12. Lee S. H., Fisher B.: Portacaval shunt in the rat. *Surgery*, 1961, 50, 668–670.
13. Mans A. M., Biebuyck J. F., Davis D. V., Hawkins R. A.: Portacaval anastomosis: brain and plasma metabolic abnormalities and the effect of nutritional therapy. *J Neurochem*, 1984, 43, 697–705.
14. Mans A. M., Hawkins R. A.: Brain monoamines after portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Dis*, 1986, 1, 45–52.
15. Mans A. M., Consevage M. W., De Joseph M. R., Hawkins R. A.: Regional brain monoamines and their metabolites after portacaval shunting. *Metabolic Brain Dis*, 1987, 2, 183–193.
16. Martin J. R., Dedek J., Driscoll P.: Portacaval anastomosis in rats: effects on behavior and brain serotonin metabolism. *Pharmacol Biochem Behav*, 1983, 18, 269–272.

17. Mc Even M. Jr., Hawkins R. A.: An amine oxidase in normal human serum. *J Lab Clin Med*, 1963, 62, 766–776.
18. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Rózga J., Paluszkiewicz R.: Wpływ alfa-oksoglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. *Neuropatol Pol*, 1977, XV, 3, 317–325.
19. Rózga J., Szczerbań J.: Encefalopatia wątrobowa. *Pol Tyg Lek*, 1980, XXXV, 4, 117–120.
20. Simert G., Nobin A., Rosengreen E., Vang J.: Neurotransmitter changes in the rat brain after portacaval anastomosis. *Eur Surg Res*, 1978, 10, 73–85.
21. Sullivan J. P., Mc Donnell L.: The oxidation of tryptamine by two forms of monoamine oxidase in human tissues. *Biochem Pharmacol*, 1986, 35, 3255–3260.
22. Tricklebank M. D., Bloxam D. L., Kontamaneui B. D., Curzon G.: Brain 5 hydroksytryptamine metabolism after portacaval anastomosis: relationship with ambulation. *Pharmacol Biochem Behav*, 1981, 14, 259–262.
23. Yuzo S., Eriksson S., Hagenfeldt L., Wahren J.: Influence of branched-chain amino acids in patients with hepatic cirrhosis. *Clin Physiol*, 1981, 1, 151–165.

Adres autorów: Katedra i Zakład Biochemii Śl. AM, ul. K. Marksa 19, 41-808 Zabrze 8.

MAREK ROKICKI, WOJCIECH ROKICKI, ROMAN TARNAWSKI,
EDYTA GĘBSKA, BOŻENA PECIAK

BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD PATOMECHANIZMEM ENCEFALOPATII WROTNEJ.

II. ZACHOWANIE SIĘ AKTYWNOŚCI MONOAMINOOKSYDAZY (MAO) W TKANCIE NERWOWEJ SZCZURÓW PO DWÓCH RÓŻNYCH SPOSOBACH ZESPOLENIA ŻYŁY WROTNEJ Z ŻYŁĄ PRÓŻNĄ DOLNĄ

Katedra i Zakład Biochemii w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice

Zespolenie żyły śledzionowej z żyłą nerkową, a wkrótce potem żyły wrotnej z żyłą próżną dolną zapoczątkowało erę chirurgicznego leczenia nadciśnienia w przebiegu marskości wątroby (Whipple 1945). Zabiegi chirurgiczne obniżają ciśnienie wrotne, usuwają groźbę śmiertelnego krwotoku z żyłaków przetyku, ale w blisko połowie przypadków występują powikłania pod postacią encefalopatii wrotnej (Nielubowicz i wsp. 1978). Chirurgiczne połączenie żyły wrotnej z żyłą próżną dolną wykonuje się najczęściej sposobem koniec do boku, techniką zapoczątkowaną przez Whiple'a (1945), względnie metodą bok do boku zaproponowaną przez Mariona i wsp. (1979). Pierwszy sposób całkowicie ogranicza dopływ krwi trzewnej wraz z substancjami odżywczymi do wątroby, w drugim przypadku dopływ ten jest ograniczony częściowo. Wiadomo, że przyczyn encefalopatii wrotnej należy upatrywać głównie w przecieku żylnym krwi wrotnej do krążenia ogólnego oraz w upośledzeniu czynności detoksykacyjnych wątroby w wyniku postępujących zmian marskich. W badaniach doświadczalnych łatwo jest wyeliminować postępujące zmiany marskie wątroby, przez użycie do tych badań zdrowych zwierząt. Również sam przeciek żylny można regulować przez całkowite, względnie częściowe ograniczenie dopływu krwi wrotnej do wątroby wykonując dwa różne zespolenia wrotno-czeczne.

Wyniki badań przedstawione w poprzednim naszym doniesieniu (Rokicki i wsp. 1989) wykazały postępujący w miarę upływu czasu wzrost aktywności monoaminooksydazy w korze mózgowej i mózdzku szczurów po zespoleniu wrotno-czczym, sposobem koniec do boku. Celem obecnej pracy jest znalezienie odpowiedzi na pytanie „Czy rodzaj zespolenia wrotno-czczego, a więc czy

częściowy lub całkowity przeciek krwi wrotnej (omijającej częściowo lub całkowicie wątrobę) do krążenia ogólnego będzie miał wpływ na aktywność tego enzymu w korze mózgowej i mózdku szczurów”?

MATERIAŁ I METODY

Grupę kontrolną oraz grupy zwierząt z zespoleniem wrotno-czczym sposobem koniec do boku stanowiły szczury użyte w poprzednim doświadczeniu (Rokicki i wsp. 1989). Dodatkowe 3 grupy doświadczalne stanowiły 24 szczury sparowane z poprzednimi pod względem ilości w tych grupach oraz masy ciała, wieku i warunków hodowlanych. Szczurom tym wykonywano zespolenie wrotno-czcze sposobem bok do boku, metodą opracowaną w naszym Zakładzie. W znieczuleniu eterowym otwierano zwierzęciu jamę brzuszną cięciem środkowym. Po przemieszczeniu jelit na lewą stronę preparowano z otaczających tkanek żyłę próżną dolną od wysokości prawej żyły nerkowej do miejsca jej zetknięcia z mięszem wątrobowym oraz żyłę wrotną od wysokości żyły odźwiernikowej aż do żyły trzustkowej. Na tak wypreparowane żyły zakładano przewiązki jedwabne grubości 2/0, które lekko zaciągano, przez co ograniczano odpływ i dopływ krwi do obu tych żył. Następnie przez pociąganie przewiązek zbliżano obie żyły do siebie tak, aby stykały się ze sobą. Kaliber żyły próżnej dolnej i odległość pomiędzy żyłą odźwiernikową a trzustkową wyznaczały wielkość zespolenia. Po wycięciu, zaokrąglonymi nożyczkami, otworu w żyłę próżnej dolnej i podłużnym przecięciu między obu przewiązkami żyły wrotnej, dokładnie wypłukiwano 0.9% NaCl skrzepy z żył, a następnie wykonywano zespolenie żyłno-żyłne jednowarstwowym, ciągłym szwem naczyniowym stosując nici Novafil 10/0 firmy Davis and Geck. Po wykonaniu zespolenia kontrolowano krwawienie, odpowiednio układano trzewia w jamie brzusznej, którą zamykano szwem jednowarstwowym. Zwierzęta zabijano po 20, 40 i 60 dniach od zabiegu operacyjnego, a w wyizolowanej korze mózgowej i mózdku oznaczano aktywność monoaminoooksydazy (MAO), omówioną w poprzednim doniesieniu metodą. Uzyskane wyniki doświadczeń poddano analizie statystycznej testem *t* Studenta przyjmując za poziom istotności $p < 0,05$. Wyniki obliczeń statystycznych przedstawiono w tabeli 1 oraz porównano z wynikami uzyskanymi w poprzednim doniesieniu w tabelach 2 i 3 i przedstawiono graficznie na rycinie 1.

WYNIKI

Aktywność MAO, w korze mózgowej szczurów po zespoleniu wrotno-czczym sposobem bok do boku na tle wartości grupy kontrolnej, wykazuje cechy fazowości. Po pierwszych 20 dniach od zabiegu obserwowano znamienny wzrost aktywności, potem w 40 dniu powrót do wartości zbliżonych do grupy kontrolnej, by pod koniec eksperymentu stwierdzić ponowny wzrost aktywności enzymatycznej do wartości nieco wyższych niż stwierdzone w 20 dniu po zabiegu. Równolegle aktywność enzymu w homogenatach mózdz-

Tabela 1. Aktywności MAO w homogenatach kory mózgu i mózdzku w 20, 40 i 60 dobie po zespoleniu wrotno-czczym (PCS) sposobem bok do boku
 Table 1. MAO activities in homogenates of cerebral cortex and in cerebellum on 20, 40 and 60 days after side to side portacaval shunt (PCS)

Tkanka Tissue	Grupa kontrolna Control group (1)	Czas przeżycia po PCS Survival time after PCS			Różnice między średnimi i znamienność Differences and significance between control and experimental groups					
		20 dni days (2)	40 dni days (3)	60 dni days (4)	1 - 2	t	1 - 3	t	1 - 4	t
Kora mózgu Cerebral cortex	2,67 ± 0,61	4,27 ± 0,79	3,20 ± 0,65	4,48 ± 0,99	1,60	++++	0,530	n. s.	1,97	++++
Mózdzek Cerebellum	2,21 ± 0,46	2,61 ± 0,80	2,51 ± 0,88	3,47 ± 0,69	0,400	n. s.	0,300	n. s.	1,26	++++

Wartości podano jako średnie badanych grup (nM/g tkanki) ± odchylenie standardowe. Każda grupa liczyła 8 szczurów.

Values are means (nM/g tissue) ± SD. Number of animals in each group 8.

n. s. – nieznamienne

n. s. – non significant

p < 0,001 - + + + +

Tabela 2. Porównanie aktywności MAO w homogenatach kory mózgu po zespoleniu wrotno-czczym (PCS) sposobem koniec do boku i sposobem bok do boku

Table 2. Comparison of MAO activities in homogenates of cerebral cortex after end to side and side to side portacaval shunt (PCS)

Rodzaj zespolenia Type of anastomosis	Czas przeżycia po PCS Survival time after PCS		
	20 dni days	40 dni days	60 dni days
Koniec do boku End to side	3,91 ± 0,551	4,72 ± 0,822	9,38 ± 2,07
Bok do boku Side to side	4,27 ± 0,790	3,20 ± 0,654	4,48 ± 0,992
Różnica Difference	0,36	1,52	4,90
Znamienność Significance	n. s.	+++	++++

Wartości podano jako średnie badanych grup (nM/g tkanki) ± odchylenie standardowe. Każda grupa liczyła 8 szczurów.

Value are means (nM/g tissue) ± SD. Number of animals in each group 8.

p < 0.01 - +++

p < 0.001 - ++++

Tabela 3. Porównanie aktywności MAO w homogenatach mózdzku po zespoleniu wrotno-czczym (PCS) sposobem koniec do boku i sposobem bok do boku

Table 3. Comparison of MAO activities in homogenates of cerebellum after end to side and side to side portacaval shunt (PCS)

Rodzaj zespolenia Type of anastomosis	Czas przeżycia po PCS Survival time after PCS		
	20 dni days	40 dni days	60 dni days
Koniec do boku End to side	4,07 ± 0,770	6,56 ± 1,66	7,27 ± 1,03
Bok do boku Side to side	2,61 ± 0,806	2,51 ± 0,876	3,47 ± 0,692
Różnica Difference	1,46	4,05	3,80
Znamienność Significance	t +++	++++	++++

Wartości podano jako średnie badanych grup (nM/g tkanki) ± odchylenie standardowe. Każda grupa liczyła 8 szczurów.

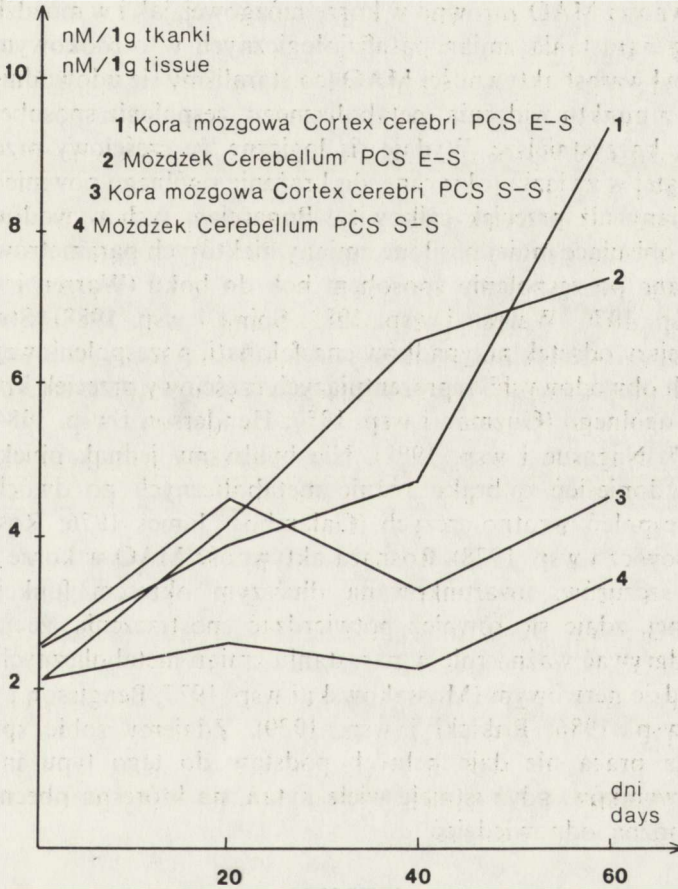
Value are means (nM/g tissue) ± SD. Number of animals in each group 8.

p < 0.01 - +++

p < 0.001 - ++++

kowych narastała znacznie wolniej i do 40 dnia od zespolenia nie stwierdzano zmian statystycznie znamiennej w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w 60 dniu od zabiegu przyrost aktywności MAO był już wysoce znamienny (tab. 1).

Bardzo ciekawie przedstawiają się dynamicznie śledzone, w czasie, porównania aktywności MAO kory mózgowej szczurów po dwóch różnych sposobach zespolenia wrotno-czczego. Po 20 dniach od zabiegu wzrost aktywności enzymu w obu grupach był prawie identyczny. Wyraźne różnice obserwowano dopiero od 40 dnia po operacji. Po zespoleniu sposobem koniec do boku stwierdzano wzrost aktywności MAO, podczas gdy po zespoleniu sposobem bok do boku spadek aktywności enzymatycznej. W 60 dniu obserwacji różnice w aktywnościach enzymu pomiędzy porównywanymi grupami były znaczne. Wzrost aktywności MAO w grupie zwierząt po zespoleniu sposobem bok do boku był znacznie mniejszy niż w grupie po zespoleniu koniec do boku (tab. 2).



Ryc. 1. Aktywność MAO w korze mózgowej i w móźdżku po dwóch różnych sposobach zespolenia wrotno-czczego

Fig. 1. MAO activity in homogenates of brain cortex and cerebellum after two different portacaval shunts

Różnice w aktywności MAO, w mózdku szczurów porównywanych grup, były statystycznie znamienne już w 20 dniu po operacji, jeszcze znaczniejsze po 40 dniach i bardzo zbliżone do nich w 60 dniu obserwacji. Różnice te spowodowane były znacznie większym przyrostem aktywności MAO po zespoleniu sposobem koniec do boku, niż w przypadku zespolenia bok do boku (tab. 3).

Przedstawione graficznie dane z tabel 1, 2 i 3 wyraźnie uwidaczniają różnice we wzroście aktywności MAO w korze mózgowej i mózdku szczurów w zależności od sposobu zespolenia oraz czasu trwania doświadczenia (ryc. 1).

OMÓWIENIE

Zaobserwowano, że zespolenie wrotno-czcze sposobem koniec do boku powodujące całkowity przeciek krwi wrotnej do krążenia dużego, dają w porównaniu do zespolenia wrotno-czcze sposobem bok do boku, znacznie większy wzrost aktywności MAO zarówno w korze mózgowej, jak i w mózdku. Gdyby jedną z miar narastania zmian patofizjologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym był wzrost aktywności MAO (co staraliśmy się udowodnić w I części pracy), to z punktu widzenia metabolicznego, zespolenie sposobem bok do boku byłoby korzystniejsze. Wydaje się logiczne, że częściowy przeciek krwi wrotnej, bogatej w związki toksyczne, do krążenia ogólnego powinien wywołać mniejsze zmiany niż przeciek całkowity. Poparciem tych wywodów są dane literaturowe opisujące mniej nasilone zmiany niektórych parametrów surowicy krwi oznaczane po zespoleniu sposobem bok do boku (Warren i wsp. 1967; Marion i wsp. 1979; Warren i wsp. 1982; Spina i wsp. 1988). Stwierdzono, również mniejszy odsetek przypadków encefalopatii pozespoleniowej przy tzw. „zespoleniach obwodowych” reprezentujących częściowy przeciek krwi wrotnej do krążenia ogólnego (Guzman i wsp. 1977; Henderson i wsp. 1984; Balique, Lemeur 1987; Nagasue i wsp. 1987). Nie byłibyśmy jednak obiektywni nie przytaczając doniesień o braku różnic metabolicznych po dwóch różnych sposobach zespolenia wrotno-czczych (Galambos, James 1976; Rosen i wsp. 1977; Nielubowicz i wsp. 1978). Rosnąca aktywność MAO w korze mózgowej i mózdku szczurów, uwarunkowana dłuższym okresem funkcjonowania przetoki żyłnej, zdaje się również potwierdzać spostrzeżenia, że upływający czas może odgrywać ważną rolę w narastaniu zmian metabolicznych w ośrodkowym układzie nerwowym (Mossakowski i wsp. 1977; Bengtsson i wsp. 1985; de Boer i wsp. 1986; Rokicki i wsp. 1989). Zdajemy sobie sprawę, że prezentowana praca nie daje pełnych podstaw do tego typu interpretacji uzyskanych wyników, gdyż istnieje wiele pytań, na które na obecnym etapie badań nie można odpowiedzieć.

WNIOSKI

1. Sposób zespolenia wrotno-czcze rzutuje na wzrost aktywności MAO w korze mózgu i w mózdku szczurów.

2. Wzrost aktywności MAO koreluje z czasem jaki upłynął od zabiegu.

3. Największe różnice w przyroście aktywności badanego enzymu obserwowano w 60 dniu po zabiegu, niezależnie od rodzaju analizowanych struktur mózgowych, uwzględniając jedynie sposób zespolenia.

EXSPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON THE PATHOMECHANISM OF PORTAL ENCEPHALOPATHY.

II. ACTIVITY OF MONOAMINE OXIDASE (MAO) IN RAT BRAIN AFTER TWO DIFFERENT METHODS OF PORTACAVAL SHUNT

Summary

The authors present effect of the end to side portacaval shunt (E-S PCS) and side to side portacaval shunt (S-S PCS) on monoamine oxidase (MAO) activity in brain cortex and cerebellum of rats. There were significant differences between two experimental models of PCS. Our results show greater increase in MAO activity after end to side portacaval shunt.

PIŚMIENNICTWO

- Balique J. G., Lemeur P.: \bar{L} anastomose porto-cave latero-laterale calibre. *Presse Med*, 1987, 16, 1695–1698.
- Bengtsson F., Gage F. H., Jeppsson B., Nobin A., Rosengreen E.: Brain monoamine metabolism and behavior in portacaval-shunted rats. *Exp Neurol*, 1985, 90, 21–35.
- de Boer J. E., Davis J. N., Curzon G.: Sequential metabolic characteristics following portacaval shunt in rats. *Eur Surg Res*, 1986, 18, 96–106.
- Galambos J. T., James J. H.: Selective and total shunts in the treatment of bleeding varices. *New Engl J Med*, 1976, 295, 1089–1093.
- Guzman I. J., Coyle J. J., Schneider P. D., Varco R. L., Buchwald H.: The effect of selective visceral caval shunt on plasma lipids and cholesterol dynamics. *Surgery*, 1977, 82, 42–50.
- Henderson J. M., Millikan W. J., Warren W. D.: The distal splenorenal shunt: an update. *World J Surg*, 1984, 8, 722–732.
- Marion P., George M., Vacca C., Vadot L.: \bar{L} anastomose porto-cave latero-laterale a debit minimum regle pour cirrhosis hemorragique. *Lyon Chir*, 1979, 75, 235–243.
- Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Rózga J., Paluszkiwicz R.: Wpływ alfa-oksoglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. *Neuropatol Pol*, 1977, 15, 317–325.
- Nagasue N., Ogawa Y., Yukaya H., Chang Y. CH., Nakamura T.: Clinical comparison between original and modified distal spleno-renal shunts. *Surgery*, 1987, 101, 661–667.
- Nielubowicz J., Szczerbań J., Michałowicz B., Baranowski H., Rózga J., Stobnicki M., Frunze S.: Wyniki chirurgicznego leczenia nadciśnienia wrotnego. *Pol Przegl Chir*, 1978, 50, 551–556.
- Rokicki W., Rokicki M., Kamiński K., Peciak E., Gębska E.: Badania doświadczalne nad patomechanizmem encefalopatii wrotnej. Cz. I Zmiany aktywności monoaminooksydazy (MAO) w korze mózgowej i mózdzku szczurów po chirurgicznym wytworzeniu przetoki wrotno-czczej. *Neuropatol Pol*, 1989, 27 (w druku).
- Rosen H. M., Soeters P. B., James J. J., Hodgman J., Fisher J. E.: Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of different etiology. *Gastroenterology*, 1977, 72, 483–487.
- Spina G., Santambrogio R., Opocher E., Galeotti F., Cucchiari G., Strinna M., Pezzuoli G.: Improved quality of life after distal splenorenal shunt: A prospective comparison with side to side portacaval shunt. *An Surg*, 1988, 208, 104–110.

14. Warren W. D., Zeppa R., Fomon J. J.: Selective transsplenic decompression of gastroesophageal varices by distal splenorenal shunt. *An Surg*, 1967, 166, 437–455.
15. Warren W. D., Millikan W. J., Henderson J. M., Wright L., Kutner M., Smith R. B., Fulemoider J. T., Salam A. A., Galambos J. T.: Ten years portal hypertensive surgery at emory. Results and new perspectives. *An Surg*, 1982, 195, 530–542.
16. Whipple A. O.: The problem of portal hypertension in relation to hepatosplenopathies. *Ann Surg*, 1945, 122, 449–453.

Adres autorów: Katedra i Zakład Biochemii Śl. AM, ul. K. Marksa 19, 41-808 Zabrze 8.

KRYSTYNA RENKAWEK¹, EWA MATYJA¹,
ELŻBIETA KIDA¹, WŁODZIMIERZ KURAN²

MORPHOLOGICAL STUDY ON STRIATUM AND CEREBELLUM CULTURES EXPOSED TO KAINIC ACID AND KAINIC ACID AND TIAPRIDE TREATMENT

¹Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw,
²I Department of Neurology, Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw

Kainic acid (KA), a rigid analog of glutamate with potent neuroexcitatory and neurotoxic property, has been largely elaborated in various experimental models by administration to different brain areas (McGeer et al. 1978b). Its toxic effect, inducing similar neuropathological changes in the striatum to that occurring in the brain of patients with Huntington's disease, was tested in an animal model of this degenerative disorder (Coyle, Schwarcz 1976; McGeer, McGeer 1976; Mason, Fibiger 1978, 1979). The etiology of Huntington's disease as well as effective therapy remain unknown. Recently Tiapride (N-) diethyl-aminoethyl (-2-methoxy-5-methyl-sulphonyl-benzamide hydrochloride) has been employed in a variety of dyskinesias including Huntington's chorea, because of its beneficial effect on involuntary movements (Price et al. 1978; Buruma et al. 1982; Ross et al. 1982).

Our previous results *in vitro* showed that KA induced morphological changes in glial cells and in some kinds of neurons (Matyja, Renkawek 1982; Renkawek et al. 1982). These results suggested that there is some similarity between *in vitro* and *in vivo* alterations providing a useful animal model of Huntington's disease. The present study was undertaken to compare the ultrastructural changes obtained after KA and KA/Tiapride administration to the cerebellum and striatum cultures. The purpose of this study was to determine the effect of Tiapride on the neuron and glia structure in cultures which had been submitted to KA treatment.

MATERIAL AND METHODS

The organotypic cultures were prepared from the cerebellum and striatum of newborn Wistar rats. Tissue sections were placed on collagen-coated coverslips and maintained in Maximow double assemblies or in Carrel flasks at

36.5°C. The nutrient medium, consisted of 50% human serum, 40% Earle's solution, 10% chick embryo saline extract supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg/100 ml medium. There were two experimental groups. The first group consisted of selected cultures which after 7 and 14 days of maintenance in standard conditions were treated with medium containing 10^{-3} M Kainic Acid (Sigma) for successive 3 and 7 days. The second group included 7- and 14-day-old cultures exposed to medium containing 10^{-3} M Kainic Acid and 10 mg% Tiapride for 3 and 7 days respectively. Control cultures were grown in standard conditions. During the experiment the cultures were examined under a light microscope, and at appropriate intervals they were processed for electron microscopy by fixation in cold 2% glutaraldehyde for 0.5 h. The tissues were rinsed in cacodylate buffer pH 7.2 for 1 h, postfixed in osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then examined in a JEM 100B electron microscope.

RESULTS

Under the light microscope in the striatum and cerebellum *in vitro*, treated with KA and KA/Tiapride no differences in the growth and cell differentiation were observed.

Striatum: The ultrastructural picture of the control cultures of the striatum, maintained 7 days in nutrient medium, displayed small or medium size neurons, a few large neurons and glia cells (Fig. 1). Most of the astroglia represented the protoplasmic type of glia with round or oval nucleus and relatively pale cytoplasm containing short channels of granular endoplasmic reticulum (GER), free ribosomes, mitochondria and Golgi apparatus. A few gliofilaments and microtubules were seen only occasionally. After 14 days *in vitro* the cultures were more differentiated exhibiting numerous synaptic boutons containing small round, electron lucent or dense-core vesicles of various size.

In the experimental groups of striatum cultures exposed to KA treatment, the astrocytes were preferentially affected, whereas the majority of neurons did not reveal significant abnormalities. Slight ultrastructural changes disclosing nonspecific damage of mitochondria were seen sporadically in the neuronal cytoplasm. Axon terminals in the explant were filled with synaptic vesicles of different size. Synaptic boutons contained numerous small, round, clear vesicles; a few dense-core vesicles were observed as well. In the 7 day-old striatum treated with KA for the following 3 days the glial cells showed remarkable swollen, electron-lucent cytoplasm containing only a few ribosomes, enlarged short channels of GER and severely damaged mitochondria (Fig. 2). Sometimes a few thin gliofilaments were visible in the pale cytoplasm the astrocytes. Some of the glial processes were also swollen and they were

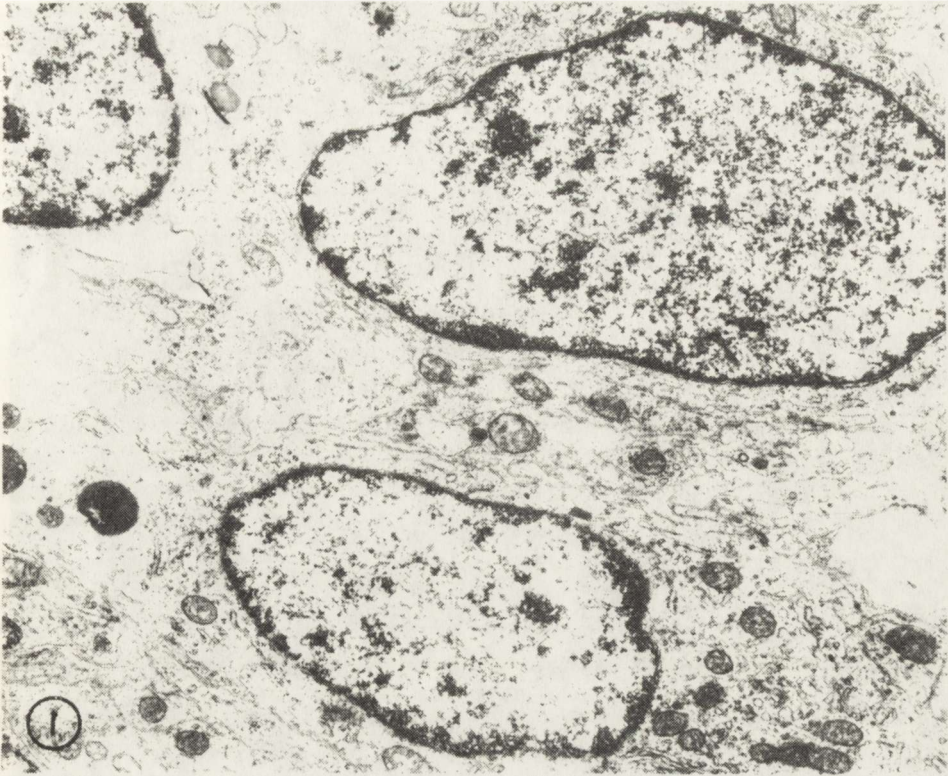


Fig. 1. Control culture of striatum 7 days *in vitro* (DIV). Medium size neurons. $\times 11000$
 Ryc. 1. Hodowla kontrolna prążkowiec 7 dni *in vitro* (DIV). Neurony średniej wielkości. Pow. $11000 \times$

devoid of organelles. The striatum exposed to KA for 7 days showed similar changes of the glial cells. Gliofilaments and gliotubules were rarely encountered.

In 14 day cultures of the striatum kept in standard conditions, exposed afterwards to KA for 3 and 7 days respectively, the astroglia in the outgrowth zone and in the explant revealed advanced morphological changes. Most of the astrocytes were swollen and contained destroyed mitochondria without cristae or filled with granular, dark matrix. Golgi apparatus was often enlarged and dilatation of GER channels was prominent. The cytoplasm of glial cells was sometimes filled with numerous vesicles and vacuoles. Some of the astrocytes had a characteristic appearance of fibrous astroglia owing to a great accumulation of gliofilaments scattered in the cytoplasm. A lot of glial processes was greatly swollen and contained numerous vacuoles. Some of the perivascular endfeet were also dilated and enlargement of GER channels was observed.

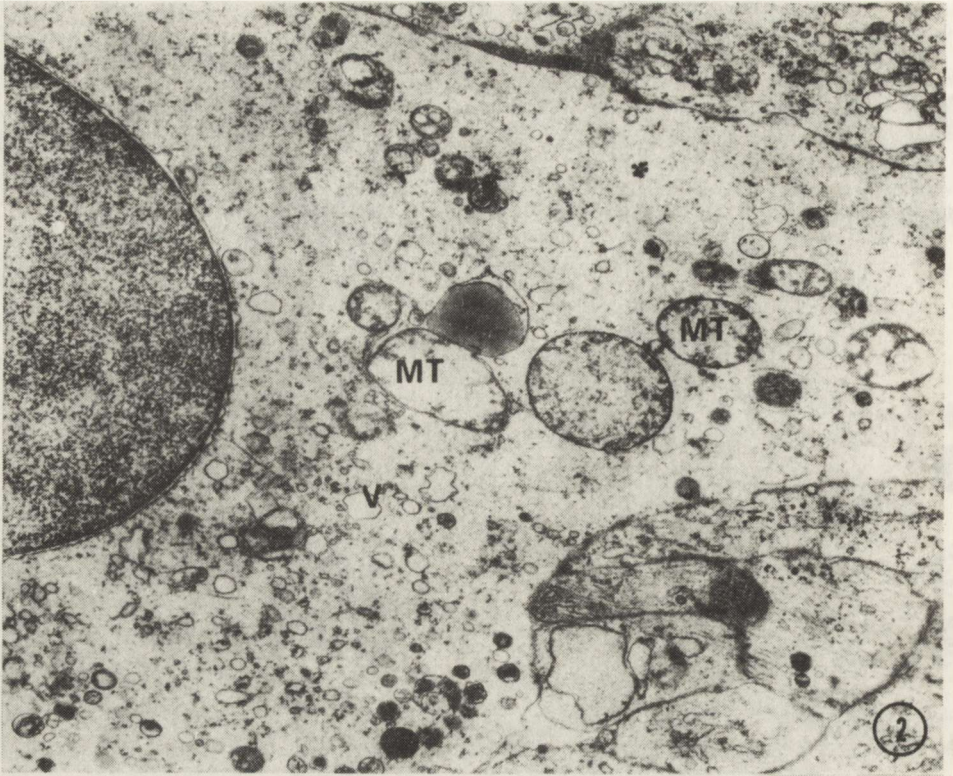


Fig. 2. Culture of neostriatum 7 DIV + 3 days of KA exposure. Severely altered glial cell exhibiting damaged mitochondria (MT), dilated channels of endoplasmic reticulum and vacuoles (V). $\times 15\,000$

Ryc. 2. Hodowla prążkowiec 7 DIV + 3 dni działania KA. Znacznie zmieniona komórka glejowa zawierająca uszkodzone mitochondria (MT), poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej oraz wakuole (V). Pow. $15\,000\times$

In all groups of the striatum cultures treated with KA and Tiapride containing medium, ultrastructural examination revealed similar morphological abnormalities as those observed in the cultures of striatum exposed to KA alone. Most of the neurons remained intact or showed slight morphological changes. The affected glial cells displayed swelling of the cytoplasm and severely damaged mitochondria (Fig.3). In the older cultures a great amount of gliofilaments or tubules could be seen. Axon terminals contained various types of synaptic vesicles, nevertheless the adjoining dendritic processes were intact (Fig. 4).

Cerebellum: The control cultures of the cerebellum displayed a lot of granular cells, Purkinje neurons with characteristic parallel GER channels and other neurons. The glial cells were represented by protoplasmic astrocytes (Fig. 5).

In cultures of the cerebellum after KA administration both the neurons and the glial cells revealed ultrastructural changes. The neuronal changes were

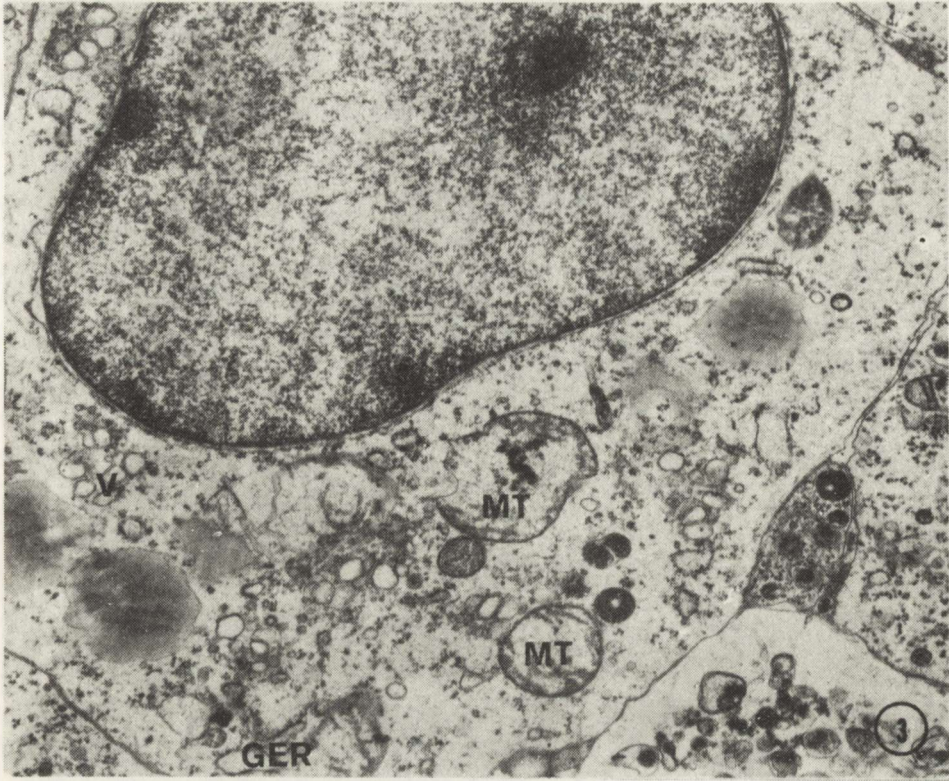


Fig. 3. Culture of neostriatum treated with KA and Tiapride showing similar changes as in Fig. 2. Severely damaged mitochondria (MT), dilated channels of granular endoplasmic reticulum (GER) and vacuoles (V). $\times 15000$

Ryc. 3. Hodowla prążkowiec poddana działaniu KA oraz Tiapridu wykazująca zmiany analogiczne do pokazanych na ryc. 2. Uszkodzone mitochondria (MT), poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER) oraz wakuole (V). Pow. 15000 \times

confined mostly to the Purkinje cells, whereas the granular cells seemed to be less affected. In the cytoplasm of Purkinje cells numerous damaged mitochondria without cristae, dilated channels of GER and Golgi complex, and accumulation of vacuoles and vesicles were noted. The glial cells were markedly affected and exhibited distinct alterations of the organelles. In the 7-day cultures *in vitro* treated with KA for 3 or 7 days, the swelling of the astrocytic cytoplasm and dilatation of GER channels were evident. Some of the cells had a "watery" appearance i.e. pale, electron-lucent cytoplasm devoid of organelles (Fig. 6). In 14-day-old cultures of the cerebellum exposed to KA treatment the neuronal damage was accompanied by advanced glial changes. The enlarged channels of endoplasmic reticulum were often filled with amorphous fine or granular material. Some of the astrocytes contained numerous thin gliofilaments or gliotubules.

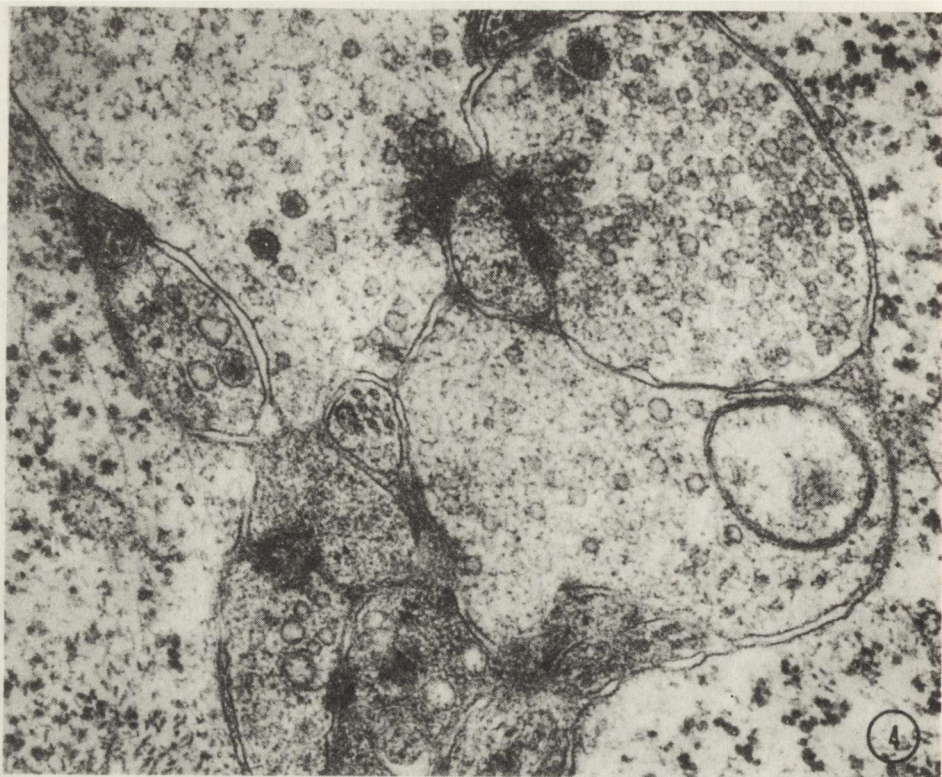


Fig. 4. Numerous unchanged axon terminals in the explant of striatum culture treated with KA and Tiapride. $\times 60\,000$

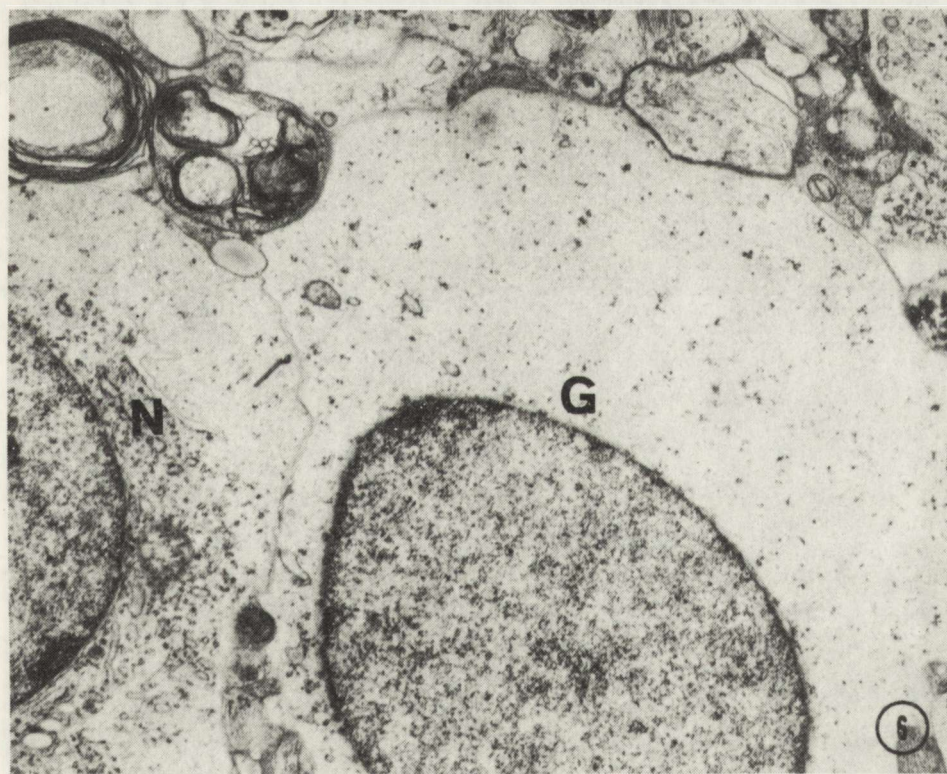
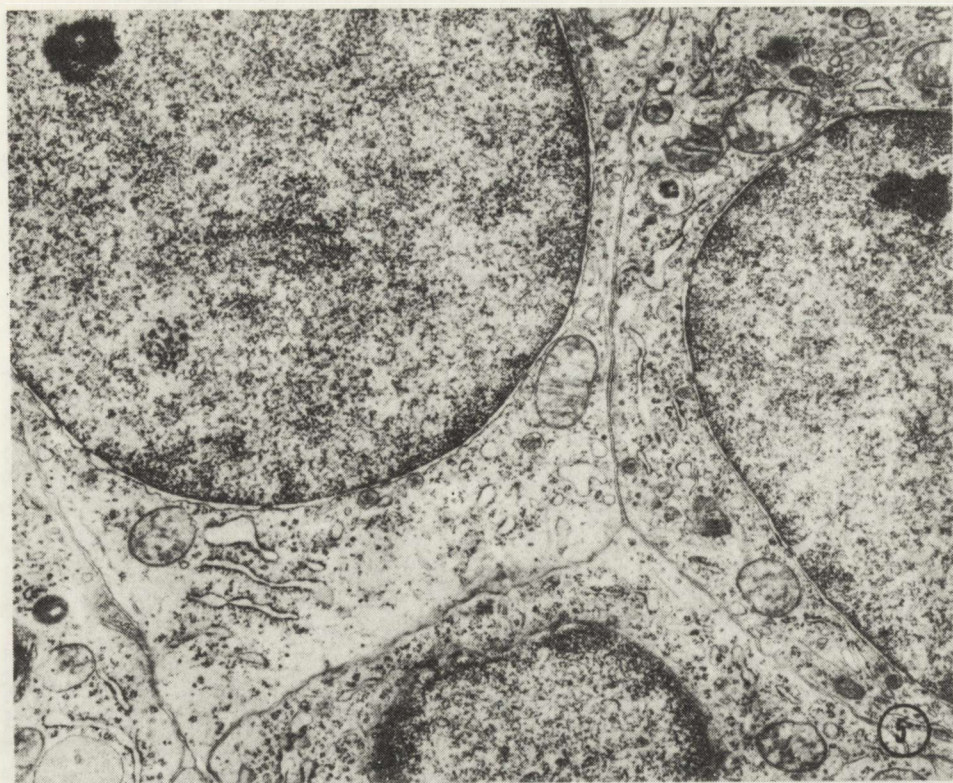
Ryc. 4. Liczne niezmienione zakończenia aksonalne w eksplantacie hodowli prążkowiec poddanej działaniu KA i Tiapridu. Pow. $60\,000\times$

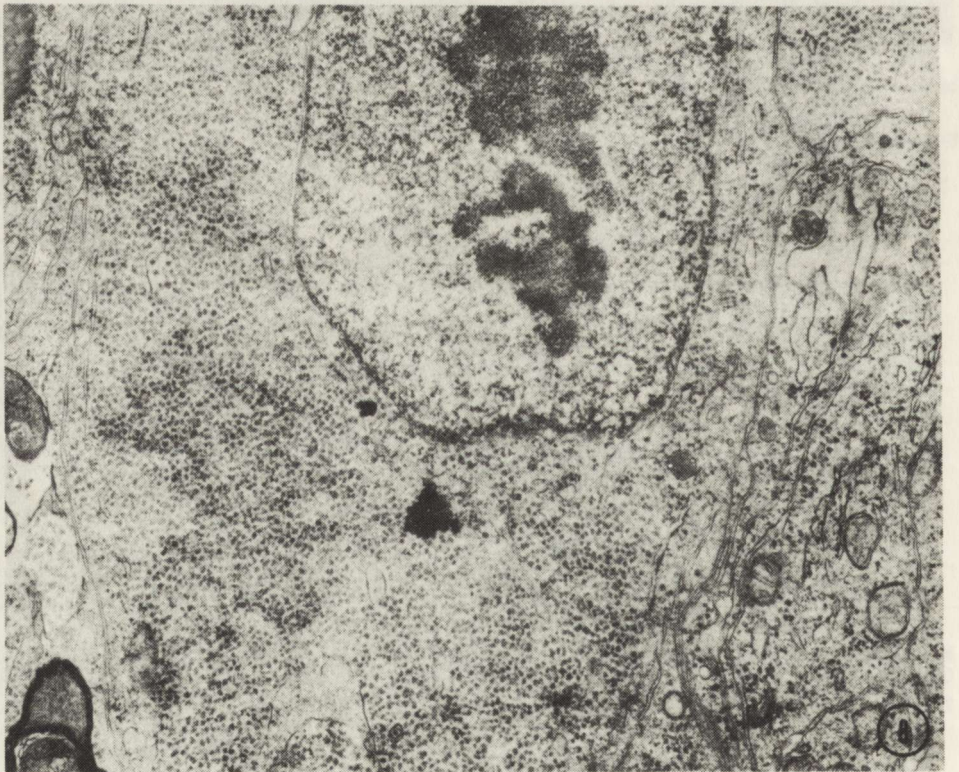
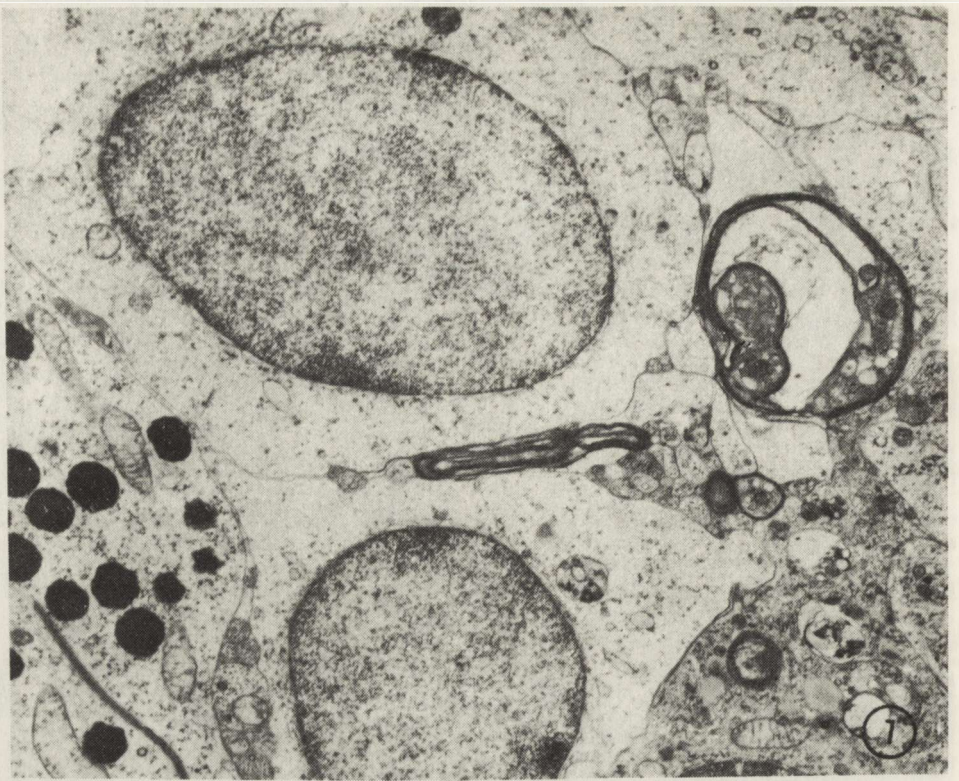
Fig. 5. Control culture of cerebellum. Cluster of neurons. $\times 15\,000$

Ryc. 5. Hodowla kontrolna mózdzku. Grupa neuronów. Pow. $15\,000\times$

Fig. 6. Culture of cerebellum, 3 DIV + 7 days of KA treatment. Glial cell (G) exhibiting electron-lucent, empty cytoplasm. Damaged neuron (N) containing altered organelles. $\times 11\,000$

Ryc. 6. Hodowla mózdzku 3 DIV + 7 dni działania KA. Komórka glejowa (G) odznaczająca się elektronowo-przezierną, pozbawioną organelli cytoplazmą. Uszkodzony neuron zawierający zmienne organelle. Pow. $11\,000\times$





The morphological changes induced by KA were not cancelled by Tiapride treatment. However, in some cultures ultrastructural changes, especially in the glial cells, were less pronounced as compared with those in corresponding cultures treated with KA (Fig. 7). Moreover, after Tiapride administration, a great amount of glycogen particles both in the cytoplasm and processes were visible. Glycogen granules were present mostly in the astrocyte cytoplasm but they were also observed in some neurons (Fig. 8). Glycogen granules were rarely visible in KA-treated cultures and in the control cultures.

DISCUSSION

The present study did not reveal significant differences between the ultrastructural changes in the striatum and cerebellum *in vitro* induced by KA and in the cultures treated simultaneously with KA and Tiapride. The cultures showed the same pattern of glial reaction consisting of swelling of the cytoplasm, degeneration of the organelles and accumulation of gliofibrils or tubules. The effect of KA on the cerebellum and striatum *in vitro* inducing such intensive glial reaction is regarded as a primary response of glial cells to the toxic action of KA (Renkawek et al. 1982; Matyja, Renkawek 1982; Matyja 1986). It is noteworthy that in the cerebellum culture both neurons and glial cells were affected, whereas in the striatum cultures large neurons as well as small ones remained intact. This selective damaging effect of KA to some neurons can be connected with the well-known fact that KA acts on postsynaptic glutamate receptors (McGeer et al. 1977; Biziere, Coyle 1979; Nadler 1979) or on separate specific receptors sensitive to KA (Hall et al. 1978; Henke, Cuénod 1979; Seil et al. 1979), but the vulnerability of neurons depends on the intact glutamergic input (Biziere, Coyle 1978; Köhler et al. 1978; McGeer et al. 1978a; Streit et al. 1980; Nadler et al. 1981). It seems that striatum neurons *in vitro* did not react to KA because of the lack of cortico-striatal connection in tissue culture determined the continuity of the glutamergic pathway (Panula 1980; Matyja 1986). Moreover, it was shown that KA acts on a special class of glutamergic receptors characterized by unique pharmacological profiles of regional distribution in the brain areas (Monaghan et al. 1983). The morphological findings and electrophysiological studies suggested that KA binding-sites are primarily located on the postsynaptic side (Simon et al. 1976; tlenke 1979; Coyle et al. 1981). The presence of postsynaptic sites for KA

Fig. 7. Culture of cerebellum 14 DIV + 3 days of KA and Tiapride treatment. Severely swollen glial cells. $\times 9000$

Ryc. 7. Hodowla mózdzku 14 DIV + 3 dni poddana działaniu KA i Tiapridu. Znaczne obrzmienie komórek glejowych. Pow. 9000 \times

Fig. 8. The same culture, cytoplasm of glial cell containing a great amount of glycogen particles after KA and Tiapride treatment. $\times 11000$

Ryc. 8. Ta sama hodowla, cytoplazma komórki glejowej całkowicie wypełniona ziarnami glikogenu po podaniu KA i Tiapridu. Pow. 1100 \times

seemed to be responsible for the direct cytotoxicity of KA, but additional activation of the presynaptic receptors could stimulate a release of glutamate into the synaptic cleft (Ferkany, Coyle 1983). As a dopamine antagonist, Tiapride is preferentially active on supersensitive or abnormal dopamine receptors (Jenner et al. 1982).

The results of the present experiment showed enhanced cellular alterations induced by KA treatment which were not canceled by Tiapride administration. The supposed beneficial effect of Tiapride preventing cellular damage after KA treatment was not observed in tissue culture. This does not mean that the action of Tiapride was identical in clinical therapy and in the experiments with KA.

BADANIA MORFOLOGICZNE HODOWLI MÓZDŻKU I PRAŻKOWIA PODDANYCH DZIAŁANIU KWASU KAINOWEGO ORAZ KWASU KAINOWEGO Z TIAPRIDEM

Streszczenie

Hodowle organotypowe prążkowie i mózdzku szczura poddano działaniu kwasu kainowego oraz jednoczesnemu działaniu kwasu kainowego i Tiapridu przez 3 i 7 dni. Hodowle utrzymywane w medium zawierającym KA wykazywały obecność nasilonych zmian zwyrodnieniowych dotyczących głównie komórek glejowych. Uszkodzenia neuronów były mniejsze i dotyczyły głównie komórek Purkinjego w mózdzku. Równoczesne podanie KA i Tiapridu, leku zmniejszającego ruchy mimowolne w chorobie Huntingtona, nie znosi w pełni toksycznego działania kwasu kainowego. Po podaniu Tiapridu obserwowano natomiast znaczne gromadzenie glikogenu w komórkach glejowych i nerwowych.

REFERENCES

1. Biziere K., Coyle J. T.: Influence of corticostriatal afferents on striatal kainic acid neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 1978, 8, 303–310.
2. Biziere K., Coyle J. T.: Effects of cortical ablation on the neurotoxicity and receptor binding of kainic acid in striatum. *J Neurosci Res*, 1979, 4, 383–398.
3. Buruma O. J. S., Roos R. A. C., Bruyn G. W., Kemp B., van der Velde E. A.: Tiapride in the treatment of tardive dyskinesia. *Acta Neurol Scand*, 1982, 65, 38–44.
4. Coyle J. T., Schwarcz R.: Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 1976, 263, 244–246.
5. Coyle J. T., Zaczek R., Slevin J., Collins J.: Neuronal receptor sites for kainic acid: correlation with neurotoxicity. In: "Glutamate as a neurotransmitter". Eds. G. Di Chiara, G. L. Gessa. Raven Press, New York, 1981, 337–346.
6. Ferkany J. W., Coyle J. T.: Kainic acid selectively stimulates the release of endogenous excitatory acidic amino acids. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983, 225, 399–406.
7. Hall J. G., Huks T. P., McLennon H.: Kainic acid and glutamate receptor. *Neurosci Lett*, 1978, 8, 171–175.
8. Henke H.: Kainic acid binding in human caudate nucleus: effects of Huntington's disease. *Neurosci Lett*, 1979, 14, 247–251.
9. Henke H., Cuénod M.: L-glutamate specific (³H)kainic acid binding in the rat neostriatum after degeneration of the corticostriatal pathway. *Neurosci Lett*, 1979, 11, 341–345.
10. Jenner P., Theodorou A., Marsden C. D.: Specific receptors for substituted benzamide drugs in brain. In: The benzamides: pharmacology, neurobiology and clinical aspects. Eds. M. Stanley, F. Rotrosen, Raven Press, New York, 1982, 135–137.

11. Köhler C., Schwarcz R., Fuxe K.: Perforant path transections protect hippocampal granule cells from kainate lesions. *Neurosci Lett*, 1978, 10, 241–246.
12. Mason S. T., Fibiger H. C.: Kainic acid lesions of the striatum: a behavioural sequelae similar to Huntington's chorea. *Brain Res*, 1978, 155, 313–319.
13. Mason S. T., Fibiger H. C.: Kainic acid lesions of the striatum in rats mimic the spontaneous motor abnormalities of Huntington's disease. *Neuropharmacology*, 1979, 18, 403–409.
14. Matyja E., Renkawek K.: Morphology of striatal glial cells in organotypic tissue culture submitted to kainic acid. *Neuropatol Pol*, 1982, 20, 329–340.
15. Matyja E.: Morphologic evidence of a primary response of glia to kainic acid administration into the rat neostriatum: studied *in vivo* and *in vitro*. *Exp Neurol*, 1986, 609–623.
16. McGeer E. G., McGeer P. L.: Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acid. *Nature*, 1976, 263, 517–519.
17. McGeer P. L., McGeer E. G., Scherer U., Singh K.: A glutaminergic corticostriatal path?. *Brain Res*, 1977, 128, 369–373.
18. McGeer E. G., McGeer P. L., Singh K.: Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: depending upon corticostriatal tract. *Brain Res*, 1978a, 139, 381–383.
19. McGeer E. G., Olney J. W., McGeer P. L.: Kainic acid as a tool in neurobiology. Raven Press, New York, 1978b.
20. Monaghan D. T., Holets V. R., Toy D. W., Cotman C. W.: Anatomical distribution of four pharmacologically distinct (^3H) L-glutamate binding sites. *Nature*, 1983, 306, 176–179.
21. Nadler J. V.: Kainic acid: neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci*, 1979, 24, 289–300.
22. Nadler J. V., Evenson D. A., Smith E. M.: Evidence from lesion studies for epileptogenic and nonepileptogenic neurotoxic interactions between kainic acid and excitatory innervation. *Brain Res*, 1981, 205, 405–410.
23. Panula P.: A fine structural and histochemical study on the effect of kainic acid on cultured neostriatal cells. *Brain Res*, 1980, 181, 185–190.
24. Price P., Parkes J. D., Marsden C. D.: Tiapride in Parkinson's disease. *Lancet*, 1978, 2, 1106.
25. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M. J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of the rat cerebellum. *J Neurol Sci*, 1982, 53, 321–330.
26. Roos R. A. C., Buruma O. J. S., Bruyn G. W., Kemp B., van der Velde E. A.: Tiapride in treatment of Huntington's chorea. *Acta Neurol Scand*, 1982, 65, 45–50.
27. Seil F. J., Blank N. K., Leiman A. L.: Toxic effects of kainic acid on mouse cerebellum in tissue culture. *Brain Res*, 1979, 161, 253–265.
28. Simon J. R., Contrera J. F., Kùhar M. J.: Binding of (^3H) kainic acid, an analogue of glutamate to brain membranes. *J Neurochem*, 1976, 26, 141–147.
29. Streit P., Stella M., Cuénod M.: Kainate-induced lesion in the optic tectum: dependency upon optic nerve afferents of glutamate. *Brain Res*, 1980, 187, 45–57.

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

WOJCIECH SOBANIEC, PIOTR RUDZIŃSKI, ELEONORA JANKOWICZ,
MARIA SOBANIEC-LOTOWSKA, WOJCIECH KUŁAK

CARDIAZOL-INDUCED SEIZURES AND THE CONCENTRATION OF LIPID PEROXIDES IN THE BRAIN OF RATS UNDER THE INFLUENCE OF VALPROIC ACID AND VITAMIN E*

Department of Neurology, Department of Pathologic Anatomy, School of Medicine, Białystok

The results of recent experiments and clinical trials (Nikushkin et al. 1981; Domagała 1986; Zaorska 1986; Ciechanowski 1987) have pointed out to various aspects of lipid metabolism and the effect of its disturbances on the homeostasis.

The brain and, in particular, myelin are characterized by a high content of lipids which in the former constitute 50% of the dry mass and in the latter more than 60% of its solid components (Łazarewicz, Bicz 1981). The brain lipids exhibit a specific and very stable composition. They are abundant in other organs and systems, too. In a normal adult brain only trace amounts of triglycerides, free fatty acids and cholesterol esters are present. Their concentration can be elevated in various pathologic states which lead among others, to formation of lipid peroxides (LP) and further to a synthesis of prostaglandins and leukotriens (Zaorska 1986). Several disturbances such as erythrocyte hemolysis, gene mutations, aging and nervous system pathology may result from an increased activity of lipid peroxides.

With regard to the central nervous system peroxides contribute to the development of cerebral stroke, to neoplastic processes and to various states with pathologically increased neuromediators leading to hyperstimulation (Nikushkin et al. 1981; Domagała 1986; Ciechanowski 1987). Recent reports have suggested a positive role of vitamin E (reducing free radicals and preventing oxidation of unsaturated fatty acids) in inhibition of epileptic seizures in cases when the former was applied together with phenobarbital (Kovalenko et al. 1984).

An animal model of cardiazol-induced seizures in rats was used by the authors who tried to find:

*The work was done within a research study R-15 on an account of Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw

1. The effect of seizures on the levels of lipid peroxides in particular brain structures.
2. The influence of vitamin E — a scavenger of free radicals and of valproic acid - an anticonvulsant drug, applied separately or jointly on the levels of lipid peroxides.
3. Whether, if any, correlation exists between the changes in the lipid peroxides concentration and the feature of seizures.

MATERIAL AND METHODS

One hundred male Wistar rats with an average body weight of 300 g were used for the experiments. The animals were divided into six groups. 1) control, 2) animals with cardiazol seizures, 3) animals given chronically vitamin E, 4) animals treated with vitamin E and given cardiazol, once, 5) animals treated with valproate and given cardiazol, once, 6) animals given chronically vitamin E with induced cardiazol seizures which, however, were preceded by administration of valproate. After the seizures had ceased the rats were killed by decapitation. The method of Utley et al. (1967) was used for estimation of lipid peroxides in the following brain structures: cortex, hippocampus, corpus striatum, hypothalamus, medulla oblongata. The concentration of lipid peroxides was measured colorimetrically at 530 nm and the results are given as extinction units (EU) per 100 mg of wet tissue. In animals of all groups, there were estimated the time of the onset of seizures, their duration and the anticonvulsant properties of the substances used.

The animals were given: a) vitamin E for seven days in a dose 500 mg/kg through a gastric tube, b) cardiazol in a dose 70.0 mg/kg, subcutaneously, c) valproic acid (Vupral-Polfa) 200 mg/kg through a gastric tube. The rats were fed on standard granulated diet, being starved a day before experiment. Water was freely available.

RESULTS

The concentration of lipid peroxides in the cortex and hippocampus in the six groups of animals is shown in Fig. 1a.

The values of lipid peroxides (LP) in control animals were 0.66 ± 0.024 (cortex) and 0.105 ± 0.009 EU (hippocampus). Vitamin E produced a significant decrease: to 0.049 ± 0.003 EU in cortex and 0.049 ± 0.006 EU in hippocampus. In a similar manner behaved the levels of LP in the group of rats with cardiazol-induced seizures to whom either valproic acid alone or combined with vitamin E were given.

Figure 1b illustrates the concentration of LP in corpus striatum, hypothalamus and in mesencephalon in the particular groups of rats. Control values of LP were 0.052 ± 0.012 , 0.068 ± 0.007 and 0.062 ± 0.007 EU, respectively. In rats with seizures the LP were increased though to a lesser degree than in

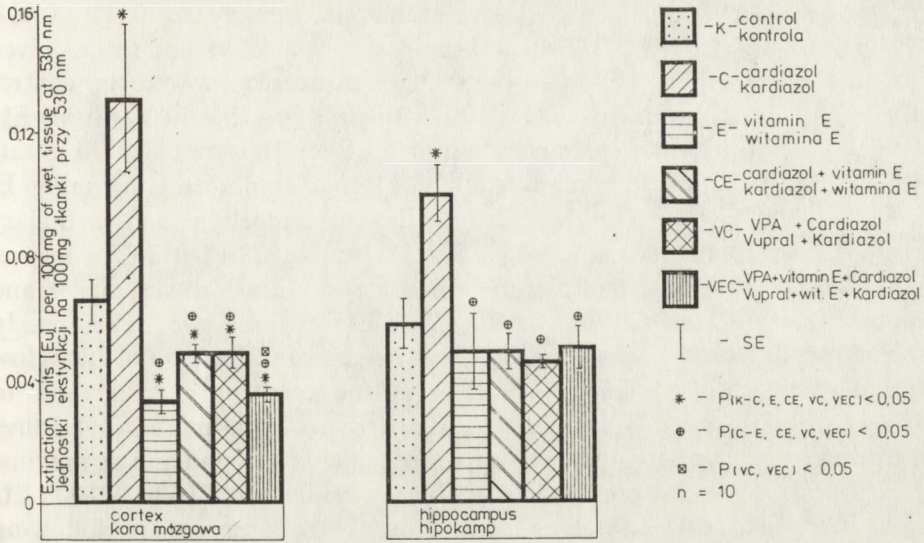


Fig. 1a. Lipid peroxides in cerebral cortex and hippocampus of rat brain in control and experimental animals

Ryc. 1a. Zawartość nadtlennków lipidów w korze mózgu i w hipokampie w kontroli i u zwierząt doświadczalnych

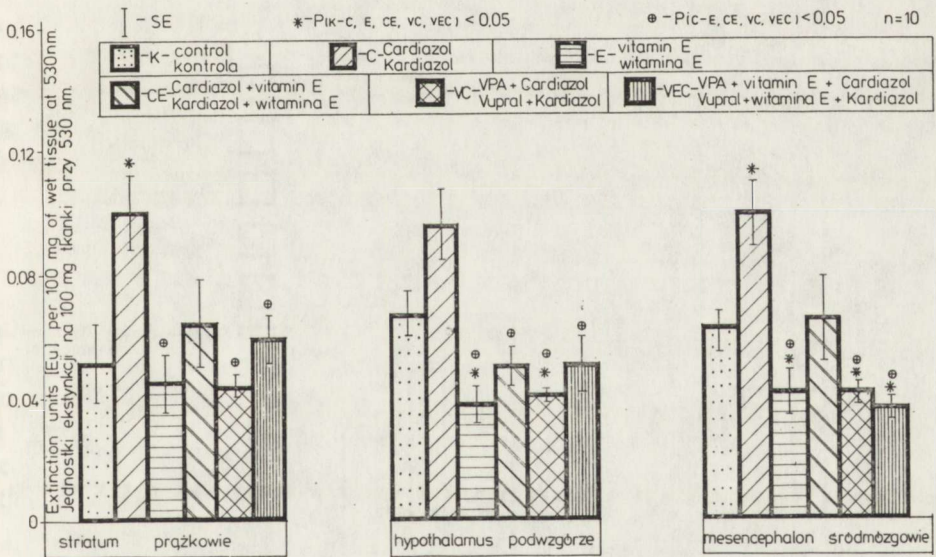


Fig. 1b. Lipid peroxides in striatum, hypothalamus and midbrain in control and experimental animals

Ryc. 1b. Zawartość nadtlennków lipidów w prążkowie, podwzgórze i w śródmózgowiu w kontroli i u zwierząt doświadczalnych

cortex but their concentration was elevated accordingly to 0.102 ± 0.013 , 0.096 ± 0.012 and 0.099 ± 0.007 when compared to control values. In rats given vitamin E the levels of LP were found to be decreased beyond the control values and they amounted to 0.045 ± 0.008 EU (striatum), and 0.037 ± 0.006 EU (mesencephalon). The same effects (diminished LP levels) were observed in rats with cardiazol seizures after administration of Vupral combined with vitamin E.

Figure 1c shows the levels of LP in the rat cerebellum and medullary tissues. Control values were 0.080 ± 0.012 EU and 0.073 ± 0.013 EU, respectively. In rats with cardiazol seizures the LP concentration was higher and amounted to 0.121 ± 0.020 and 0.079 ± 0.008 EU in these two structures. In both of them vitamin E caused a statistically significant decrease of LP below control values, i.e. to 0.042 ± 0.06 EU in the cerebellary tissue and to 0.034 ± 0.009 EU in the medullary tissue. In rats with cardiazol seizures pretreated with vitamin E the levels of LP became normalized and at the time of seizures they amounted to 0.054 ± 0.006 in cerebellum and 0.061 ± 0.008 EU in medulla oblongata. Similar normalization was observed in following treatment with valproic acid alone or combined with vitamin E.

Figure 2 illustrates the anticonvulsive influence of valproic acid and vitamin E in rats during cardiazol-induced seizures. In the rats with evoked seizures the latter developed in all animals after 55.0 ± 3.2 s at average and they lasted for 175 ± 15.5 s. In the rats pretreated with vitamin E, the cardiazol seizures appeared later i.e. after 70.0 ± 3.4 s and their duration was similar to the former group. In the rats pretreated with Vupral the seizures occurred markedly later

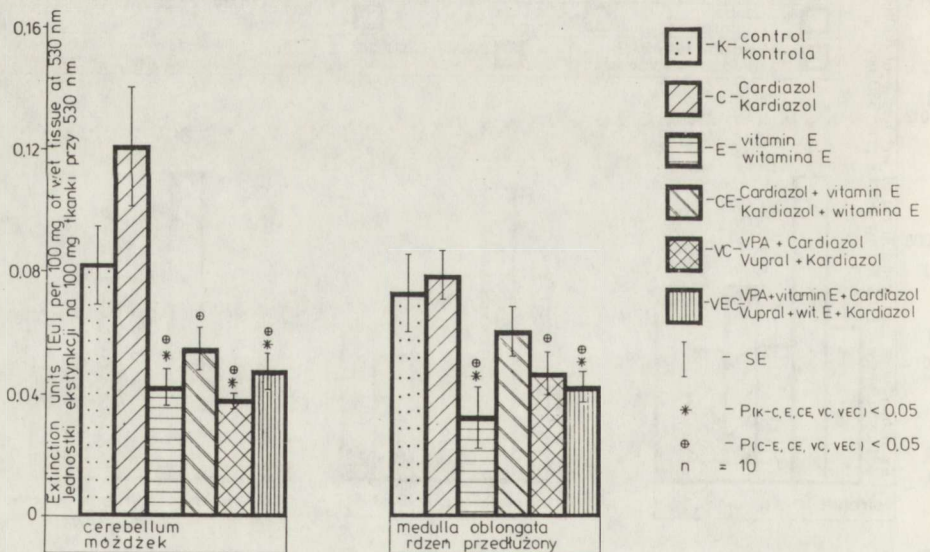


Fig. 1c. Lipid peroxides in cerebellum and medulla oblongata in control and experimental animals
Ryc. 1c. Zawartość nadtlennków lipidów w mózdku i w opuszcze w kontroli i u zwierząt doświadczalnych

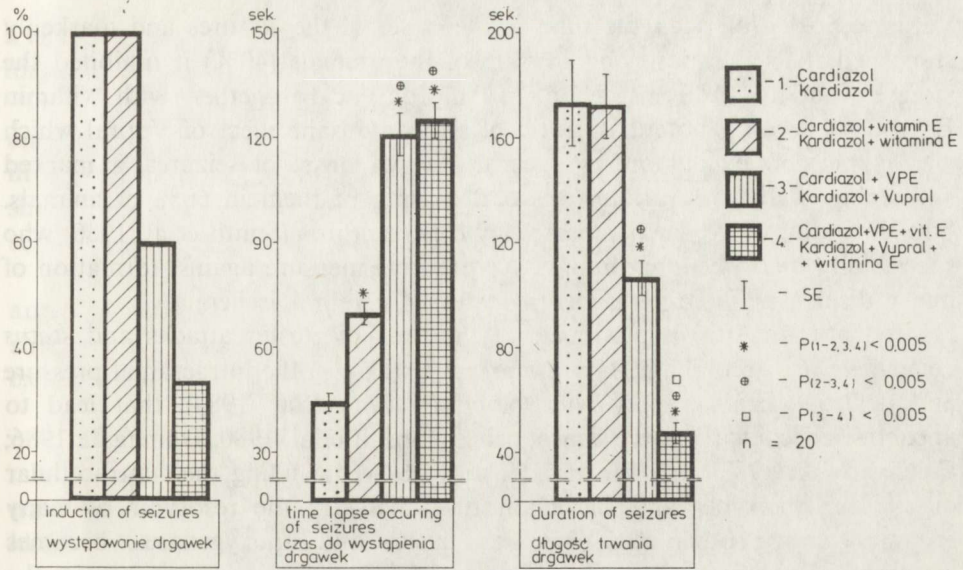


Fig. 2. Evaluation of VPA and vitamin E anticonvulsant effects in rats with cardiazol-induced seizures

Ryc. 2. Ocena przeciwdrgawkowego działania kwasu walproinowego (Vupralu) i witaminy E w modelu drgawek kardiazolowych u szczurów

i. e. after 120.6 ± 6.7 s, they lasted significantly shorter and had been developed in about 40% of the animals. The most interesting were the findings in the rats pretreated with Vupral combined with vitamin E. Cardiazol seizures in these animals became apparent at the very latest i. e. after 125.0 ± 5.5 s at average, their duration was the shortest i. e. 48.0 ± 4.5 s and they were observed in only 36% of the rats.

DISCUSSION

The results demonstrated a statistically significant increase in the concentration of lipid peroxides at the peak of cardiazol induced seizures in those structures of the brain which are mediating and responsible for the spread of seizures. Pretreatment of rats with an antioxidant i. e. vitamin E, brought about an inhibition of oxidation of unsaturated fatty acids and of the formation of their toxic degradation products. Similar effects were observed after administration of Vupral, too. The two substances given jointly i. e. Vupral and vitamin E increased the antioxidative activity which led to a normalization of the concentration of lipid peroxides in the course of cardiazol seizures.

Most interesting seemed to us an analysis of the features and the nature of cardiazol-induced seizures. A high correlation was found between the concentration of lipid peroxides and the intensity of cardiazol-induced seizures.

Valproic acid prolonged the time of the onset of the seizures and markedly shortened their duration, and in part of the animals (40%) it inhibited the seizures, totally. Administration of valproic acid together with vitamin E brought about a potentialization of anticonvulsant effect of Vupral which was manifested by a more prolonged time of onset of seizures, a marked shortening of their duration and total ceasing of them in 60% of animals. Similar findings have been reported by other authors (Smith et al. 1980) who successfully used phenobarbital as a preventive measure against formation of free radicals and lipid-peroxides in cases of cerebral ischemia.

Epileptic seizures in particular at the time of cluster attacks and *status epilepticus*, are accompanied by a marked increase in the intracranial pressure and defective brain supply with blood (Gabor et al. 1984), that lead to anoxic effects with severe consequences (Smith et al. 1980; Domagała 1986; Ciechanowski 1987). The function of nerve cells, including their intracellular organelles: lysosomes and mitochondria which are the reservoir of many enzymes among others, of proteases, cyclo- and lipoxygenases, becomes disturbed. The effect of hypoxemia of cellular membranes consists in the destruction of their, lipid components from which arachidonic acid is liberated too. The latter becomes a substrate for the oxygenases. Thus, a cascade formation of lipid-peroxides and further of prostaglandins and leukotriens is mobilized in conjunction with free radicals (Zaorska 1986). This, in turn, enhances destructive effects responsible for development of pathological signs such as hypoxemia and brain oedema followed by seizures. Increased cell membrane permeability observed during epilepsy seizures (Kryzhanovsky et al. 1984) enhances depolarization of proximal neurons which create a pathological generator of augmenting and widespreading stimulation. This in turn causes a derangement of the physical state of brain lipids that leads to a decreased antioxidative activity and in consequence to higher concentration of peroxides and lipids. Increased excitement (increase in number of epileptic impulses) results in the release of stimulatory neurotransmitters from the presynaptic membrane leading to the postsynaptic membrane hypopolarization and enhanced discharges. The results presented here appear to throw some light on the mechanism of seizure attacks in animals and will be followed by further studies on the role of lipid peroxides in the human epilepsy, in particular in children.

CONCLUSIONS

1. At the peak of cardiazol-induced seizures a statistically significant increase in lipid peroxides in all rat brain structures, especially in the cortex and cerebellum was found.

2. In the animal model of cardiazol seizures vitamin E decreased the concentration of lipid peroxides in the rat brain. The same effect was achieved with Vupral. Combined administration of vitamin E and Vupral resulted in

a more marked normalization of the brain lipid peroxide levels than when the former substances given separately.

3. A significant correlation between the concentration of lipid peroxides and the intensity of cardiazol seizures was observed. Vitamin E caused a delay in the onset of seizures. Vupral prolonged the time of the onset of seizures and shortened their duration; moreover, the drug prevented the occurrence of seizures in 40% of animals.

4. The two substances given jointly disclosed potentialization of the anticonvulsant effect. That action was revealed by later onset of seizures, their shorter duration and their inhibition in 60% of animals subjected to the experiment.

WPLYW KWASU WALPROINOWEGO I WITAMINY E NA ZAWARTOŚĆ NADTLENKÓW LIPIDÓW W MÓZGU SZCZURÓW ORAZ OBRAZ DRGAWEK KARDIAZOŁOWYCH

Streszczenie

Oceniono wpływ kwasu walproinowego (Vupral) i witaminy E na zawartość nadtlenków lipidów w mózgu szczurów i obraz drgawek kardiazolowych. Wykazano na szczycie drgawek statystycznie znamienne wzrost nadtlenków lipidów w mózgu szczurów. Witanina E, jak również kwas walproinowy powodowały w przypadkach drgawek obniżenie zawartości nadtlenków lipidów w mózgu szczurów. Podanie kwasu walproinowego razem z witaminą E zwiększało w modelu drgawek kardiazolowych hamowanie powstawania nadtlenków lipidów. Wykazano zależność między zawartością nadtlenków lipidów a intensywnością drgawek. Zastosowanie witaminy E opóźniało wystąpienie drgawek. Podanie Vupralu wydłużało czas ich wystąpienia i skracało czas ich trwania, a u 40% zwierząt spowodowało ich całkowite zahamowanie. Wspólne podanie witaminy E z Vupralem prowadziło do potencjalizacji działania przeciwdrgawkowego przejawiającej się wydłużeniem czasu poprzedzającego drgawki, znacznym skróceniem czasu ich trwania i ich redukcją u 60% zwierząt.

REFERENCES

1. Ciechanowski K.: Free radicals in medicine. (in Polish) *Pol Tyg Lek*, 1987, 31, 932–941.
2. Domagała B.: Free radicals and scavengers. (in Polish) *Pol Tyg Lek*, 1986, 21, 697–700.
3. Gabor A. J., Brooks A. G., Scobex R. P., Parsons G. H.: Intracranial pressure during epileptic seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1984, 57, 497–506.
4. Kovalenko V. M., Kryshanovsky G. N., Pronina I. G., Nikushkin E. V.: L-Tocopherol in the multiple medality therapy of some forms of epilepsy. *Zh Nevropatol Psikhiatr*, 1984, 6, 892–896.
5. Kryzhanovsky G. N., Nikushkin E. V., Voronko V. A., Kovalenko V. M., Pronina I. G., Kitaeva L. V.: The content of lipid peroxidation products and free fatty acids in the blood plasma and cerebrospinal fluid in epileptic patients. *Zh Nevropatol Psikhiatr*, 1984, 6, 866–890.
6. Łazarewicz J., Bicz W.: Chemical components of the nervous system. In: *The basis of the neuropathology*. (in Polish) Eds: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa 1981, 55–57.

7. Nikushkin E. W., Braslavski V. E., Kryzhanovsky G. N.: The neuronal peroxides as a one of the mechanisms of the seizures activity. *Zh Nevropatol Psikhiatr*, 1981, 6, 810–815.
8. Smith D. S., Rehncrona S., Sjesjö B. K.: Barbiturates as protective agents in brain ischemia and free radical scavengers *in vitro*. *Acta Physiol Scand, Suppl* 1980, 492, 122–134.
9. Utley H. S., Beenheim F., Hochstein P.: Effect of sulphydryl reagents on peroxidation in microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1967, 118, 29–35.
10. Zaorska B.: The prostaglandins and other eikosanoids. (in Polish), PZWL, Warszawa, 1986.

Authors' address: Clinic of Neurology, School of Medicine, 24 a, M. Skłodowskiej-Curie Str., 15-276 Białystok

EWA BERTRAND, EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO,
SŁAWOMIR CICHY

UOGÓLNIONA POSTAĆ PROMIENICY MÓZGU

Zakład Neuropatologii i Klinika Chorób Naczyniowych Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii
i Neurologii, Warszawa

Promienica, wywołana przez promieniowiec *Actinomyces Isreali*, bardzo rzadko zajmuje ośrodkowy układ nerwowy (Bolton, Asenhurst 1964; Wierzbicka 1981; Chen-Wei 1985; Tvede i wsp. 1985). Promieniowce dawniej zaliczane do grzybów, obecnie klasyfikowane jako bakterie, stanowią jakby ogniwo łączące bakterie i grzyby. Od czasu pierwszej publikacji dwóch przypadków promienicy mózgu w 1882 r. przez Ponficka do 1985 r. opublikowano ogółem 152 przypadki promienicy mózgu (Chen-Wei, 1985). Częstość zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) waha się według danych z piśmiennictwa od 5% (Cope 1938; Schneider, Rand 1949) do 8% (Chen-Wei 1985) wszystkich przypadków promienicy. Zakażenie OUN przebiega bez określonego zespołu klinicznego i rzadko jest przyżyciowo rozpoznawane (Wierzbicka 1981).

OPIS PRZYPADKU

U chorej S. Z. lat 82, od 5 lat narastały objawy zespołu parkinsonowskiego doprowadzając w ostatnim okresie życia do pełnego unieruchomienia. Od 8 miesięcy chora była pobudzona słownie, okresowo występowały stany majaczeniowe. Na 4 dni przed przyjęciem do szpitala przestała mówić i przyjmować posiłki, nie reagowała na otoczenie, raz obserwowano napad uogólnionych drgawek. Przy przyjęciu do Kliniki Chorób Naczyniowych Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii chora nieprzytomna, wyniszczona, odwodniona, obecne odleżyny na kości krzyżowej. Reakcja na ból zachowana. Z objawów oponowych stwierdzono sztywność karku na 4 palce oraz obustronny objaw Kerniga. Ponadto obserwowano wzmożenie napięcia mięśni typu pozapiramidowego, zespół odruchowy prawostronny z tendencją do objawu Babińskiego i poszerzenie lewej źrenicy. W 8 dniu hospitalizacji chora zagorączkowała do 38°C, stopniowo narastała niewydolność krążeniowo-oddechowa. W 9 dobie nastąpił zgon.

Badania dodatkowe wykazały narastające objawy niewydolności nerek ze znacznie wzmożonym poziomem mocznika od 146 do 330 mg% i kreatyniny do 3,4 mg%. Leukocytoza narosła do 20,0 G/l. Płyn mózgowo-rdzeniowy był artefaktycznie skrwawiony. Komórek w osadzie było 46, odczyn Pandeygo wykazywał silne zmętnienie. Zapis EEG wskazywał na rozlane uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego. Klinicznie rozpoznano stan zatokowaty oraz uogólnioną miażdżycę.

Badaniem sekcyjnym stwierdzono: w mięśniu sercowym (ryc. 1), w płucach, w wątrobie, w nerkach i w tarczycy mnogie ropnie z obecnością ziaren promienicy.



Ryc. 1. Ropień z ziarnami promienicy w mięśniu sercowym. HE. Pow. 100 ×
 Fig. 1. Abscess containing actinomycotic grains in the myocardium. HE. ×100

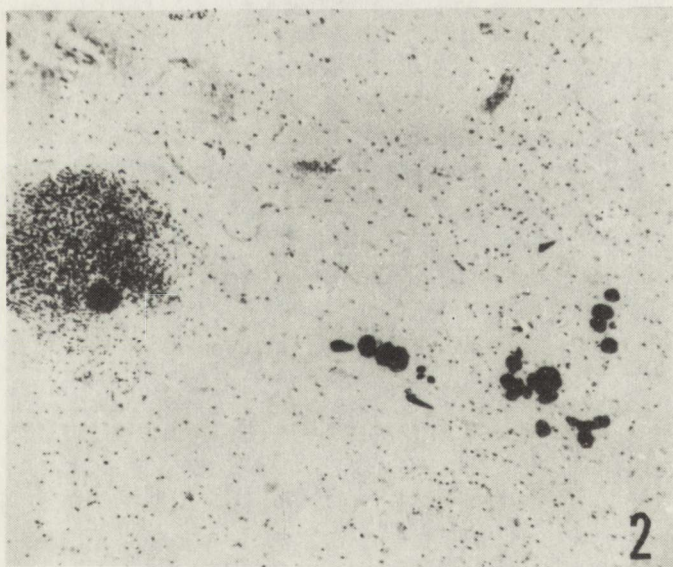
Badanie neuropatologiczne. Makroskopowe badanie mózgu wykazało jego obrzęk pod postacią spłaszczenia zakrętów, zaciśnięcia rowków, wgłobienia obu haków zakrętów hipokampa i migdałków mózdzku oraz zaciśnięcia układu komorowego, zwłaszcza lewej komory bocznej. Opony były zmleczałe. W naczyniach podstawy stwierdzono zmiany miażdżycowe III stopnia. Na przekrojach czołowych w lewej torebce zewnętrznej oraz w korze rowka centralnego prawej półkuli mózgu stwierdzono dwa twory o wymiarach 0,7 × 0,5 cm ostro odgraniczone od otoczenia, o wyglądzie pstrym. Ponadto obserwowano jamki okołonaczyniowe w dolnych biegunach obu łupin.

Do badania mikroskopowego pobrano z lewej półkuli mózgu wycinki z płata czołowego, wyspy i płata skroniowego ze zwojami podstawy i wzgórzem oraz z prawego płata ciemieniowego. Po zatopieniu w parafinie skrawki

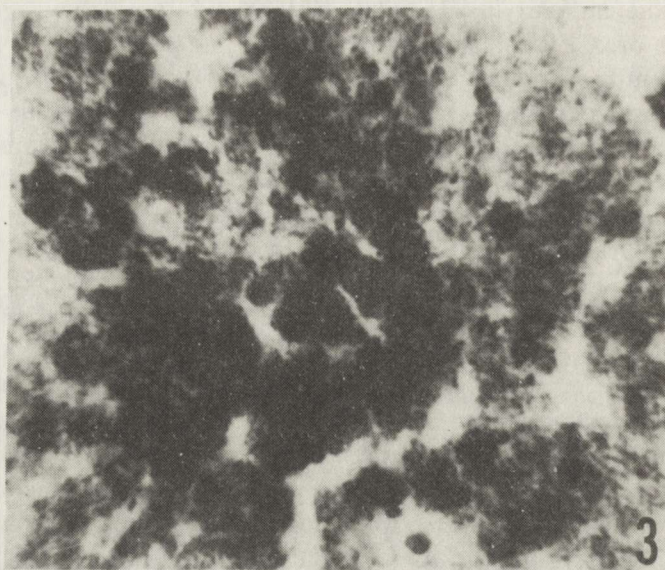
barwiono fioletem krezylu, HE, metodą PAS, Grama-Weigerta, van Gieson, Spielmeijera oraz Ziehl-Nielsen.

Badanie mikroskopowe wykazało w korze i istocie białej mózgu liczne, rozsiane twory, okrągławe lub obłoczkowate. Niektóre podobne do fasoli, układały się w paciorki (ryc. 2). Twory te zbudowane były z drobnych ziaren, zbitych w części centralnej, rozproszonych na obwodzie (ryc. 3) barwiących się intensywnie ciemnogrnatowo HE, purpurowo w metodzie PAS, szafirowo w metodzie Gram-Weigerta. Barwienie metodą Ziehl-Nielsen dało wynik negatywny. Zmiany te odpowiadały koloniom promieniowców. Często były one otoczone wałem komórek zapalnych: leukocytów obojętnochłonnych z wielopłatowymi jądrami, limfocytów, komórek plazmatycznych i histiocytów, tworzących mikroropnie (ryc. 4). Największe skupienia ropni, widoczne już makroskopowo, stwierdzono w korze ciemieniowej w okolicy rowka centralnego półkuli prawej oraz w istocie białej podkorowej w okolicy dolnego bieguna lewej łupiny. Poza wielogniskowymi, rozszanymi ropniami z ziarnami promienicznymi w centrum, obserwowano również liczne, rozproszone, bezodczynowe kolonie promieniowców. Kolonie promieniowców obecne były również w świetle drobnych tętniczek śródmiąższowych i oponowych (ryc. 5). Poza tym zarówno w tkance mózgu, jak i w oponach obserwowano rozsiane jedno- lub wielorzędowe nacieki okołonaczyniowe zbudowane z limfocytów i leukocytów.

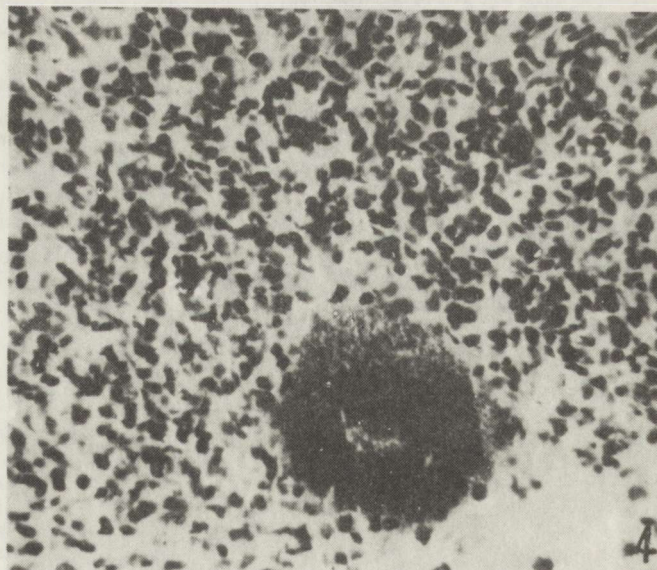
W korze półkul mózgowych poza obszarem zmian zapalnych stwierdzono liczne opustoszenia komórkowe. Zachowane neurony wykazywały cechy schorzenia przewlekłego lub ischemicznego, satelitoza była wzmożona, często



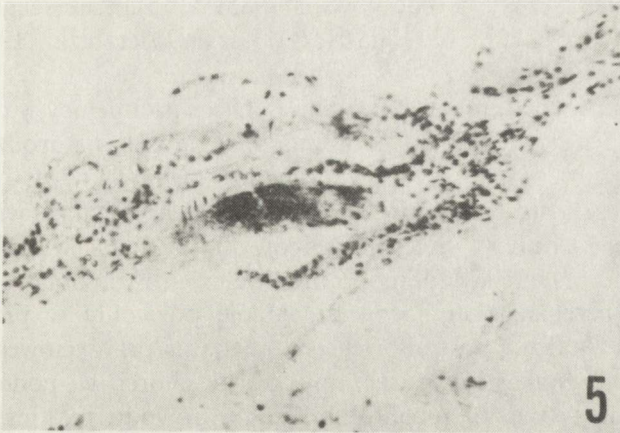
Ryc. 2. Kolonie promieniowców okrągłego kształtu, układające się w paciorki. HE. Pow. 60 ×
 Fig. 2. Actinomyces colonies of round shape arranged beadlike. HE. ×60



Ryc. 3. Ziarnista struktura kolonii promieniowców. HE. Pow. 1200 ×
Fig. 3. Granular structure of Actinomyces colonies. HE. ×1200



Ryc. 4. Kolonie promieniowców otoczone wałem komórek zapalnych. HE. Pow. 400 ×
Fig. 4. Actinomyces colonies surrounded by wall of inflammatory cells. HE. ×400



Ryc. 5. Kolonie promieniowców w świetle naczynia opony oraz naciek zapalny w oponie miękkiej. HE. Pow. 60 ×

Fig. 5. Actinomyces colonies in the lumen of meningeal vessel and inflammatory infiltration in meninges. HE. × 60

obserwowano neuronofagię. Ponadto stwierdzono nieliczne pałeczki i grudki glejowe. Tętniczki i włosniczki śródmiaższowe były przepelnione krwią, obserwowano drobne krwinkotoki i jeziora włókniaka. Struktura tkanki wokół naczyń była rozrzedzona, a przestrzenie okołonaczyniowe poszerzone. Tętniczki śródmiaższowe i naczynia opon miały zwłókniałą przydanke i warstwę środkową. Niekiedy ściany tętniczek śródmiaższowych były zeszkliwiałe, a ich światło zwężone.

OMÓWIENIE

W przedstawionym przypadku dominującą zmianą były rozsiane koro-wo-podkorowe, polimorficzne twory intensywnie barwiące się HE, dodatnio metodą PAS i Grama-Weigerta, negatywnie w metodzie Ziehl-Nielsen. Struktura ich zbity lub drobnopylista odpowiadała koloniom promieniowców. Występowały one bądź w formie bezodczynowej, bądź też towarzyszył im odczyn zapalny pod postacią licznych, drobnych, nieotorbionych mikroropni. Przypadek nasz odpowiadał więc, rozlanej postaci promienicy, przebiegającej pod postacią ropnego zapalenia opon miękkich i rozproszonych mnogich ropni śródmiaższowych bez wyraźnej ziarniny zapalnej.

Rozlana postać promienicy OUN jest rzadziej spotykana niż postać ograniczona, która występuje zwykle jako pojedynczy, otorbiony ropień lub ziarniniak (Brucher i wsp. 1958; Bolton, Asenhurst 1964; Tvede i wsp. 1985) i jest najczęściej rozpoznawana jako proces rozrostowy (Bolton, Asenhurst 1964; Wickbom, Davidson 1967). Do zajęcia OUN dochodzi najczęściej na drodze hematogennej, z jamy ustnej po ekstrakcji zębów lub z układu oddechowego (Bruchner i wsp. 1958; Bolton, Asenhurst 1964; Bowden, Haride

1973; Wierzbicka 1981; Tvede i wsp. 1985) albo przez ciągłość z ognisk pierwotnego zakażenia w obrębie twarzy i szyi (Wierzbicka 1981; Chen-Wei 1985).

W naszym przypadku nie znaleziono ogniska promienicy w okolicy twarzy i szyi. Przyjmujemy więc, że do zakażenia OUN doszło na drodze hematogennej. Przemawia za tym obecność kolonii promieniowców w świetle naczyń, głównie tętniczek śródmiąższowych i oponowych, a także wielonarządowe występowanie kolonii (w mięśniu sercowym, płucach, wątrobie, nerkach). Narastające zaburzenia świadomości i brak ewidentnych objawów klinicznych w okresie poprzedzającym hospitalizację nie pozwoliły w przedstawionym przypadku na ustalenie prawidłowego rozpoznania przyżyciowego i na ustalenie źródła zakażenia. Przyпускаjemy, że u chorej w podeszłym wieku, unieruchomionej w łóżku przez długi czas z powodu parkinsonizmu miażdżycowego, doszło do obniżenia odporności ogólnoustrojowej i gwałtownego rozwoju uogólnionego procesu chorobowego, który szybko doprowadził do zgonu. Wynik badania płynu mózgowo-rdzeniowego nie pozwolił na przyżyciowe rozpoznanie infekcji OUN. Obecność ropni w torebce zewnętrznej, mnogie ropnie oraz liczne bezodczynowe ziarna promienicze i krwinkotoki w korze mózgu oraz zmiany zapalne w oponach mogły tłumaczyć obserwowany w ostatnim okresie życia zespół piramidowy i objawy oponowe oraz napad uogólnionych drgawek.

GENERALIZED FORM OF BRAIN ACTINOMYCOSIS

Summary

The here presented case was a woman 82 years old suffering for many years of arteriosclerotic Parkinson syndrome. During the last 8 months of her life she exhibited excessive talk flow and states of delirium. Twelve days before death she had a generalized attack of convulsions and the consciousness disorder increased. Moreover, meningeal symptoms were observed, a right side reflex syndrome with Babiński sign and temperature up to 38°C were noted. Death occurred on the 9th day of hospitalization with symptoms of increasing circulatory-respiratory insufficiency. Pathomorphological examination revealed in the myocardium, lungs, liver, kidneys and thyroid multiple purulent foci containing actinomycotic granules.

Neuropathological examination revealed both in the cortex and white matter the presence of numerous disseminate bodies staining intensively with HE, PAS- and Gram-Weigert positive and negative in the Ziehl-Nielsen method. Their structure, compact or fine-powdered corresponded to actinomyces colonies. They either showed no reaction or were surrounded by a wall of inflammatory cells such as: neutrophilic leucocytes, lymphocytes, plasmatic cells and histiocytes. The microabscesses were not encapsulated. The case was classified to a diffuse form of brain actinomycosis.

The etiopathogenesis of the changes and the clinical-morphological correlations of this very rare infectious disease of the central nervous system are discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Bolton Ch., Asenhurst E. M.: Actinomycosis of the brain. Case report and review of the literature. *Can Med Assoc J*, 1964, 90, 922-928.

2. Bowden G. H., Haride J. M.: Commensal and pathogenic actinomyces species in man. W: Actinomycetales. Characteristics and practical importance. Red. G. Sykes, F. A. Shinner, Academic Press, London, New York, 1973, 281–283.
3. Brucher, J. M., Dereymaeker A., Van de Voorde H.: Trois cas d'abels cérébraux actionomycotiques. *Acta Neurol Psychiatr Belg*, 1958, 58, 372–388.
4. Chen-Wei H.: Actinomycosis of the brain. Case report. *J Neurosurg*, 1985, 63, 131–133.
5. Cope Z.: Actinomycosis. Oxford University Press, London, 1938, cyt. za Chen-Wei, 1986.
6. Ponfick A. cyt. za Chen-Wei, 1985.
7. Schneider Rl., Rand R. W.: Actinomycotic brain abscess. Complete excision with recovery. *J Neurosurg*, 1949, 6, 255–259.
8. Tvede M., Bodenhoff J., Bruun B.: Actinomycotic infections of the central nervous system. Two case reports. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 1985, 93, 327–330.
9. Wickbom G. J., Davidson A. J.: Angiographic findings in intracranial actinomycosis. A case report and consideration of pathogenesis. *Radiology*, 1967, 88, 536–537.
10. Wierzbicka D.: Zakażenia grzybicze ośrodkowego układu nerwowego W: Podstawy neuropatologii, Red.: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender, PZWL, Warszawa, 1981, 332–337.

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

GRAŻYNA M. SZPAKOWA, EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO,
BOŻENA IWIŃSKA-BUKSOWICZ

WYBIÓRCZA GRZYBICA KROPIDLAKOWA MÓZGU (*ASPERGILLOSIS*) U CHOREJ Z PANCYTOPENIĄ

Zakład Neuropatologii oraz Klinika Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Aspergiloza mózgu należy do stosunkowo rzadkich schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN), na ogół przyżyciowo nierozpoznawanych (Aita 1964; Young i wsp. 1970; Palo i wsp. 1975; Mohandas i wsp. 1978; Scaravilli 1984). Początkowo sporadyczne doniesienia kazuistyczne w ostatnim dziesięcioleciu pojawiają się częściej. Za przyczynę nasilenia się grzybic układu nerwowego, w tym i aspergilozy uważa się szerokie zastosowanie antybiotyków, sterydów, cytostatyków bądź leków immunosupresyjnych. Leki te zakłócając procesy odpornościowe, torują drogę dalszym zakażeniom, a rozwój procesu grzybicznego najczęściej jest powikłaniem pierwotnie toczącego się schorzenia wyniszczającego ustrój.

OPIS PRZYPADKU

Chora, J.E. 1. 74 od wielu lat leczyla się ambulatoryjnie z powodu pancytopenii. W przebiegu choroby była kilka razy hospitalizowana, raz z powodu wylewu podpajęczynówkowego. Z dokumentacji hematologicznej wynika, że liczba krwinek białych we krwi obwodowej wahała się w granicach od 0,95 do 2,0 G/l, krwinek czerwonych od 1,7 do 3,3T/l, a płytek krwi od 6,6 do 30,8 G/l. W mielogramie szpiku stwierdzono stłumienie zarówno układu granulocytarnego, jak i erytroblastycznego, okresowo pobudzony był układ chłonny.

W leczeniu pancytopenii stosowano w dużych dawkach sterydy, cytostatyki i leki immunosupresyjne (Endoksan, Imuran) i przetaczanie krwi, operacyjnie usunięto śledzionę. Od czterech lat stwierdzono cukrzycę oraz objawy marskości wątroby. Na siedem dni przed zgonem wystąpiły u chorej silne bóle głowy i zaburzenia widzenia, wysoka temperatura do 40°C oraz stopniowo narastające zaburzenia świadomości. W piątym dniu choroby została przyjęta do I Kliniki Neurologicznej Instytutu Psychiatrii i Neurologii. Chora była

nieprzytomna, jedynie reakcja źrenic na światło, jak i reakcja na ból były zachowane. Stwierdzono ponadto dodatnie objawy oponowe, wzmożenie odruchów rozciągowych po stronie prawej oraz obustronny objaw Babińskiego. W drugiej dobie pobytu nastąpił zgon wśród objawów narastającej śpiączki mózgowej. Nakłucie lędźwiowe wykazało ropny płyn mózgowo-rdzeniowy ze wzmożoną ilością białka do 210 mg% i wybitną pleocytozą, krwinek białych było 1235 w ml: granulocytów obojętnochłonnych 88%, limfocytów 8%, a komórek monocytarnych 4%. Liczba krwinek czerwonych we krwi obwodowej wynosiła 5,04 T/l, a krwinek białych 15,8 G/l przy hematokrycie 0,42. W leczeniu zastosowano leki przeciwobrzękowe, antybiotyki oraz insulinę. Klinicznie rozpoznano zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, marskość wątroby i cukrzycę.

Badaniem sekcyjnym stwierdzono marskość wątroby, zapalenie mięszu nerek, liczne świeże owrzodzenia śluzówki żołądka i dwunastnicy oraz zwłóknienie mięśnia sercowego. Zmian grzybiczych w narządach wewnętrznych nie stwierdzono.

Badanie neuropatologiczne.

Sekcja mózgu wykazała objawy obrzęku ze spłaszczeniem zakrętów i zaciśnięciem rowków, z wgłobieniem obu haków zakrętów hipokampa, jak i migdałków mózdzku oraz zaciśnięciem układu komorowego. Opony były pogrubiałe, a na powierzchni podstawnej obu płatów czołowych i biegunów skroniowych oraz w rejonie zbiorników podstawy, szaro-brunatno zabarwione. Na przekrojach czołowych zwracało uwagę szarawo-zielonkawe zabarwienie kory i istoty białej płatów czołowych, zwłaszcza zakrętów oczodołowych, jąder ongiastych i soczewkowatych oraz wzgórz. Ponadto, stwierdzono rozsiane



Ryc. 1. Symetryczna martwica w zwojach podstawy. Klüver-Barrera. Pow. lupowe
 Fig. 1. Symmetric necrosis in basal ganglia. Klüver-Barrera. Magn. glass

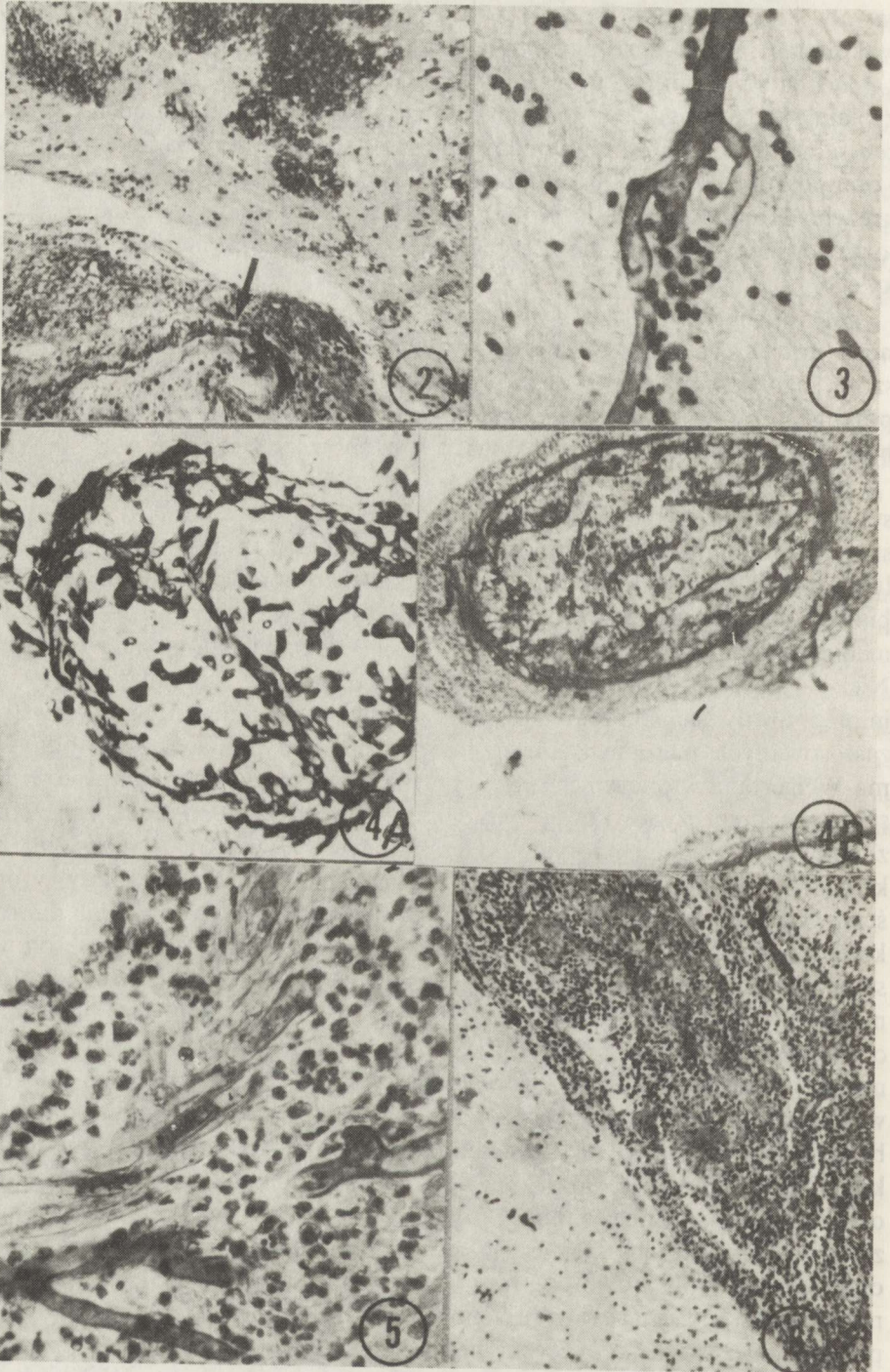
zawały krwotoczne w korze i istocie białej zakrętów oczodołowych oraz w konarze mózdzku środkowym lewym.

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z obu płatów czołowych, z płata skroniowego lewego, z przednich i tylnych zwojów podstawy (bloki centralne) ze strukturami amonalnymi oraz ze śródmózgowia, mostu, opuszki i obu półkul mózdzku. Po zatopieniu w parafinie skrawki zabarwiono fioletem krezyłu, HE, PAS, metodą Grama-Weigerta, van Gieson, Spielmeyera, Mallory'ego oraz zastosowano impregnację solami srebra metodą Bielschowsky'ego.

W obrazie mikroskopowym mózgu dominującym zjawiskiem była obecność mikrozakrzepów w świetle licznych naczyń oponowych i śródmiaższowych oraz rozległych, częściowo ukrwotocznionych pól martwicy w obu półkulach mózgu (ryc. 1). W ich obszarze widoczne były liczne rozsiane mikroropnie, a na obrzeżu martwicy występowały ziarniniaki.

W oponie pajęczej i w przestrzeni podpajęczynówkowej zbiorników podstawy, zwłaszcza zbiornika okalającego oraz w bruzdach bocznych mózgu stwierdzono zbity, a miejscami rozproszony naciek zapalny zawierający mniej lub bardziej dojrzałe leukocyty wielojądrzaste, komórki plazmatyczne, krwinki białe kwasochłonne oraz nitkowate twory dobrze widoczne już w HE (ryc. 2), niebiesko zabarwione, szerokie i rozgałęzione z ciemniejszą błoną komórkową. Nici te posiadały przegrody charakterystyczne dla kropidlaków (ryc. 3), impregnowały się srebrem (ryc. 4a) i barwiły się dodatkowo we wszystkich zastosowanych metodach, szczególnie intensywnie granatowo metodą Grama-Weigerta, a w odczynie PAS – purpurowo. Naczynia krwionośne w przestrzeni podpajęczynówkowej były najczęściej wypełnione mikrozakrzepami zbudowanymi z nici kropidlaka, granulocytów i włóknika (ryc. 4b). Nici kropidlaka układały się okrężnie w mięśniówce tętnic i przenikały poprzez ściany naczyń do przestrzeni podpajęczynówkowej (ryc. 5). Podobne mikrozakrzepy z niemi kropidlaka obserwowano również w świetle naczyń śródmiaższowych zarówno tętnicznych, jak i żylnych, zwłaszcza w istocie białej okołokomorowej oraz w jądrach podstawy (ryc. 6). W obszarach unaczynienia tętnic o świetle zamkniętym przez zakrzepy obserwowano rozległe martwice obejmujące korę i istotę białą obu płatów czołowych, zwoje podstawy i torebkę wewnętrzną, boczne jądra wzgórza i zakręty hipokampa obustronnie oraz boczną część podstawy mostu wraz z konarem mózdzku środkowym, a także konar mózdzku dolny po stronie lewej. Nasilenie uszkodzeń tkanki w tych obszarach było różne. Obok pól martwicy obrzękowej z mikroropniami zawierającymi kropidlaki (ryc. 7), lub nici kropidlaka bez odczynu zapalnego, obserwowano pola wybiórczej martwicy kwasochłonnej neuronów oraz ubytki neuronalne, pola martwicy skrzepowej, bądź bezodczynowej martwicy rozplywnej, miejscami ukrwotocznionej. Ściany naczyń w tych obszarach uległy martwicy włóknikowatej, otaczająca je tkanka nasycona była włóknikiem (ryc. 8), a w świetle naczyń oprócz zakrzepów obserwowano także wykrzepianie.

Obecności nici kropidlaka w tkance nerwowej towarzyszył na ogół znaczny



odczyn komórkowy z mniej lub bardziej dojrzałych leukocytów tworzących zarówno mikroropnie, jak i mikrozakrzepy (ryc. 9), natomiast w okołonaczyniowych lub rozsianych w tkance ziarniniakach na obrzeżu martwic oraz w zwojach podstawy i w części podstawnej mostu, przeważały komórki olbrzymie Langhansa bądź typu ciała obcego i komórki jednojądrzaste (ryc. 10). Niekiedy komórki olbrzymie fagocytowały nici kropidlaka (ryc. 11).

Poza polami nacieków i martwic obecne były w istocie białej nagie jądra i pojedyncze astrocyty tuczne, w dalszych zaś warstwach kory dominowała wzmrożona satelitoza. Zachowane neurony były zmienione, przeważały obrazy schorzenia przewlekłego neuronów. Ściany naczyń, zwłaszcza tętniczek były zwłókniałe, z tendencją do zwężenia światła III°. Obecne były kłęбки naczyniowe.

W obu półkulach mózdzku i w robaku stwierdzono znaczne przerzedzenie neuronów warstwy ziarnistej, gdzie komórki wykazywały nierównomierną impregnację solami srebra (ryc. 12). Wokół dna rowków obserwowano znaczne ubytki komórek Purkinjego; zachowane komórki często były zmienione homogenicznie, a ich dendryty były obrzmiałe. W obszarach tych uległ pobudzeniu glej gwiazdzisty Bergmanna (ryc. 12).

Ryc. 2. Nici kropidlaka (strzałka) w nacieku zapalnym w oponach. HE. Pow. 100 ×

Fig. 2. *Aspergillus hyphae* (arrow) in meningeal inflammatory infiltration. HE. × 100

Ryc. 3. Nić kropidlaka z przegrodami. HE. Pow. 400 ×

Fig. 3. *Aspergillus hypha* with septa. HE. × 400

Ryc. 4. Nici kropidlaka w zakrzepie i w ścianie tętnicy mózgu środkowej. A. Bielschowsky, Pow. 200 ×. B. PAS. Pow. 100 ×

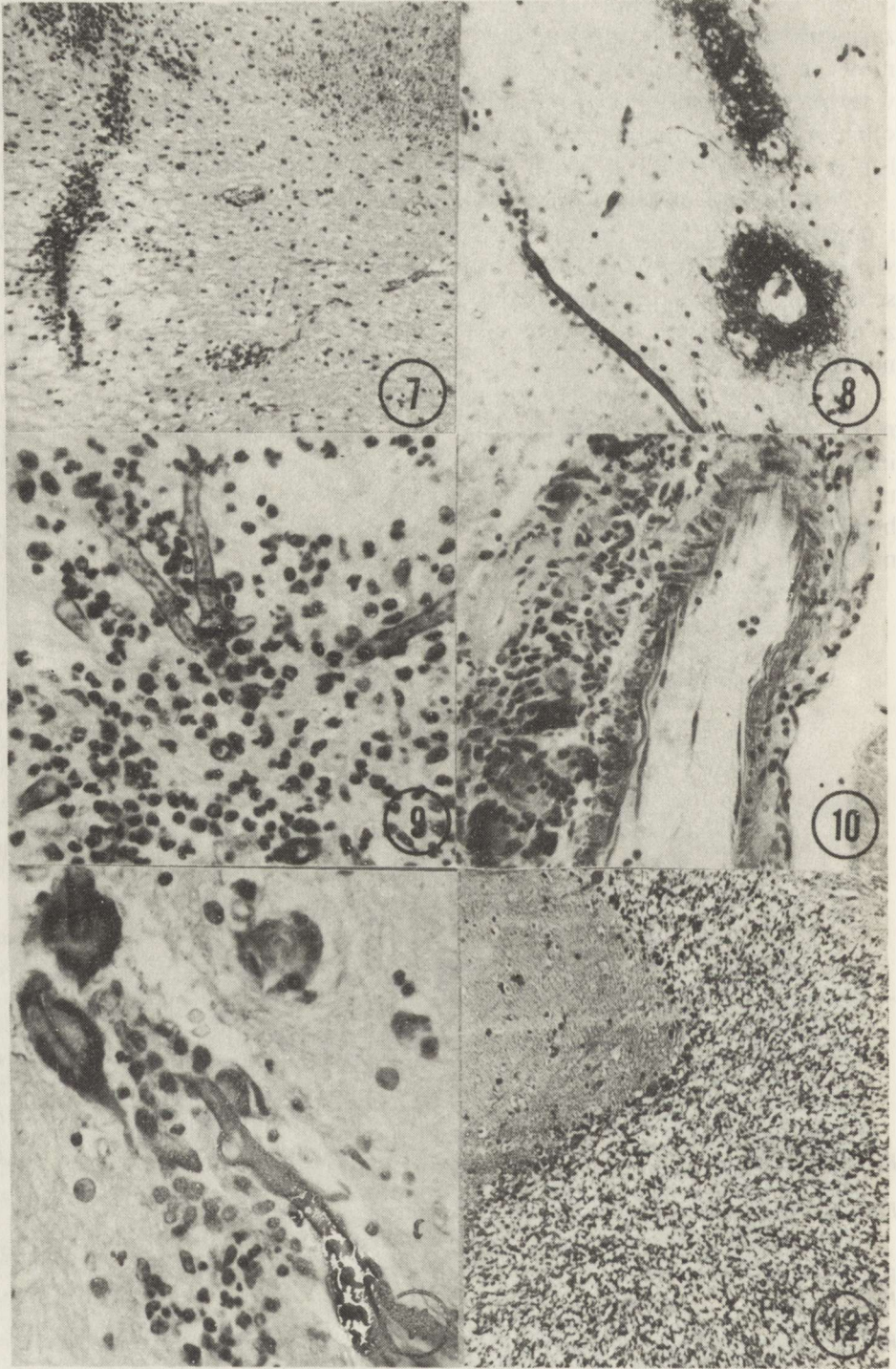
Fig. 4. *Aspergillus hyphae* in thrombus and in wall of middle cerebral artery. A. Bielschowsky. × 200. B. PAS. × 100

Ryc. 5. Nici kropidlaka przechodzące przez ścianę tętnicy do nacieku zapalnego. HE. Pow. 400 ×

Fig. 5. *Aspergillus hyphae* penetrate through arterial wall to inflammatory infiltration. HE. × 400

Ryc. 6. Zakrzep z nićmi kropidlaka w świetle żyły śródmiąższowej otoczonej naciekiem zapalnym. HE. Pow. 100 ×

Fig. 6. Thrombus with *aspergillus hyphae* in lumen of interstitial vein, surrounded by inflammatory infiltration. HE. × 100



OMÓWIENIE

W przedstawionym przypadku rozpoznaliśmy grzybicę kropidlakową mózgu zarówno na podstawie struktury nici grzyba, typowej dla pleśni z rodzaju *Aspergillus*, jak i na podstawie jego rozprzestrzeniania się w tkance mózgu oraz charakteru wywołanych przez niego zmian odczynowych. Szerokie i rozgałęziające się nici kropidlaka barwiące się dodatnio HE, metodą Gram-Weigerta oraz PAS, impregnowały się solami srebra i zawierały przegrody, co pozwoliło na odróżnienie ich od drożdżaków czyli fykomykozy (Wierzbicka 1981). Typowy był także sposób rozprzestrzeniania się kropidlaków. Przenikały one przez ściany naczyń uszkadzając śródbłonek i błonę wewnętrzną, powodowały powstawanie zakrzepów przyściennych, które niekiedy zamykały całe światło naczynia i prowadziły do powstania martwicy; mogły być również źródłem zatorów. Na uwagę zasługuje fakt, że zmiany grzybicze w naszym przypadku dotyczyły wyłącznie OUN. Wybiórcze zakażenie mózgu kropidlakiem jest bardzo rzadkie (Wierzbicka 1981), przeważnie, bo aż w 60–70% przypadków, obserwuje się je w przebiegu rozsianych, wielonarządowych ognisk aspergilozy (Grcevic, Methews 1959; Carbone i wsp. 1964). Wrota zakażenia zarówno u człowieka, jak i u zwierząt doświadczalnych stanowią najczęściej zatoki przynosowe, oczodoły, uszy lub płuca skąd infekcja drogą krwiopochodną rozprzestrzenia się do OUN (Young i wsp. 1970; Warder i wsp. 1975; Hedges, Leung 1976). W niektórych przypadkach, podobnie jak w naszym, nie udaje się ustalić źródła zakażenia OUN (Linares i wsp. 1971). Badania doświadczalne (Scholler 1962; Schieffer 1967; Issel 1971) oraz doniesienia kliniczne (Louria i wsp. 1967; Hart i wsp. 1969 oraz Meyer i wsp. 1973)

Ryc. 7. Mikroropnie z kropidlakami w polu martwicy. HE. Pow. 100 ×
 Fig. 7. Microabscesses with aspergilli in area of necrosis. HE. × 100

Ryc. 8. Martwica włóknikowata naczyń śródmiaższowych. Gram-Weigert. Pow. 200 ×
 Fig. 8. Fibrinoid necrosis of interstitial vessels. Gram-Weigert. × 200

Ryc. 9. Mikroropień z nićmi kropidlaka. H.E. Pow. 400 ×
 Fig. 9. Microabscess with aspergillus hyphae. HE. × 400

Ryc. 10. Ziarniniak okołonacyniowy z komórkami olbrzymimi. HE. Pow. 200 ×
 Fig. 10. Perivascular granuloma with giant cells. HE. × 200

Ryc. 11. Komórki olbrzymie ze sfagocytowanymi nićmi kropidlaka. HE. Pow. 400 ×
 Fig. 11. Giant cells phagocytising aspergillus hyphae. HE. × 400

Ryc. 12. Ubytki komórek Purkinjego i rozplem gleju Bergmanna oraz znaczne przerzedzenie warstwy ziarnistej mózdzku. Bielschowsky. Pow. 100 ×
 Fig. 12. Loss of Purkinje cells and Bergmann glia proliferation, greatly rarefied granular layer. Bielschowsky. × 100

wskazują, że przyczyną zakażenia OUN mogą być również niedostatecznie sterylne igły oraz cewniki stosowane do infuzji i transfuzji krwi oraz przy przetaczaniu leukocytów bądź płytek krwi. Opisywano także zainfekowanie krwi podczas operacji zastawek serca (Gage i wsp. 1970), czy transplantacji nerek i serca (Hart i wsp. 1969; Stinson i wsp. 1971) przez powietrze, zawierające kropidlaki.

W przedstawionym przez nas przypadku doszło najprawdopodobniej do krwiopochodnego wybiórczego zakażenia OUN kropidlakami. Świadczy o tym obecność kropidlaka w świetle i ścianie naczyń oraz przewaga zmian zapalnych i martwiczych w istocie szarej posiadającej dużo bogatszą sieć włóśniczek, niż istota biała.

Aspergiloza mózgu w naszym przypadku przebiegała klinicznie bardzo burzliwie pod obrazem zapalenia opon z narastającymi zaburzeniami przytomności. Obecność zaś w mózgu licznych rozsianych ziarniaków i mikroropni oraz rozległych martwic w rejonie unaczynienia naczyń zajętych zakrzepami, nie manifestowała się wyraźnym zespołem ogniskowym. Obserwowane w naszym przypadku liczne mikroropnie zawierające nici kropidlaka i leukocyty wielojądrzaste, opisywane są głównie w przebiegu ostrych infekcji, natomiast występowanie ziarniaków pojedynczych bądź jak w naszym przypadku, rozsianych na obwodzie martwic, wiązane jest zazwyczaj z przewlekłym zakażeniem (Fetter i wsp. 1967; Linares i wsp. 1971; Scaravilli 1984). Dość rzadko natomiast dochodzi do rozległego zajęcia opon mózgowo-rdzeniowych (Mukoyama i wsp. 1969; Kaufman i wsp. 1976; Mohandas i wsp. 1978). Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi aspergilozy mózgu mogło być w naszym przypadku zarówno samo schorzenie podstawowe (pancytopenia), jak i przewlekłe leczenie serydami, cytostatykami i lekami immunosupresyjnymi.

U podłoża zespołów mielodysplastycznych (dysmielopoetycznych), do których należy występująca u chorej wieloletnia pancytopenia (Konecki 1987; Hołowiecki 1988) leży prawdopodobnie zaburzenie odpowiedzi immunologicznej. Zespoły te opisywane są często jako przedbiałczkowe. Bardzo częste współistnienie aspergilozy wielonarządowej z białaczką, wahające się od 60 do 90%, podkreślają Hutter i wsp. (1962), Carbone i wsp. (1964) oraz Meyer i wsp. (1973). W zestawieniu Younga i wsp. (1970) wszystkie przypadki aspergilozy mózgu towarzyszące chorobie nowotworowej obserwowano w przebiegu białaczek bądź chłoniaków. Sterydy wzmagając stabilizację błon komórkowych zapobiegają uwalnianiu się enzymów lizosomalnych, a więc i niszczeniu fagocytowanych w czasie infekcji grzybów bądź bakterii (Hart i wsp. 1969). Iwata i wsp. (1961) wykazali kiełkowanie nici kropidlaka z zarodników sfagocytowanych przez leukocyty zwierząt leczonych uprzednio serydami. Imuran zaburza zarówno pierwotną, jak i wtórną odpowiedź immunologiczną (Swanson, Schwartz 1964). Obserwowane ponadto w naszym przypadku zwyrodnienie warstwy ziarnistej kory mózdzku odpowiada zmianom paraneoplastycznym opisywanym w białaczkach. Przyczyną tego zwyrodnienia mógł być też deficyt odżywczy w przebiegu długotrwałej niedokrwistości.

ASPERGILLOSIS IN THE BRAIN OF PATIENT WITH PANCYTOPENIA

Summary

The here presented case concerns a 74-year-old woman treated for many years with steroids and immunosuppressive drugs during pancytopenia. Seven days before her death she developed severe headaches and visual disorders, rapidly increasing disturbances of consciousness and a temperature of 40°C. The course of the disease was violent with meningeal syndrome and cerebral coma. The cerebrospinal fluid was purulent, pleocytosis 1235/ml, with prevalence of polymorphonuclear leucocytes (88%) and an protein level increased to 210 mg%. In autopsy no mycotic changes were found in the internal organs whereas in microscopic examination of the brain the dominant finding was the presence of numerous filamentous bodies with septa characteristic of aspergillus which were visible both in microthrombi in the lumen of meningeal and interstitial vessels and in the areas of extensive necroses in both cerebral hemispheres and the brain stem as well as within granulomas occurring on the edges of necrotic foci and in the inflammatory infiltration of the brain base meninges. The presence of aspergillus hyphae was usually associated with a severe inflammatory reaction of polymorphonuclear leucocytes, acidophilic and plasmatic cells in microabscesses and in the inflammatory infiltration of meninges or in the form of granulomas composed mainly of multinucleated giant cells of Langhans or of foreign body type and mononuclear cells.

The etiopathogenesis of these changes is discussed. The role of the facilitating factor could have been played by protracted therapy with steroids and immunosuppressive drugs and/or by pancytopenia itself which is probably associated with abnormal immunological response. Noteworthy is the fact that the seldom described mycotic changes caused by aspergillus concerned in the present case the central nervous system exclusively.

PIŚMIENICTWO

1. Aita J. A.: Neurologic manifestations of fungal infections. W: Neurologic manifestations general diseases. Red. Charles C. Thomas, Springfield, Publs Illinois, 1964, 706–734.
2. Carbone P. P., Sebesin S. M., Sidransky H., Frei E.: Secondary aspergillosis. *Ann Intern Med*, 1964, 60, 556–567.
3. Fetter B. F., Klinworth G. K., Hendry W.: Mycosis of the central nervous system. Williams and Wilkins, Baltimore, 1967.
4. Gage A. A., Dean D. C., Schmiert G., Minsley N.: Aspergillosis infection after cardiac surgery. *Arch Surg*, 1970, 101, 384–387.
5. Greevic N., Matthews W. F.: Pathologic changes in acute disseminated aspergillosis, particularly involvement of the central nervous system. *Am J Clin Pathol*, 1959, 32, 536–551.
6. Hart P. D., Russel E., Remington J. S.: The compromised host and infection. Deep fungal infection. *J Infect Dis*, 1969, 120, 169–191.
7. Hedge T. R., Laisung E., Leung M. D.: Parasellar and orbital apex syndrome. *Neurology*, 1976, 26, 117–120.
8. Hołowiecki J.: Zespoły dysmielopoetyczne - DMS. W: Choroby wewnętrzne. Red. F. Kokot. PZWL, Warszawa, 1988, 1, 389–391.
9. Hutter R. V. P., Lieberman P. H., Collins H. S.: Aspergillosis in cancer hospital, *Cancer*, 1964, 17, 747.
10. Issel W.: Über den Befall des Zentralnervensystems mit *Candida albicans*, *Arzneimittelforschung*, 1971, 85, 34–43.
11. Iwata K., Adadagucki S., Yonekura T.: Influence of adrenal cortex hormones on phagocytoses. I. Studies on phagocytosis of *Aspergillus* spores by leukocytes *in vitro*. II. Studies on effects of cortisone on phagocytoses of *Aspergillus* spores by leukocytes. *Jpn Bact*, 1961, 16, I. 21–25, II. 210–215.

12. Kaufman D. M., Thol L. J., Farmer P. M.: Central nervous system aspergillosis in two young adults. *Neurology*, 1976, 26, 484–488.
13. Konecki R.: Zespoły mielodysplastyczne. W: Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego i limfatycznego. Red.: Z. Kuratowska. Centr. Med. Szkol. Podyplom., Warszawa, 1987, 1, 206–242.
14. Linares G., MacGary P., Baker R.: Solid solitary aspergillotic granuloma of the brain. *Neurology*, 1971, 21, 177–184.
15. Louria D. B., Boevins A., Armstrong D., Burdick R., Lieberman P. H.: Fungemia caused by "nonpathogenic" yeasts: *Arch. Intern Med*, 1967, 119, 247–252.
16. Meyer R. D., Young L. S., Armstrong D., Yu B.: Aspergillosis complicating neoplastic disease. *Am J Med*, 1973, 54, 6–15.
17. Mohandas S., Ahuja G. K., Sodd V. P., Virmani V.: Aspergillosis of the central nervous system. *I Neurosci*, 1978, 38, 299–233.
18. Mukoyama M., Gimple K., Poser C.: Aspergillosis of the central nervous system. *Neurology*, 1969, 19, 967–974.
19. Palo J., Haltia M., Kutela T.: Cerebral aspergillosis with special reference to cerebrospinal fluid findings. *Eur Neurol*, 1975, 13, 224–231.
20. Scaravilli F.: Parasitic and fungae infections of the nervous system. W: Greenfield's neuropathology. Red.: J. H. Adams, J. A. N. Corsellis, L. W. Duchen, E. Arnold, London, 1984, 304–337.
21. Schieffer 1967, cyt. za Issel 1971.
22. Scholer H. J.: Experimentelle Aspergillose der Maus (*Aspergillus fumigatus*) und ihre chemotherapeutische Beeinflussung. *Schweiz Z Allg Pathol. Bakteriol*, 1959, 22, 564.
23. Stinson E. B., Bieber Ch. P., Griep R. B., Clark D. A., Shumway N. E., Remington J. S.: Infectious complication after cardiac transplantation in man. *Ann Intern Med*, 1970, 74, 22–36.
24. Swanson M. A., Schwartz R. S.: Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence. *N Engl J. Med*, 1967, 227, 163–170.
25. Warder F. R., Chikes P. G., Herdson W. R.: Aspergillosis of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol*, 1975, 101, 683–685.
26. Wierzbicka D.: Zakażenia grzybicze ośrodkowego układu nerwowego W: Podstawy neuropatologii. Red.: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender, PZWL, Warszawa 1981, 332–346.
27. Young R. C., Bennet J. E., Vogel Ch. L., Carbone P. P., De Vita V. I.: Aspergillosis: the spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine*, 1970, 49, 147–173.

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

WIELISŁAW PAPIERZ, BOLESŁAW LACH

ULTRASTRUCTURE OF THE SARCOMATOUS COMPONENT IN GLIOSARCOMAS

Department of Pathological Anatomy, Institute of Pathology, School of Medicine, Łódź, Poland
Department of Laboratory Medicine, Division of Pathology Neuropathology, Ottawa Civic
Hospital and University of Ottawa, Ontario, Canada

In recent years interest has been revived in a group of brain tumors, in which both gliomatous and sarcomatous elements are found in contiguity. The initial description of mixed glio-mesenchymal tumors was given by Stroebe (1895), who used the term gliosarcoma (GS). GS is considered to originate from the development of sarcoma in glioblastoma multiforme or poorly differentiated astrocytoma (Wislawski 1970; Morantz et al. 1976) and rarely in anaplastic oligodendroglioma (Rubinstein 1972; Feigin et al. 1976; Pasquier et al. 1978). Lalitha and Rubinstein (1979) have also postulated the existence of reactive gliomas in primary intracranial sarcomas.

The mechanism involving malignant transformation of mesenchymal tissue as well as the cellular origin of the sarcomatous component in GS are still poorly understood. It is usually suggested however, that the mesenchymal part originates from proliferating vessels (Feigin et al. 1958; Smith et al. 1969; Rubinstein 1972; Morantz et al. 1976). Ultrastructural studies on GS showed, that endothelial and fibroblastic cells constitute the sarcomatous part of these tumors (Pena, Felter 1973; Slowik et al. 1985). We present some ultrastructural data, that myofibroblast-like cells contribute also to this component of GS.

MATERIAL AND METHODS

Surgical material from 11 cases of GS was studied. Main clinicopathological data concerning the examined cases are summarized in Table 1. Samples from different parts of each tumor were fixed in 4% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer at 4°C, washed in the same buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Epon 812. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined in JEM 100 B and Siemens 200 electron

Table 1. Clinicopathological data concerning examined cases
 Tabela 1. Dane kliniczno-morfologiczne dotyczące badanych przypadków

Case Przyp.	Age Wiek	Sex Płeć	Location Lokalizacja	Extirpation Wycięcie	Survival Czas przeżycia	Dominant component Dominujący składnik	Leptomeningeal invasion Naciekanie opon miękkich
1.	45	F	R, P	total całkowite	3 months miesiące	sarcomatous mięsakowy	yes tak
2.	72	M	L, Fr, T, O	partial częściowe	1 week tydzień	sarcomatous mięsakowy	yes tak
3.	57	M	L, Fr, T	total całkowite	3 months miesiące	gliomatous glejakowy	yes tak
4.	78	M	L, T	total całkowite	6 months miesiące	sarcomatous mięsakowy	yes tak
5.	53	M	L, T, P	total całkowite	2 months miesiące	sarcomatous mięsakowy	yes tak
6.	57	M	L, T, P	partial częściowe	3 months miesiące	gliomatous glejakowy	no nie
7.	45	M	L, Fr, T, O	partial częściowe	several days kilka dni	gliomatous glejakowy	yes tak
8.	59	M	R, Fr, T	partial częściowe	1 month miesiąc	gliomatous glejakowy	no nie
9.	62	M	L, Fr, T, O	partial częściowe	2 month miesiące	gliomatous glejakowy	no nie
10.	60	M	R, T, O	partial częściowe	several days kilka dni	gliomatous glejakowy	no nie
11.	41	F	L, Fr	partial częściowe	6 month miesiące	gliomatous glejakowy	no nie

Explanations: M – male, F – female, R – right hemisphere, L – left hemisphere, Fr – frontal lobe, P – parietal lobe, T – temporal lobe, O – occipital lobe

Objaśnienia: M – mężczyzna, F – kobieta, R – prawa półkula, L – lewa półkula, Fr – płat czołowy, P – płat ciemieniowy, T – płat skroniowy, O – płat potyliczny

microscopes. For EM study, blocks containing seemingly fibroblastic tissue suggesting its mesenchymal origin, as observed in semithin sections, were selected.

For light microscopy the following methods were applied: H + E, PTAH, Gordon-Sweet, Cajal and immunostainings (PAP method) for glial fibrillary acidic protein (GFAP), fibronectin (FN), and factor VIII related antigen (F VIII RAg). Results of immunohistochemical examination will be published separately.

RESULTS

Light microscopy

All tumors had microscopically two distinct tissue components:

1. Gliomatous (generally GFAP-positive), which revealed a pattern of glioblastoma (6 cases), anaplastic astrocytoma (4 cases) and anaplastic oligodendroglioma (1 case).

2. Mesenchymal (generally FN positive) – composed of fusiform cells with irregular, usually elongated nuclei. The cells were arranged in clusters or parallel rows. Cellular atypia and mitotic figures were often seen. Reticulin and collagen fibers were abundant.

The gliomatous part of the tumors showed marked proliferation of blood vessels with endothelial buds and glomeruli. The vascular network in the sarcomatous portion revealed slit-like vessels with ill-defined walls. All neoplasms showed areas, in which both morphological components were intermingled. In others one of them dominated. In four cases the tumors were mostly sarcomatous. There was no adhesion to the dura mater, however, in six cases infiltration of leptomeninges was seen. Necrosis was often found in both parts of the tumor.

Electron microscopy

The sarcomatous part of the GS in the examined tumors was polymorphocellular. Several types of neoplastic cells could be distinguished:

1. A characteristic feature of all tumors was marked endothelial hyperplasia. Proliferating cells formed complexes of immature, atypical vessels. Many of them showed only a rudimentary lumen (Fig. 1). Irregular, densely packed clusters of endothelial-like cells were also found, mainly in the proximity of proliferating vessels. The cells had large, indented nuclei, usually with a prominent nucleolus, large perikaryon which showed a well developed Golgi system, moderately abundant rough endoplasmic reticulum and mitochondria. Some of the cells showed interdigitation of adjacent plasma membranes and intercellular junctions (Fig. 2). Discontinuous membrane-like material was found around most cells.

2. Spindle-shaped, fibroblastic cells. These cells had an elongated nucleus with prominent nucleolus, moderately developed rough endoplasmic reticulum with short cisternae, and cytoplasmic vacuoles (Fig. 4). Many vacuoles and dilated RER cisternae were filled with flocculent material (Fig. 3). There were bundles of collagen fibers within the extracellular space, often in close contact with the cell membrane. The fibroblast-like neoplastic cells were found in nine of the examined tumors.

3. Cells showing features of myofibroblasts. These cells were found in eight cases. The cell body was elongated, and the cytoplasm revealed lysosomes and mitochondria as well as abundant rough endoplasmic reticulum, with cisternae

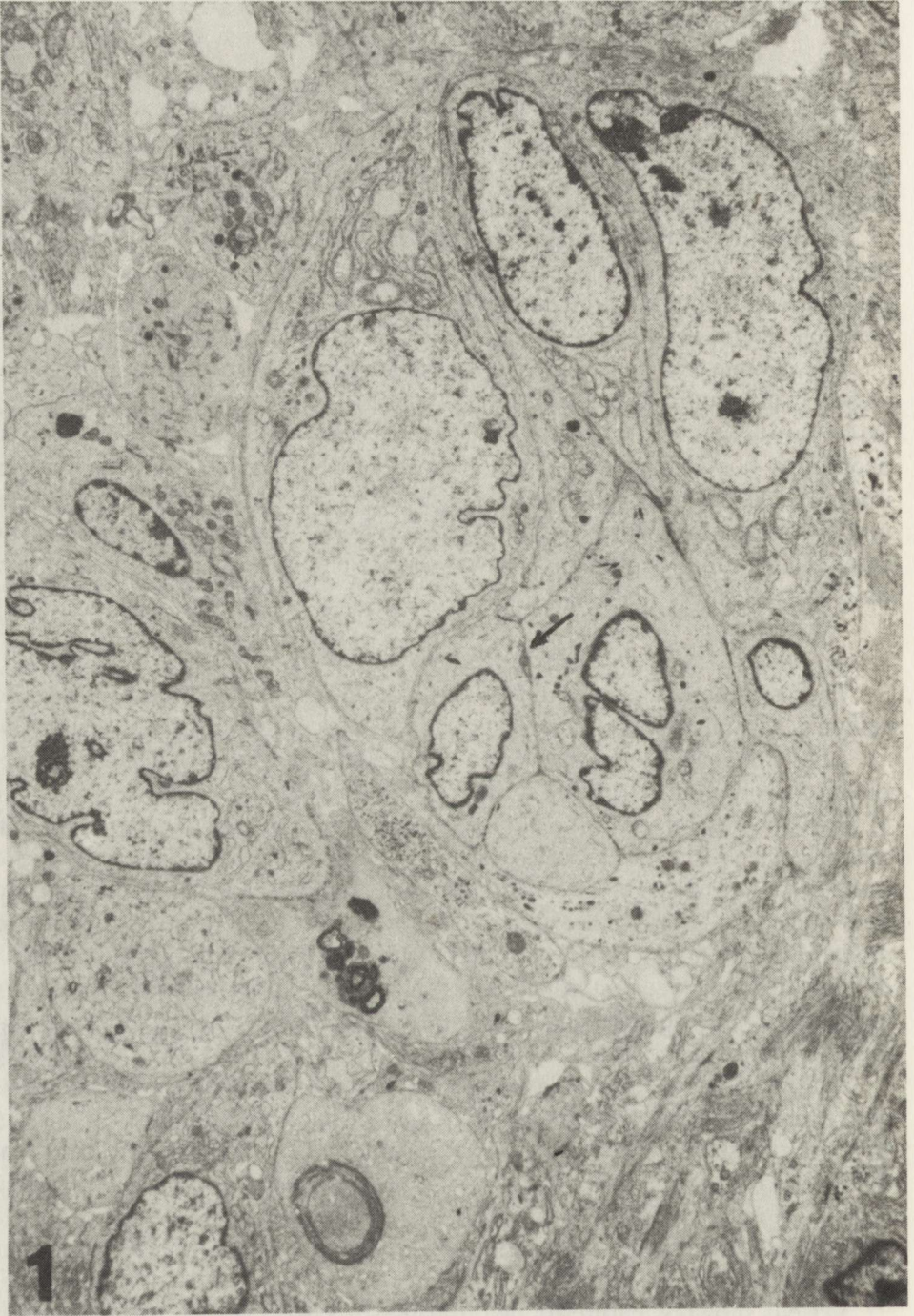


Fig. 1. Case 3. An atypical blood vessel with marked proliferation of endothelial cells. Note rudimentary lumen (arrow). $\times 5\,500$

Ryc. 1. Przyp. 3. Atypowe naczynie krwionośne ze znaczną proliferacją komórek śródbłonna. Szczałkowe światło naczynia oznaczono strzałką. Pow. $5\,500\times$

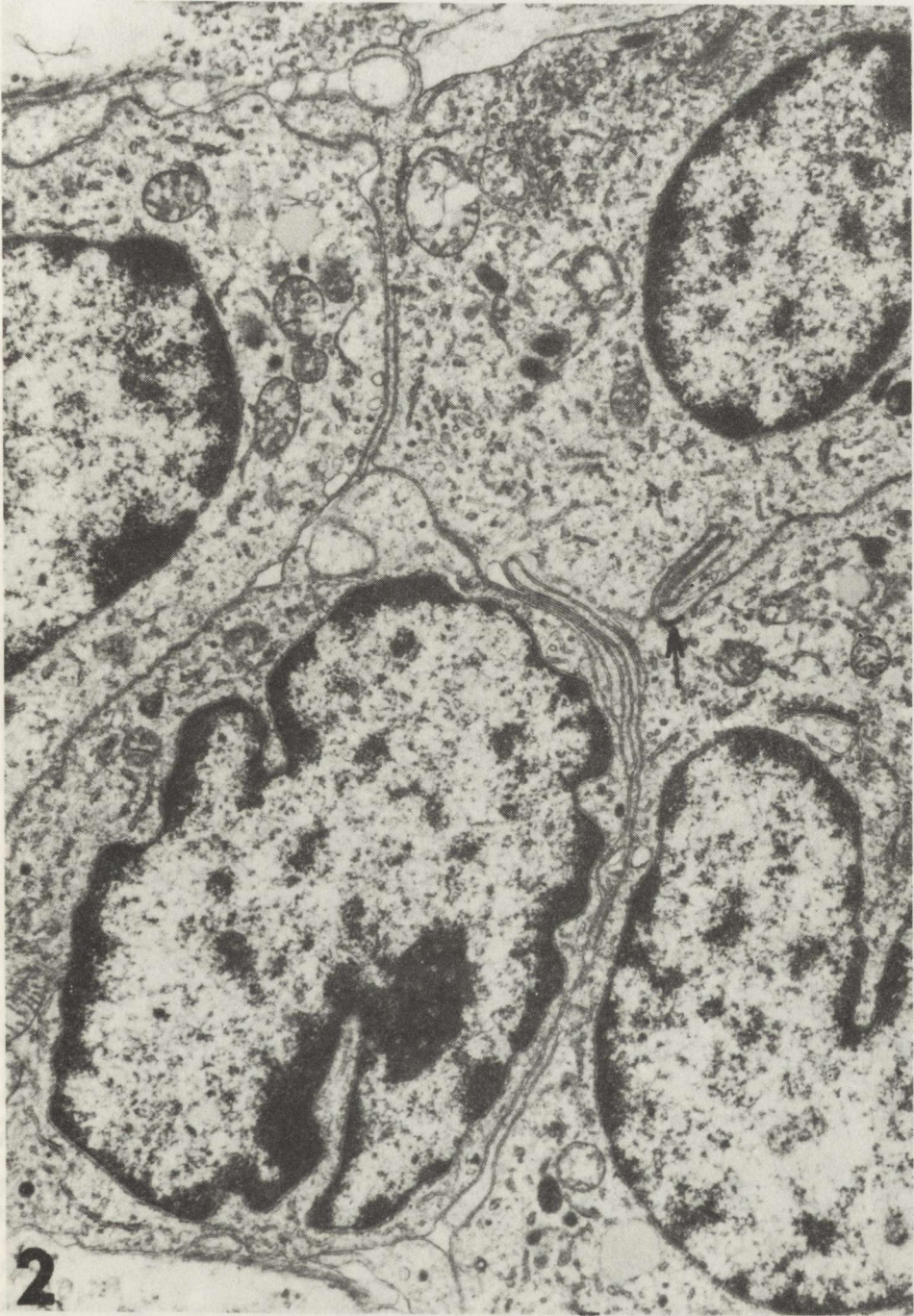


Fig. 2. Case 4. A group of immature endothelial-like cells. Note interdigitations of adjacent plasma membranes and intercellular junction (arrow). $\times 13\,000$

Ryc. 2. Przyp. 4. Grupa niedojrzałych komórek śródbłonkopodobnych. Zwraca uwagę pofałdowanie i wzajemne przeplatanie błon sąsiadujących komórek. Strzałką oznaczono złącze międzykomórkowe. Pow. $13\,000\times$



Fig. 3. Case 7. A fragment of fibroblastic cell. Extremely dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum contains flocculent material. There are numerous collagen fibers within extracellular space close to the cell. $\times 21\,500$

Ryc. 3. Przyp. 7. Fragment komórki fibroblastycznej. Znacznie poszerzony kanał ziarnistej siateczki śródplazmatycznej jest wypełniony kłaczkowatym materiałem. W przestrzeni pozakomórkowej widoczne liczne włókna kolagenu. Pow. $21\,500\times$



Fig. 4. Case 10. A fibroblast-like cell. Nucleus is smooth and oval. Relatively scanty cytoplasm shows short cisternae of endoplasmic reticulum and vacuoles. $\times 5000$

Ryc. 4. Przyp. 10. Komórka nowotworowa przypominająca fibroblast. Jądro jest owalne, a jego błona nie wykazuje wgłębień. W miernie rozwiniętej cytoplazmie widoczne są krótkie kanały siateczki śródplazmatycznej oraz wodniczki. Pow. 5000 \times

Fig. 5. Case 8. A neoplastic cell shows myofibroblastic differentiation; abundant dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum, mitochondria, few lysosomes and bundles of microfilaments with delicate densities (arrows) situated at the periphery of the cytoplasm. $\times 9500$

Ryc. 5. Przyp. 8. Komórka nowotworowa z cechami różnicowania miofibroblastycznego. W cytoplazmie widoczna obfita ziarnista siateczka śródplazmatyczna o poszerzonych kanałach, nieliczne lizosomy, mitochondria. W pobliżu błony komórkowej znajdują się wiązki włókienek, ogniskowo silnie rozpraszające elektrony (strzałki). Pow. 9500 \times

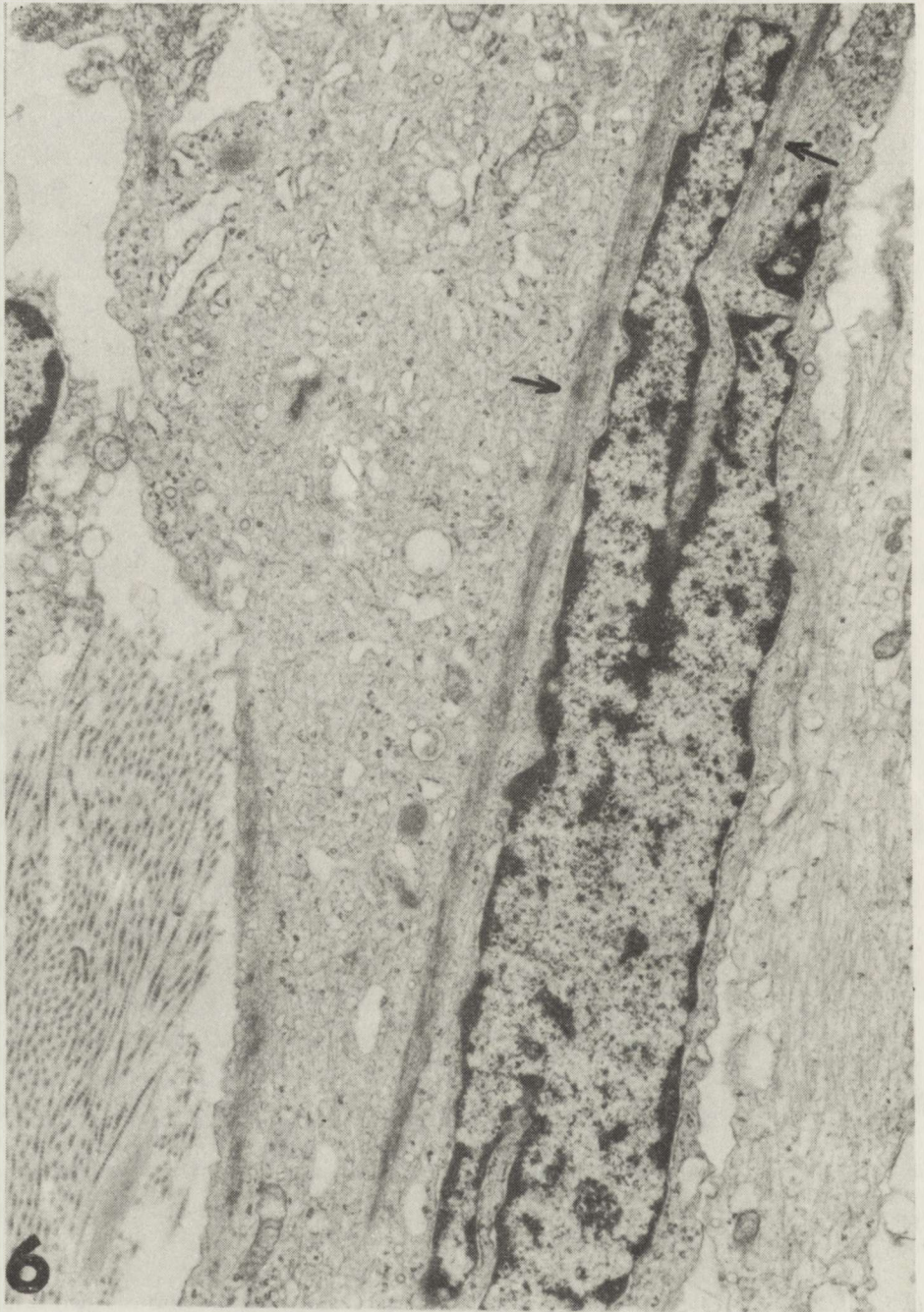


Fig. 6. Case 10. A myofibroblastic cell with bundles of filaments (arrows) and numerous densities. The nucleus is oval and has an irregular contour. Note collagen fibers in extracellular space. $\times 13\ 700$

Ryc. 6. Przyp. 10. Komórka miofibroblastyczna z pęczkami filamentów wykazujących ogniskowo charakterystyczne zagęszczenia (strzałki). Jądro ma kształt owalny i wyraźne wgłobienia błony. W przestrzeni okołokomórkowej znajdują się liczne włókna kolagenowe. Pow. $13\ 700 \times$

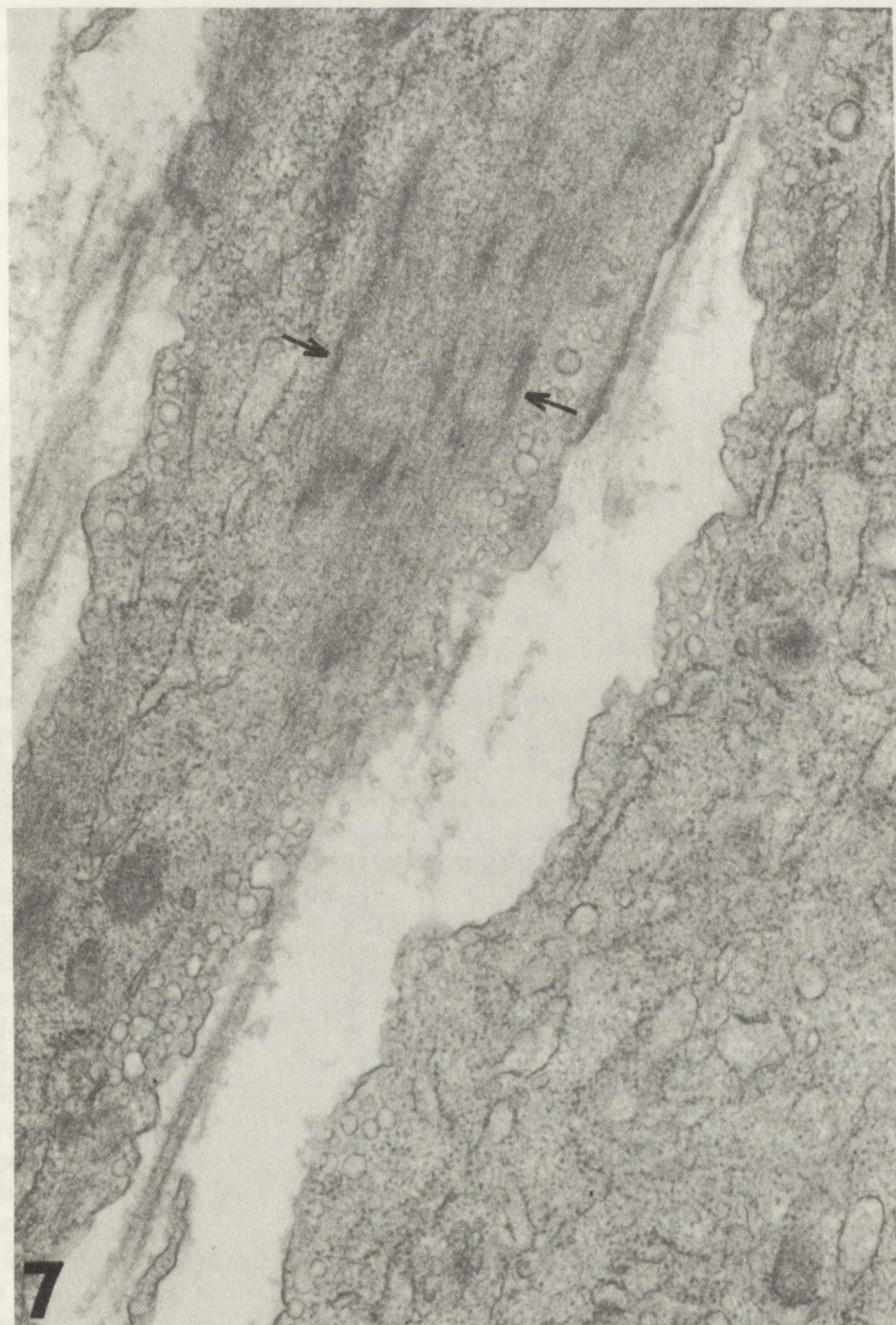


Fig. 7. Case 6. A fragment of myofibroblastic cell with bundles of filaments and densities (arrows).
× 30 000

Ryc. 7. Przyp. 6. Fragment komórki miofibroblastycznej z pęczkami filamentów. Na ich przebiegu widoczne są liczne zagęszczenia (strzałki). Pow. 30 000 ×



Fig. 8. Case 5. A myofibroblastic cell. Filaments are situated in subplasmalemmal region of cytoplasm, densities are arranged parallelly to the long axis of the cell. $\times 27\,500$
Ryc. 8. Przyp. 5. Komórka miofibroblastyczna. Filamenty znajdują się w pobliżu błony komórkowej a ich zagęszczenia ułożone są równoległe do długiej osi komórki. Pow. $27\,500 \times$

often filled with floccular material (Fig. 5). The nucleus was oval and showed invaginations of its membrane (Fig. 6). The most characteristic feature of these cells were bundles of intracytoplasmic filaments with concomitant densities (Fig. 7). The filaments were situated usually in the subplasmalemmal region and densities were arranged parallel to the long axis of the cells (Fig. 8).

4. In addition, all tumors showed groups of immature anaplastic cells most probably of mesenchymal origin. In some tumors macrophages and lymphocytes were also found.

DISCUSSION

Mixed glio-mesenchymal tumors are thought to arise mostly as neoplasms in which one constituent (glial or sarcomatous) precludes and induces the other (Feigin, Gross 1955; Rubinstein 1964; Morantz et al. 1976). The tumors presented in this study may support this hypothesis. A characteristic feature of the material was marked vascular proliferation in the gliomatous areas of the neoplasms. Vascular neof ormation is considered by many authors as a source of the sarcomatous component in GS (Feigin et al. 1958; Shuangshoti, Netsky 1971; Schiffer et al. 1980). The cell type or types, however, from which this component arises have not been so far adequately established. Feigin et al. (1958), Pena and Felter (1973), Weller et al. (1977), and Schiffer et al. (1984) have suggested an endothelial origin of sarcoma. Some experimental data seem to support this view as well (Greene, Harvey 1968). Recent results of immunohistochemical investigations of GS suggest, that apart from endothelial cells, pericytes, perivascular fibroblasts and histiocytes play a role in the histogenesis of these neoplasms (McComb et al. 1982; Kochi, Budka 1987).

Ultrastructural examination revealed cellular heterogeneity of the sarcomatous component in our material. Combination of poorly differentiated mesenchymal cells with clusters of endothelial-like cells and groups of fusiform cells was observed in all our tumors. The latter cells showed ultrastructural resemblance to fibroblasts and/or myofibroblasts. Pena and Felter (1972), and Slowik et al. (1985) have demonstrated electron-microscopically features of fibroblastic and endothelial-like differentiation of mesenchymal elements in GS. Our findings are in line with these observations. Myofibroblast-like cells were found in the majority of tumors in our material (eight out of eleven). To our knowledge, ultrastructural identification of myofibroblasts in mixed glioma-sarcoma tumors, appeared in the literature only in one report (Montpetit et al. 1988).

Since Gabbiani et al. (1971) described myofibroblasts in granulation tissue of healing wounds in experimental animals these cells have been found in normal human tissues and in many pathological processes including neoplasms (Ariyan et al. 1978; Bhawan 1981; Seemayer et al. 1981). The cells were identified in carcinomas (Ohtani, Sasano 1980; Schürch et al. 1981, 1982), in which they represent the host response to stromal invasion by malignant

epithelium (Schürch et al. 1984), and in some sarcomas (Lagacé et al. 1980; Blewitt et al. 1983). Myofibroblasts show morphological similarities with fibroblast and smooth muscle cells; both types of cells and mesenchymal stem cells also, are considered the potential sources (Bhawan 1981; Seemayer et al. 1981).

To sum up the results, our study shows, that the sarcomatous component of GS is represented by a heterogeneous group of cells, at least in many instances, related to vessels. Frequent occurrence of myofibroblasts in GS suggests that these cells may represent a transitional form, of several other cell types originating from primitive vasogenic mesenchyma or reactivated fibroblasts.

ULTRASTRUKTURA SKŁADNIKA MIĘSAKOWEGO GLIOSARCOMA

Streszczenie

Zbadano materiał biopsyjny pochodzący z operacji 11 przypadków mieszanych, glejowo-mezenchymalnych, nowotworów mózgu (gliosarcoma). Składnik glejakowy tych guzów miał w 6 przypadkach utkanie *glioblastoma multiforme*, w 4 przypadkach — *astrocytoma anaplasticum*, w 1 przypadku — *oligodendroglioma anaplasticum*. Celem badania była ocena ultrastruktury części mezenchymalnej glejakomięsaków.

Wykazano, że w zbadanych przypadkach, mięsakowa część *gliosarcoma* jest niejednorodna morfologicznie i utworzona z komórek wywodzących się z naczyń krwionośnych. Wyodrębniono kilka rodzajów komórek mezenchymalnych: a) komórki niskozróżnicowane (w 11 guzach); b) komórki wykazujące cechy różnicowania śródbłonkowego (w 11 guzach); c) komórki o cechach fibroblastów i fibroblastopodobne (w 8 guzach); d) komórki o różnicowaniu miofibroblastycznym (o różnym stopniu dojrzałości morfologicznej — w 8 guzach).

Częsta, w naszym materiale, obecność miofibroblastów sugeruje, że mogą one stanowić przejściową formę innych rodzajów komórek wywodzących się z niedojrzałej mezenchymy naczyniowej, lub formę przejściową pobudzonych w procesie rozrostu nowotworowego, fibroblastów.

REFERENCES

1. Ariyan S., Enriquez R., Krizek T. J.: Wound contraction and fibrocontractive disorders. Arch Surg, 1978, 113, 1034—1046.
2. Bhawan J.: The myofibroblast. Am J Dermatopathol, 1981, 3, 73—78.
3. Blewitt R. H., Aparicio S. G. R., Bird C. C.: Epithelioid sarcoma: a tumor of myofibroblasts. Histopathology, 1983, 7, 543—574.
4. Feigin I. H., Gross S. W.: Sarcoma arising in glioblastoma of the brain. Am J Pathol, 1955, 31, 633—653.
5. Feigin I., Allen L. B., Lipkin L., Gross S. W.: The endothelial hyperplasia of the cerebral blood vessels with brain tumors and its sarcomatous transformation. Cancer, 1958, 11, 264—277.
6. Feigin I., Ransochoff J., Lieberman A.: Sarcoma arising in oligodendroglioma of the brain. J Neuropathol Exp Neurol, 1976, 35, 679—684.

7. Gabbiani G., Ryan G. B., Majno G.: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 1971, 27, 549–550.
8. Greene H. S. N., Harvey B. A.: The development of sarcomas from transplants of the hyperplastic stromal endothelium of glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 1968, 53, 483–499.
9. Kochi N., Budka H.: Contribution of histocytic cells to sarcomatous development of the gliosarcoma. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 1987, 73, 124–130.
10. Lagacé R., Schürch W., Seemayer T. A.: Myofibroblasts in soft tissue sarcomas. *Virchows Arch [A]*, 1980, 389, 1–11.
11. Lalitha V. S., Rubinstein L. J.: Reactive glioma in intracranial sarcoma: a form of mixed sarcoma and glioma (“sarcoglioma”). Report of eight cases. *Cancer*, 1979, 43, 246–257.
12. McComb R. D., Jones T. R., Pizzo S. V., Bigner D. D.: Immunohistochemical detection of factor VIII (von Willebrand factor) in hyperplastic endothelial cells in glioblastoma multiforme and mixed glioma-sarcoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1982, 41, 479–489.
13. Montpetit V. J. A., Pokrupa R., Richard M. T., Clapin D. F.: Myofibroblastic differentiation of a primary intracerebral sarcoma with gliomatous reaction. *Clin Neuropathol*, 1988, 7, 1–9.
14. Morantz R. A., Feigin I., Ransohoff J.: Clinical and pathological study of 24 cases of gliosarcoma. *J Neurosurg*, 1976, 45, 398–408.
15. Ohtani H., Sasano N.: Myofibroblasts and myoepithelial cells in human breast carcinoma. An ultrastructural study. *Virchows Arch [A]*, 1980, 385, 247–261.
16. Pasquier B., Couderc P., Pasquier D., Panh M. H., N’Golet A.: Sarcoma arising in oligodendroglioma of the brain. *Cancer*, 1978, 42, 2753–2758.
17. Pena C. E., Felter R.: Ultrastructural of a composite gliomasarcoma of the brain. *Acta Neuropathol*, 1973, 23, 90–94.
18. Rubinstein L. J.: Morphological problems of brain tumors with mixed cell population. *Acta Neurochir [Suppl] (WIEN)* 1964, 10, 141, 165.
19. Rubinstein L. J.: Tumors of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1972, pp. 74-78, 198–199.
20. Schiffer D., Giordana M. T., Soffiotti R., Tarenzi L., Bertolotto A.: On the nature of the so-called monstrocellular sarcoma of the brain. *Neurosurgery*, 1980, 6, 391–397.
21. Schiffer D., Giordana M. T., Mauro A., Migheli A.: GFAP, F VIII RAg, laminin and fibronectin in gliosarcomas: An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 1984, 63, 108–116.
22. Schürch W., Semmayer T. A., Lagacé R.: Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopic study. *Virchows Arch [A]*, 1981, 391, 125–139.
23. Schürch W., Lagacé R., Semmayer T. A.: Myofibroblastic stromal reaction in retracted scirrhous carcinomas of the breast. *Surg Gynecol Obstet*, 1982, 154, 351–358.
24. Schürch W., Seemayer T. A., Lagacé R., Gabbiani G.: The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts: an immunofluorescence and ultrastructural study. *Virchows Arch [A]*, 1984, 403, 323–336.
25. Seemayer T. A., Schürch W., Lagacé R.: Myofibroblasts in human pathology. *Hum Pathol*, 1981, 12, 491–492.
26. Shuangshoti S., Netsky M. G.: Neoplasms of mixed mesenchymal and neuroepithelial origin: Relation to “monstrocellular sarcoma” or “giant-celled glioblastoma”. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1971, 30, 290–309.
27. Slowik F., Jellinger K., Gaszo L., Fischer J.: Gliosarcomas: histological, immunohistochemical, ultrastructural, and tissue culture studies. *Acta Neuropathol*, 1985, 67, 201–210.
28. Smith D. R., Hardman J. M., Earle K. M.: Contiguous gliosarcoma multiforme and fibrosarcoma with extracranial metastasis. *Cancer*, 1969, 24, 270–276.
29. Stroebe H.: Über Entstehung und Bau der Gehirn-Gliome. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol*, 1895, 18, 405–486.

30. Weller R. O., Foy M., Cox S.: The development and ultrastructure of the microvasculature in malignant gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1977, 3, 307–322.
31. Wisławski J.: Guzy o budowie glejaka wielopostaciowego i mięsaka występujące w jednym obszarze nowotworowym. *Neuropatol Pol*, 1970, 8, 23–28.

Authors' address: Institute of Pathology, Dept. of Pathological Anatomy, School of Medicine, 96 Narutowicza Str., 90-141 Łódź, Poland

PRZEMYSŁAW NOWACKI, CEZARY FRYZE, JERZY KULCZYCKI,
KRYSTYNA HONCZARENKO

ZMIANY ZWYRODNIENIOWE W MÓZDŻKU W BIAŁACZKACH NIELIMFOBLASTYCZNYCH U DOROSŁYCH

Klinika Neurologii Instytutu Neurologiczno-Psychiatrycznego Pomorskiej Akademii Medycznej,
Szczecin, Klinika Neurologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

W przebiegu nowotworów rozwijających się poza ośrodkowym układem nerwowym (OUN), mogą się w nim rozwijać, oprócz ognisk przerzutowych, także zmiany zwyrodnieniowe tkanki nerwowej. Zainteresowanie tymi zmianami w ostatnich latach wzrasta. Okazuje się, że nie należą one do rzadkich, a ich etiopatogeneza nie została wyjaśniona. Przyjmuje się, że u podłoża tych zmian leżą czynniki metaboliczne, niedokrwienne, niedoborowe, toksyczne (Tsapatsoris 1979; Mossakowski, Renkawek 1981). Ostatnio, coraz więcej uwagi przypisuje się reakcjom immunopatologicznym zachodzącym między tkanką nowotworową, a niektórymi elementami strukturalnymi tkanki nerwowej, na przykład komórkami Purkinjego (Trotter i wsp. 1976; Garson i wsp. 1982; Takahashi i wsp. 1985; Ang i wsp. 1986). Tego typu odległy skutek (remote effect) oddziaływania nowotworu na tkankę ujawnia się w postaci tzw. zespołów paranowotworowych (Henson, Ulrich 1982; Minna, Bunn 1982; Greenlee, Brashear 1983). Za przykłady takich zespołów uważa się w obrębie obwodowego układu nerwowego polineuropatię głównie czuciową; w obrębie OUN przewlekłe zwyrodnienie kory mózdzku, podostrą neuropatię (mielopatię) ruchową, a ponadto, zapalenie skórno-mięśniowe i wielomięśniowe (Henson, Ulrich 1982; Minna, Bunn 1982). W wielu przypadkach obraz kliniczny i morfologiczny tych zespołów może być dodatkowo powikłany w następstwie działania podawanych cytostatyków, zwłaszcza Vinkrystyny, które powodują powstawanie zmian zwyrodnieniowych w obwodowym układzie nerwowym (Young, Posner 1980; Henson, Ulrich 1982), bądź w OUN (Winkelman, Hines 1983; Dąmbska i wsp. 1986).

U chorych na białaczkę zmianom zwyrodnieniowym nie poświęcono dotychczas większej uwagi. Celem pracy jest próba lepszego poznania zmian zwyrodnieniowych w mózdzku w ostrych białaczkach nielimfoblastycznych u dorosłych, ze zwróceniem uwagi na udział chemioterapii w etiopatogenezie tych zmian.

MATERIAŁ I METODY

Badania neuropatologiczne wykonano u 61 osób (23 kobiety i 38 mężczyzn) zmarłych w wieku 17–60 lat (średnia wieku 38,6 lat) z powodu białaczki w okresie od 1978 do 1987 r. W 45 przypadkach rozpoznano ostrą białaczkę nieлимfoblastyczną (OBN), w 35 — była to ostra białaczka mieloblastyczna, w 10 — ostra białaczka mielomonocytoidalna. W 16 przypadkach stwierdzono przełom blastyczny przewlekłej białaczki szpikowej (PBPBS). Typ białaczki ustalono na podstawie badań cytologicznych krwi i szpiku oraz cytochemicznych (reakcja PAS) i cytoenzymatycznych blastów (reakcja peroksydazowa metodą Sato i reakcja na obecność esterazy alfa- naftylo-octanowej). U 37 chorych stosowano złożone leczenie cytostatykami (polichemioterapią), na którą składał się: Cyklofosamid (CTX), Oncovin (O = VCR), Adriablastyna (ADR), Rubidomycyna (DRB), Arabinozyd-C (Ara-C), Metotreksat (MTX) w cyklach COAP, AR, VIDAP, VAPA. W przypadkach PBPBS leczenie polegało na podawaniu tylko jednego cytostatyku (monochemioterapia) — 6-merkaptopuryny (6-MP). Przypadki te pochodziły z okresu przed wprowadzeniem polichemioterapii tej choroby. Grupę odniesienia stanowiło 10 chorych, którzy nie byli leczeni cytostatykami. Preparaty parafinowe z różnych okolic mózgowia barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu oraz metodami Heidenhaina, Holzera, PAS, van Gieson, a skrawki mrożone impregnowano metodą Bielschowskiego. Oceniając zmiany w korze mózdku przyjęto czterostopniową skalę uszkodzenia warstwy ziarnistej: I° — ogniskowe przerzedzenie, II° — rozlane wyraźne przerzedzenie, III° — ogniskowy zanik, IV° — rozlany zanik warstwy ziarnistej.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu istotności różnic Kołmogorowa-Smirnowa — wariant b (Brzeziński 1975).

WYNIKI

Zmiany zwyrodnieniowe w mózdku stwierdzono w 31 przypadkach (51%), spośród 61 poddanych badaniu. Najwyraźniejsze zmiany obserwowano w formacjach istoty szarej.

Zmiany w korze mózdku. W 13 przypadkach (21,3%) warstwa ziarnista kory mózdku wykazywała przerzedzenie. W 8 przypadkach miało ono charakter rozlany (II°), w 5 przypadkach ogniskowy (I°) i występowało głównie w robaku lub pojedynczych płacikach półkul mózdku. Komórki ziarniste były mniej uszkodzone na obwodzie warstwy, gdzie występowały często w postaci gniazd. W 6 przypadkach (9,8%) przerzedzenie warstwy ziarnistej było rozlane, graniczyło z całkowitym jej zanikiem (III° i IV°) (ryc. 1 i 2). Największemu przerzedzeniu komórek towarzyszył rozpad podłoża warstwy ziarnistej. Pojedyncze zachowane neurony wykazywały bardzo zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe (ryc. 3). W tabeli 1 przedstawiono częstość występowania przerzedzenia lub zaniku warstwy ziarnistej kory mózdku w okresie objętym

Tabela 1. Występowanie cerebelopatii o typie zaniku warstwy ziarnistej kory mózdzku w badanym materiale w latach 1976–1986

Table 1. The appearance of cerebellar granular layer atrophy in studied material since 1976 to 1986

Lata kalendarzowe Years	Liczba przypadków Number of cases	
	z cerebelopatią with cerebellopathy	bez cerebelopatii without cerebellopathy
1976–1980	2	10
1981–1983	3	17
1984–1986	14	15

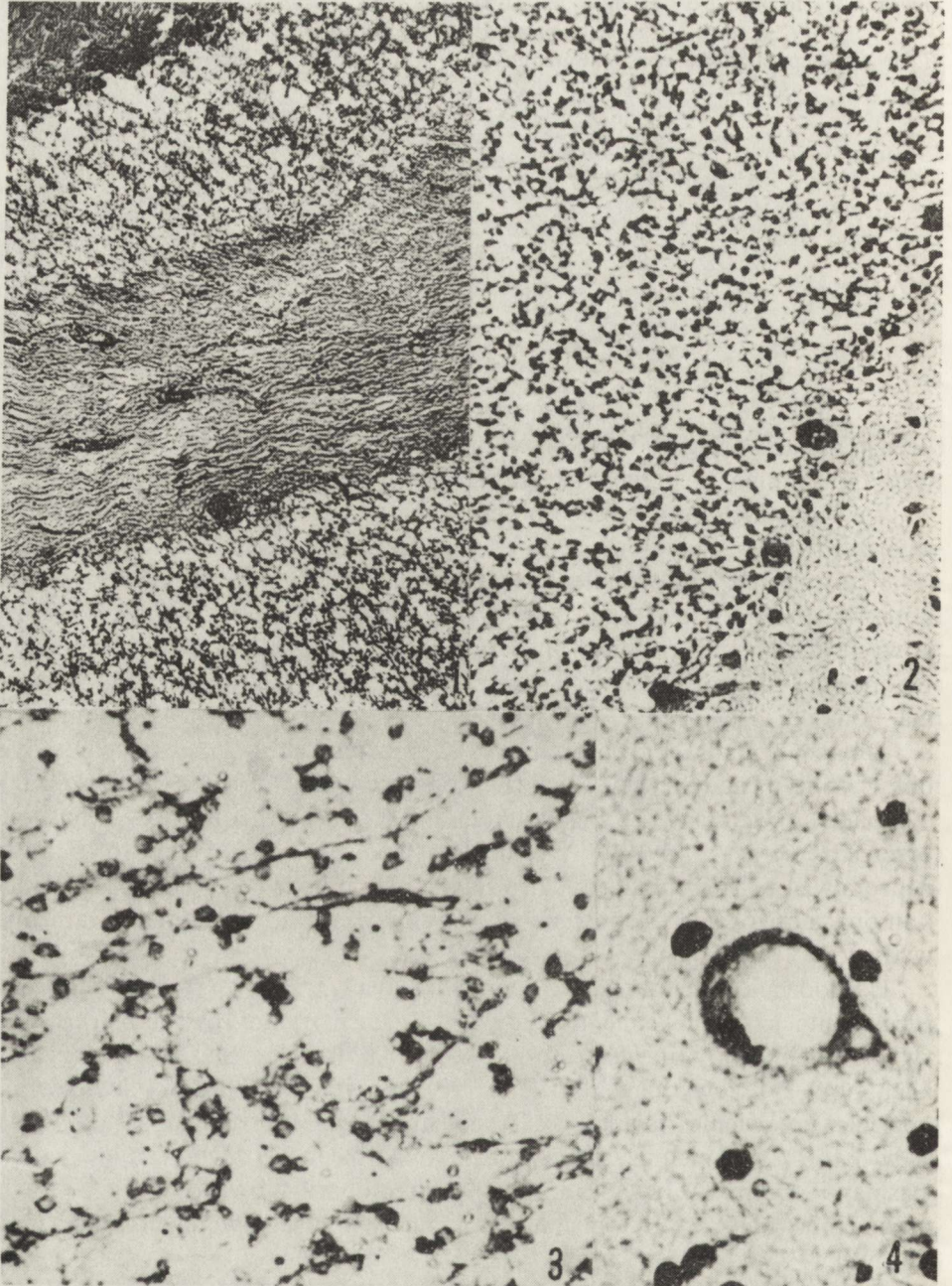
oceną. Zwraca uwagę fakt statystycznie znamienne częstszego występowania tego typu zmian w przypadkach badanych w latach 1984–1986.

We wszystkich przypadkach obserwowano przerzedzenie komórek Purkiniego, zarówno w głębi rowków, jak i na szczycie zakrętów; w 9 przypadkach (14,8%) przerzedzenie to było duże. Gdzieś w miejscach po zanikłych komórkach Purkiniego widoczne były jedynie wypustki komórek koszykowych. Komórki Purkiniego były zwykle obkurczone, posiadały ciemniejszą cytoplazmę i jądro. Część zachowanych komórek wykazywała cechy schorzenia homogenizacyjnego.

Zmiany w jądrach zębatych. W 22 przypadkach (36%) neurony były obkurczone i nadbarwliwe, rzadziej obserwowano obrzęk i wakuolizację cytoplazmy (ryc. 4). W 28 przypadkach (45,9%) stwierdzono, różnie nasilone przerzedzenie neuronów. W 10 z nich występował wyraźny zanik odcinkowy neuronów, a w 2 przypadkach jądro zębate było prawie całkowicie pozbawione komórek nerwowych; zachowane neurony były ciemne, wyraźnie obkurczone, wydłużone (ryc. 5).

Uszkodzenie mieliny. W 17 przypadkach (27,9%) obserwowano obrzęki i fragmentację osłonek mielinowych; w 14 z nich zmiany były umiarkowane, zwykle obejmowały niewielki obszar w głębi półkuli mózdzku, w 3 przypadkach obrzęk był wyraźny i rozlany. W 5 przypadkach (8,2%) stwierdzono rozległe spłowienie mieliny, z współistniejącym obrzękiem istoty białej, a w 3 (4,9%) demielinizację: w 2 była ona rozlana z zachowanymi jedynie pasmami obrzmiałych włókien, w 1 – okołonacyniowa (ryc. 6). Najmniej uszkodzone były osłonki mielinowe w obrębie płacików i w okolicy podkorowej.

Odczyn glejowy stwierdzono w 15 przypadkach (24,5%), przy czym w 3 był wyraźny. Glejoza miała zwykle charakter rozlany, mikroglejowo-astrocytarny. Formy pałeczkowate mikrogleju występowały głównie w obrębie jąder zębatych, tam też spotykano pojedyncze grudki neuronofagiczne. Nasilenie odczynu glejowego nie było proporcjonalne do stopnia uszkodzenia mieliny ani zaniku neuronów w jądrach zębatych. W 19 przypadkach (31,1%) obser-



wowano rozplem gleju Bergmanna, z czego w 9 był on wyraźny. Obrzęk tkanki nerwowej występował w 12 przypadkach (19,7%), przy czym w 4 był duży, obejmował zwykle równomiernie istotę białą obu półkul mózdzku, bądź okolice jąder zębatych.

Zmiany w ścianach naczyń obserwowano rzadko (2 przypadki — 3,3%). Polegały one na niewielkim zwłóknieniu ściany i umiarkowanym rozplemie śródbłonnków.

Niebiałaczkowe nacieki okołonaczyniowe stwierdzono w 28 przypadkach (45,9%). Były to nacieki limfocytarne z domieszką pojedynczych komórek plazmatycznych. W przeważającej większości nacieki były drobne, często otaczały jedynie część naczynia (ryc. 7). Nacieki występowały w istocie białej tylko wokół naczyń żylnych, zwykle o średnicy od 50 do 250 μm . Czas trwania białaczki w przypadkach z opisanymi naciekami był statystycznie istotnie krótszy od okresu choroby w przypadkach bez nacieków.

W tabeli 2 przedstawiono zależność między chemioterapią a zmianami zwyrodnieniowymi w mózdzku. Jak wynika z zestawienia przerzedzenie lub zanik warstwy ziarnistej i jąder zębatych, demielinizację i odczyn glejowy obserwowano częściej u chorych leczonych cytostatykami w sposób skojarzony.

Ryc. 1. Rozlany zanik warstwy ziarnistej kory mózdzku i wyraźne przerzedzenie komórek Purkinjego. Fiolet Krezylu. Pow. 63 \times

Fig. 1. Diffuse cerebellar granular layer atrophy and advanced Purkinje cell rarefaction. Cresyl violet. $\times 63$

Ryc. 2. Wyraźne przerzedzenie warstwy ziarnistej kory mózdzku. HE. Pow. 100 \times

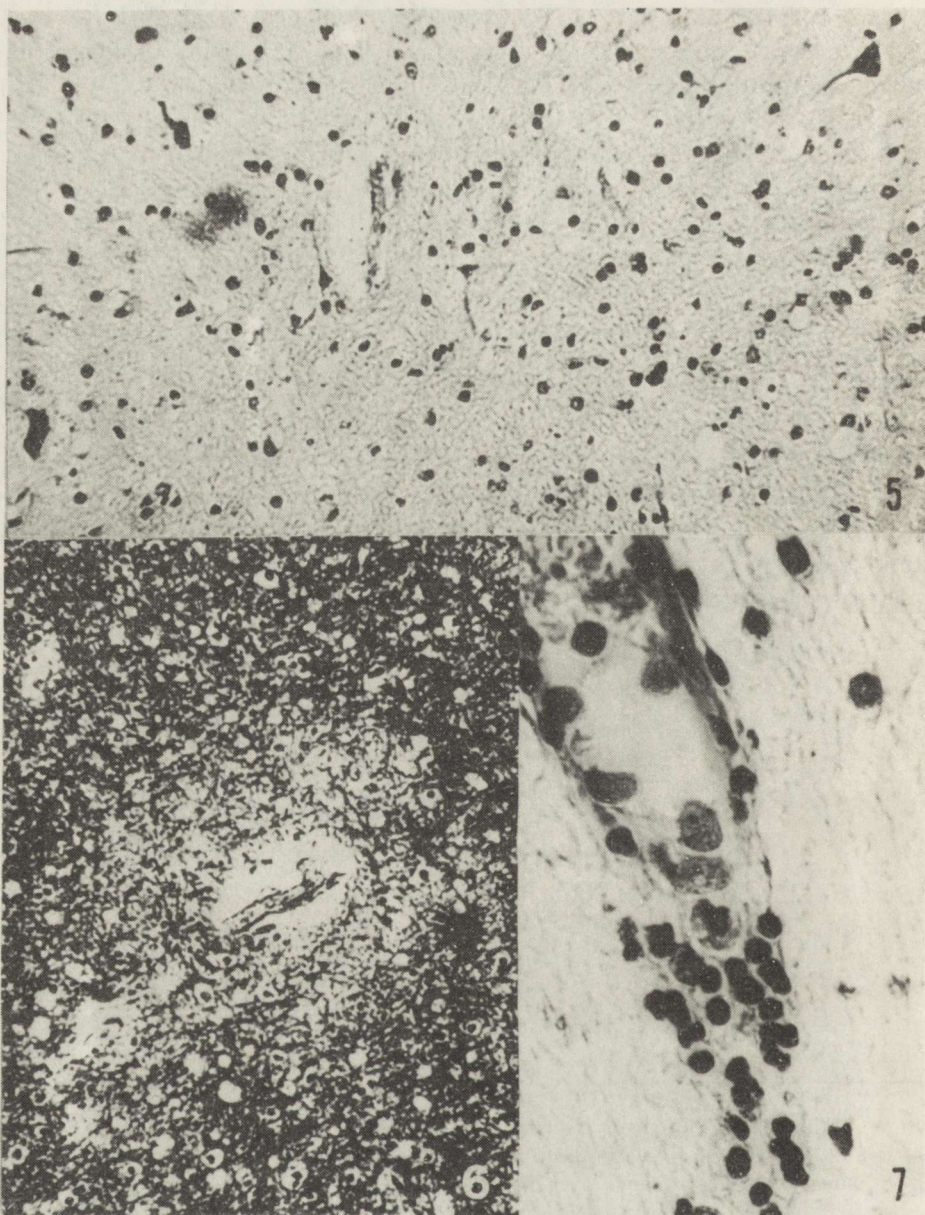
Fig. 2. Distinct cerebellar granular layer rarefaction. HE. $\times 100$

Ryc. 3. Zanik warstwy ziarnistej kory mózdzku. Przetrwale neurony zniekształcone, blade. Fiolet krezylu. Pow. 240 \times

Fig. 3. Cerebellar granular layer atrophy. Surviving neurons mis-shapen, pale. Cresyl violet. $\times 240$

Ryc. 4. Duża wodniczka w cytoplazmie neuronu jądra zębatego. HE. Pow. 60 \times

Fig. 4. Large vacuole in neuron cytoplasm of dentate nucleus. HE. $\times 60$



Ryc. 5. Zanik neuronów jądra zębatego. Pojedyncze przetrwałe komórki nerwowe obkurczone, ciemne. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 5. Atrophy of dentate nucleus neurons. Single surviving cells shrunken, dark. Cresyl violet. × 100

Ryc. 6. Demielinizacja wokół drobnego naczynia żylnego. Heidenhain. Pow. 100 ×

Fig. 6. Demyelination around a small vein. Heidenhain. × 100

Ryc. 7. Naciek limfocytarny wokół cienkościennego naczynia żylnego w istocie białej półkuli mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 240 ×

Fig. 7. Lymphocytic infiltration around a thin-walled vein in the cerebellar white matter. Cresyl violet. × 240

Tabela 2. Chemioterapia a rodzaj zmian miąższowych w mózdzku
 Table 2. Chemotherapy and the type of cerebellar parenchymatous changes

Zmiany miąższowe Parenchymatous changes	Polichemio- terapia Polychemo- therapy	Monoche- miotterapia Monochemo- therapy	Bez cytostatyków Without cytostatics
Przerzedzenie lub zanik warstwy ziarnistej kory mózdzku Rarefaction or atrophy of cerebellar granular layer	częste frequent	częste frequent	rzadkie rare
Przerzedzenie lub zanik jąder zębatych Rarefaction or atrophy of dentate nuclei	częste frequent	częste frequent	rzadkie rare
Demielinizacja Demyelination	obecna present	nieobecna absent	nieobecna absent
Spłowienie mieliny Myelin pallor	obecne present	obecne present	nieobecne absent
Obrzęk mieliny Myelin edema	częsty frequent	rzadki rare	częsty frequent
Odczyn glejowy Glial reaction	częsty frequent	obecny present	nieobecny absent
Obrzęk tkanki nerwowej Nervous tissue edema	obecny present	obecny present	częsty frequent

OMÓWIENIE

W przebadanym materiale zmiany zwyrodnieniowe w mózdzku stwierdzono w 51% przypadków. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami (Mosakowski i wsp. 1962; Nowacki 1987) nie miały one charakteru swoistego dla białaczek. Podkreślenia wymaga fakt częstego występowania w naszych przypadkach uszkodzenia warstwy ziarnistej kory mózdzku (31%). Dotychczas opisano niewiele przypadków ze zmianami tego rodzaju, głównie w przebiegu nowotworów litych rozwijających się poza układem nerwowym (Kuchna 1987; Stefansson, Arnason 1987).

Etiopatogeneza zaniku warstwy ziarnistej kory mózdzku nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Obserwacje nasze wskazują na udział polichemioterapii w powstawaniu tych zmian. Były one częstsze w grupie chorych, u których zastosowano skojarzone leczenie cytostatykami. Trudno też odpowiedzieć na pytanie, co spowodowało, że największą liczbę przypadków z zanikiem warstwy ziarnistej obserwowaliśmy w materiale z ostatnich 2–3 lat. Wydaje się, że jedną z przyczyn może być wprowadzenie coraz bardziej „agresywnych” schematów chemioterapii białaczek. Być może chemioterapia stanowi tylko jeden z czynników prowadzących do uszkodzenia warstwy ziarnistej mózdzku.

Innym, coraz częściej podkreślanym czynnikiem jest odczyn immunologiczny tkanki nerwowej na proces nowotworowy. Za takim mechanizmem uszkodzenia warstwy ziarnistej mogą przemawiać te z naszych przypadków

z zanikiem tej warstwy, w których zastosowano jedynie 6-MP lub wcale nie przeprowadzono chemioterapii. Być może obserwowane przez nas drobne okołozylne nacieki limfocytarne są morfologicznym przejawem właśnie tego typu reakcji immunopatologicznych. Czas trwania choroby w przypadkach z naciekami był 2-krotnie krótszy niż w grupie chorych, u których nie stwierdzono nacieków. Wynika to prawdopodobnie z większego nasilenia reakcji immunologicznych w przypadkach o bardziej złośliwym i dynamicznym przebiegu.

Inną strukturą mózdzku, w której zmiany występowały równie często jak w korze, były jądra zębate. Obserwacje nasze zgodne są z doniesieniami innych autorów, którzy także uznają zmiany w jądrach zębatych, za charakterystyczne dla cerebellopatii w przebiegu nowotworów rozwijających się poza układem nerwowym (Henson, Ulrich 1982). W neuronach jąder zębatych obserwowaliśmy zwyrodnienie wodniczkowe, częściej w przypadkach leczonych intensywnie cytostatykami. Breuer i wsp. (1977), obserwowali podobne zmiany w neuronach rdzenia u chorych leczonych Ara-C, uznając ten lek za toksyczny dla tkanki nerwowej. Nie wykluczone jednak, że zmiany wodniczkowe są między innymi skutkiem rozwijającego się w neuronach schorzenia ischemicznego (Kozik, Pietrzak 1983). Trudno powiedzieć, czy istnieje wpływ wspomnianego czynnika immunologicznego na uszkodzenie jąder zębatych.

W przypadkach, w których stosowano polichemioterapię obserwowaliśmy też częściej niż u pozostałych chorych demielinizację. Wydaje się, że nie jest ona zjawiskiem wtórnym do zmian aksonalnych, jak sądzi Hendin i wsp. (1974), ponieważ w naszym materiale występowały zmiany w aksonach rzadko i były one niewielkie.

Zmiany obrzękowe były najprawdopodobniej związane z burzliwymi zjawiskami przedśmiertnymi, na co wskazuje fakt, że występowały głównie w przypadkach o krótkim, gwałtownym przebiegu choroby. Uszkodzenie naczyń, w przeciwieństwie do innych autorów (Iwanowski 1985) spotykaliśmy rzadko, pomimo że ściana naczyniowa narażona była na bezpośrednie oddziaływanie cytostatyków podawanych dożylnie.

Na podstawie własnych obserwacji możemy stwierdzić, że u chorych poddanych skojarzonemu leczeniu cytostatykami zmiany zwyrodnieniowe w OUN są bardziej nasilone niż w przypadkach leczonych tylko 6-MP, lub nie leczonych. Przy ocenie morfologicznej odróżnienie skutków działania każdego z cytostatyków z osobna na tkankę nerwową jest u człowieka praktycznie niemożliwe.

Zmiany zwyrodnieniowe w mózdzku u chorych na białaczki są wypadkową oddziaływania czynników toksycznych, (związanych głównie z chemioterapią), radioterapii, procesów autoimmunologicznych, metabolicznych, infekcyjnych, naczyniowych, wrażliwości osobniczej, przy czym pierwszy z wymienionych wydaje się odgrywać rolę bardzo ważną. Nie stwierdzono natomiast w badanym materiale zależności pomiędzy wiekiem chorych i występowaniem oraz nasileniem zmian w mózdzku. Nasuwa się pytanie, czy w białaczkach można

użyć określenia „zespół paranowotworowy” w myśl przyjętej definicji (Stefanson, Arnason 1987). Z powodu wpływu na OUN tak wielu czynników, których skutki oddziaływania na tkankę nerwową są praktycznie niemożliwe do rozdzielenia, bardziej prawidłowe wydaje się określenie „zmiany zwyrodnieniowe w przebiegu białaczki”.

WNIOSKI

1. U chorych na ostre białaczki nielimfoblastyczne zmiany zwyrodnieniowe w mózdku są zjawiskiem częstym, zwłaszcza cerebelopatia o typie zaniku warstwy ziarnistej.

2. Jedną z przyczyn uszkodzenia warstwy ziarnistej kory mózdku, jąder zębatych i mieliny jest u tych chorych najprawdopodobniej skojarzone leczenie cytostatykami.

CEREBELLAR DEGENERATIVE CHANGES IN ADULT NON-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS

Summary

Neuropathological investigations have been performed on 61 patients of both sexes, aged 17–60 years, deceased owing to nonlymphoblastic leukemias. The cerebellar degenerative changes appeared in 51 percent of cases mainly in the grey matter. Distinct rarefaction or atrophy of the cerebellar granular layer and the dentate nuclei were frequent phenomena. The following classification of the cerebellar granular layer damage was used: I° – focal rarefaction, II° – diffuse distinct rarefaction, III° – focal atrophy, IV° – diffuse atrophy.

The investigations suggest that polychemotherapy is one of the causes of cerebellar degenerative changes, especially atrophy of the granular layer and dentate nuclei, as well as demyelination. In leukemias of short duration more frequently than in the remaining cases lymphocytic perivenous infiltrations appeared in the white matter. It seems to be a consequence of immunopathological reactions between the neoplasm and the nervous tissue in cases with more dynamic course of the disease.

PIŚMIENNICTWO

1. Ang L. C., Zochodne D. W., Ebers G. C., Kaufmann J. C., Winters H. V.: Severe cerebellar degeneration in patient with T-cell lymphoma. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1986, 69, 171–175.
2. Breuer A. C., Pitman S., Dawson D. M., Schoene W. C.: Paraparesis following intrathecal cytosine arabinoside. *Cancer*, 1977, 40, 2817–2822.
3. Brzeziński J.: Metody badań psychologicznych w zarysie, Uniwersytet A. Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, 1975, 126–132.
4. Dębska M., Schmidt-Sidor B., Laure-Kamionowska M., Izbiński T.: Zmiany w mózgu dzieci zmarłych z powodu choroby nowotworowej. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 261–269.
5. Garson J. A., Beverly P. C., Coakham H. B., Horper E. J.: Monoclonal antibodies against human T-lymphocytes label Purkinje neurons of many species. *Nature*, 1982, 298, 375–377.
6. Greenlee J., Brashear H.: Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol*, 1983, 14, 609–613.
7. Hendin B., De Vivo D., Torback R., Lell M. E., Ragab A. H., Vietti T. J.: Parenchymatous

- degeneration of the central nervous system in childhood leukemia. *Cancer*, 1974, 33, 469–482.
8. Henson R. A., Urich H.: *Cancer and the nervous system. The neurological manifestations of systemic malignant disease*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, 1982.
 9. Iwanowski L.: Ultrastructure of brain capillaries in young rabbits treated with cyclophosphamide. *Neuropatol Pol*, 1985, 23, 557–564.
 10. Kozik M. B., Pietrzak M.: Wpływ winkrystyny na czynność neurosekrecyjną podwzgórza. *Neuropatol Pol*, 1983, 21, 135–147.
 11. Kuchna I.: Zespół paranowotworowego zapalenia mózgu. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 211–217.
 12. Minna J., Bunn P.: *Paraneoplastic syndromes*, W: *Cancer. Principles and practice of oncology*, Red: V. De Vita, S. Hellman, S. Rosenberg. Lippincott Comp., Philadelphia, Toronto, 1982.
 13. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Zespoły neuropatologiczne w białaczkach. *Rozpr. Wydz. Nauk Med. PAN*, 1962, 7, 157.
 14. Mossakowski M. J., Renkawek K.: Uszkodzenie układu nerwowego w nowotworach złośliwych. W: *Podstawy neuropatologii*, Red: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa, 1981.
 15. Nowacki P.: Patogeneza zmian neuropatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w ostrych białaczkach nielimfoblastycznych i przełomie blastycznym przewlekłej białaczki szpikowej u dorosłych. Dział wydawnictw PAM, Szczecin, 1987.
 16. Stefansson K., Arnason B.: Neurologic manifestations of systemic neoplasia. W: *Harrison's principles of internal medicine*. Red: E. Braunwald, McGraw-Hill Book Comp., New York, 1987.
 17. Takahashi K. J., Ohtsuki M. S., Yamaguch H. A.: S-100 protein positive human T-lymphocyte. *Am J Clin Pathol*, 1985, 83, 69–72.
 18. Trotter J. L., Hendon B. A., Osterland K.: Cerebellar degeneration with Hodgkin's disease. An immunological study. *Arch Neurol*, 1976, 33, 660–661.
 19. Tsapatsoris N.: Cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Arch Intern Med*, 1979, 139, 829–830.
 20. Winkelman M. D., Hines J. D.: Cerebellar degeneration caused by high-dose cytosine arabinoside: a clinico-pathological study. *Ann Neurol*, 1983, 14, 520–527.
 21. Young D., Posner J.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. W: *Handbook of clinical neurology*, V. 39, cz. II, Red: P. Vinken, G. Bruyn, North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, New York, Oxford, 1980.

Adres autorów: Klinika Neurologii PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

JERZY WĘGIEL, ELŻBIETA MEDYŃSKA, WOJCIECH DZIEDZIAK,
WALENTYNA SZIRKOWIEC-GMURCZYK*, JERZY DYMECKI

WPLYW TECHNIKI HISTOLOGICZNEJ NA OBJĘTOŚĆ I MASĘ NIEKTÓRYCH STRUKTUR MÓZGU SZCZURA WE WCZESNYM OKRESIE JEGO ŻYCIA

Zakład Neuropatologii i Zakład Genetyki* Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Badania morfometryczne mające na celu ilościową ocenę poszczególnych składników tkankowych oraz zmian w nich zachodzących, wymagają określonych warunków w obróbce histologicznej materiału. Zachowanie tych warunków jest nieodzowne aby zapewnić uzyskanie jednolitego materiału i porównywalność wyników. Od dawna wiadomo, że tkanka pod wpływem obróbki histologicznej ulega zmianom artefaktycznym, co doprowadziło do wprowadzenia terminu „Aequivalentbild” do podkreślenia różnicy między rzeczywistym wyglądem komórki a jej obrazem po przejściu procesu obróbki histologicznej.

Procedura histologiczna, a zwłaszcza procesy utrwalań, odwadniania i prześwietlania powodują zmiany objętości, masy i ciężaru właściwego tkanki (Bahr i wsp. 1957; Frontera 1958; Heidenhain 1916; Leibnitz 1971, 1972). Szczególne znaczenie ma skład odczynnika utrwalającego, jego stężenie oraz temperatura utrwalań. W trakcie histologicznego opracowania materiału występuje szereg dodatkowych czynników, które również mają wpływ na jakość uzyskiwanych preparatów (warunki krojenia, zmiany związane z różną twardością parafiny, sposób rozprostowania skrawka) (Kraus 1962). Niezmiernie ważne więc jest określenie takich warunków techniki histologicznej, które by powodowały, jak najmniejsze deformacje tkanki. W odniesieniu do tkanki mózgu dodatkowym czynnikiem, który musi być wzięty pod uwagę jest wiek zwierzęcia doświadczalnego, gdyż wiadomo, że reakcja mózgu na obróbkę histologiczną zależy od jego wieku (Leibnitz 1971, 1972).

Badania morfologiczne nad doświadczalnym parkinsonizmem zmierzają do wyjaśnienia stanu struktur, z uszkodzeniem których związany jest zespół objawów choroby Parkinsona, a mianowicie istoty czarnej i prądkowia.

*Praca wykonana w ramach problemu węzłowego nr 06-02. II. 3. 3. koordynowanego przez CMDiK PAN w Warszawie

Również próby terapeutycznego zastosowania przeszczepów komórek produkujących dopaminę wymagają obiektywnej oceny wpływu przeszczepu na strukturę mózgu, uszkodzone w doświadczalnym parkinsonizmie. Realizacja wielostopniowego programu badań nad przeszczepami domózgowymi w doświadczalnym parkinsonizmie wymaga więc standaryzacji metod, zapewniających porównywalność wyników. Konieczne jest również określenie dynamiki rozwoju struktur mózgu uszkodzonych w przebiegu parkinsonizmu oraz używanych do przeszczepu (istota czarna) i przyjmujących przeszczep (prążkowie).

Celem badań było wyjaśnienie wpływu procesów utrwalania, odwadniania i prześwietlania materiału na wyniki badań morfometrycznych. Dalszym zadaniem była ocena zmian objętości istoty czarnej, jądra ogoniastego (skorupy i gałki bladej) w okresie pierwszych sześciu miesięcy życia szczura, jak również określenie dynamiki rozwoju tych struktur w odniesieniu do masy ciała zwierząt oraz masy całego mózgu, dynamiki rozwoju mózgu oraz całego organizmu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 112 szczurach wsobnych szczepu Wistar WAG Albino, hodowanych we własnej zwierzętarni. Linia ta pochodzi z Glaxo Researches Center. Celem zapewnienia standardowych warunków żywienia i rozwoju zwierząt przeznaczonych do badań biomorfozy mózgu, wielkość każdego miotu zredukowano do 6.

Ocena wpływu czasu, warunków utrwalania oraz odwadniania i prześwietlania na ciężar i objętość mózgu.

Badania wpływu czasu i warunków utrwalania wykonano na 20 szczurach 5-miesięcznych, samicach o masie mózgu 1662–1708 mg. Oceniono wpływ formaldehydu 4% i 8% o pH 6,3–6,7 działającego w temperaturze 4°C i 20°C, w następujących czterech wariantach: 1) stężenie formaldehydu 4%, temperatura 20°C, 2) stężenie formaldehydu 4%, temperatura 4°C, 3) stężenie formaldehydu 8%, temperatura 20°C, 4) stężenie formaldehydu 8%, temperatura 4°C.

Wpływ czynnika czasu na ciężar i objętość oraz ciężar właściwy mózgu oceniono po 1, 2, 3, 4, 7, 10 i 14 dniach utrwalania.

Objętość mózgu ustalono określając masę mózgu w powietrzu i w płynie o znanym ciężarze właściwym posługując się wzorem:

$$V_b = \frac{W_b - W_{bf}}{SW_f}$$

Ciężar właściwy mózgu obliczano według wzoru:

$$SW_b = \frac{W_b}{V_b}$$

przy czym: V_b – objętość mózgu, W_b – ciężar mózgu w powietrzu, W_{bf} – ciężar mózgu w płynie, SW_f – ciężar właściwy płynu, SW_b – ciężar właściwy mózgu.

Ocena wpływu odwadniania i prześwietlania dokonana została na 20 szczurach samicach w wieku 5,5 miesiąca, o ciężarze mózgu 1706–1790 mg. Mózgi utrwalano przez dwie doby w formaldehydzie 4 i 8%, przy pH 6,3-6,7, w temperaturze 4°C i 20°C. Następnie odwadniano je w alkoholu etylowym w szeregu rosnących stężeń i prześwietlano w benzoesanie metylu.

Wpływ utrwalania, odwadniania i prześwietlania na ciężar mózgu szczurów w zależności od wieku zwierząt.

Badania przeprowadzono na mózgach płodów w wieku 18, 20 i 21 dni życia płodowego oraz u samców 1 i 7 dniowych, a także 1, 3 i 6 miesięcznych. Mózgi utrwalano 2 doby w 8% formaldehydzie o pH 6,3, w temperaturze 20°C. Odwadniano je rutynowo w alkoholu etylowym i prześwietlano w benzoesanie metylu. W jednym przedziale wieku oceniano 5–9 szczurów. Łącznie użyto 72 zwierzęta.

Pomiary objętości istoty czarnej, jądra ogoniastego i skorupy oraz gałki bladej przeprowadzono u szczurów 1 i 7 dniowych oraz 1, 3 i 6 miesięcznych. Pomiary wykonywano na seryjnych skrawkach parafinowych mózgow, 4–5 zwierząt, w jednym przedziale wieku, krojonych w płaszczyźnie czołowej. Seria skrawków 8-mikronowych z mózgu szczurów 1-dniowych liczyła średnio 680 skrawków, z 7-dniowych 840, z 1-miesięcznych 1200, z 3-miesięcznych 1470, a z 6-miesięcznych 1650 skrawków. Co czwarte szkiełko barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną oraz metodą Klüver–Barrery.

Pomiary pola przekroju struktury, identyfikowanej na podstawie atlasu (König, Klippel 1963; Sherwood, Timiras 1970), wykonywano w półautomatycznym analizatorze obrazów MOP AM-03 firmy KONTRON, przy powiększeniu 24 ×. Pole mierzono na co 16 skrawku. Grubość każdej z warstw wynosiła 16 × 8 μm, to jest 128 μm. W przypadku struktur małych (istota czarna i jej części składowe) pomiary wykonywano częściej – na kolejnym czwartym lub ósmym skrawku (grubość warstwy wynosiła wtedy odpowiednio 32 μm lub 64 μm). Obliczano objętość poszczególnych warstw badanej struktury, a z liczby warstw określano objętość całej struktury.

Wyniki pomiarów objętości istoty czarnej i jej części – prądkowia i gałki bladej – porównywano z masą mózgu, a także z ciężarem ciała, uzyskując charakterystykę dynamiki rozwoju tych struktur w odniesieniu do dynamiki i zakresu zmian w mózgu i całym ustroju szczura we wczesnym okresie jego życia.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wpływ czasu i warunków utrwalania na ciężar i objętość mózgu.

Oceniono stopień korelacji między ciężarem mózgu a jego objętością. W badaniu na 20 szczurach współczynnik korelacji był bardzo wysoki

i wynosił 0,992. Ciężar mózgu jest łatwo kontrolowanym parametrem charakteryzującym z dużym przybliżeniem zmiany objętości mózgu.

Formaldehyd o niskim stężeniu (4%), działający w stosunkowo wysokiej temperaturze (20°C), powoduje największy wzrost ciężaru i objętości mózgu, utrzymujący się przez cały 14-dniowy okres obserwacji (tab. 1). Obniżenie temperatury utrwalań do 4°C powoduje niewielki, ale statystycznie znamieny spadek zwiększenia objętości mózgu w czasie utrwalań. Najmniejsze zmiany powoduje formaldehyd 8% w temperaturze 20°C.

Ogromne znaczenie ma czas utrwalań materiału. Oceniono zakres i dynamikę zmian ciężaru i objętości mózgu w czasie 14-dniowego utrwalań w formaldehydzie. Ciężar narządu rośnie bardzo szybko w ciągu pierwszej i drugiej doby utrwalań. W drugiej dobie utrwalań wzrost, w porównaniu z ciężarem mózgu świeżego, wynosi 52%, przy stosowaniu formaldehydu 4% w temperaturze 20°C, a tylko 30% przy użyciu formaldehydu 8% w temperaturze 4°C. Różnice między wynikami badań w 1 i 2 dobie są statystycznie znamienne (przy $p < 0,001$). Po drugiej dobie obserwuje się stały spadek ciężaru mózgu utrwalonego w formaldehydzie. W pierwszym tygodniu spadek ten wynosi około 1–3% na dobę, ale z czasem proces ten jest coraz wolniejszy. W 14 dni utrwalań, ciężar mózgu jest jeszcze znacznie wyższy od ciężaru mózgu świeżego i wynosi od 23% (formaldehyd 8%, 20°C) do 43% (formaldehyd 4%, 20°C). Tak więc nawet długotrwałe utrwalań (14 dni), nie zapewnia powrotu do stanu wyjściowego. Wielkość różnicy zależy głównie od czasu utrwalań, stężenia formaldehydu, a następnie – w mniejszym stopniu – od temperatury.

W materiale użytym do badań wpływu odwadniania i prześwietlania na ciężar mózgu (tab. 2) ujawniono wzrost ciężaru mózgu po dwóch dobach utrwalań o 27%, przy stężeniu formaldehydu 8% i o 53%, przy stężeniu 4%. Rutynowe odwadnianie w alkoholu etylowym powoduje drastyczny spadek ciężaru mózgu od 32% do 39% w stosunku do ciężaru mózgu świeżego.

Prześwietlanie w benzoesanie metylu prowadzi do ponownego, ale tylko kilkuprocentowego wzrostu ciężaru mózgu. Po prześwietleniu mózg jest lżejszy od mózgu świeżego o 25% (gdy materiał utrwalał w 8% formaldehydzie) do 17% (przy utrwalaczu 4%). Ustalone odchylenia mogą być dość ścisłą miarą błędu obciążającego wyniki pomiarów w mikroskopie świetlnym. Na podstawie tych badań można ustalić poprawki korygujące wyniki pomiarów.

Ocena wpływu utrwalań, odwadniania i prześwietlania na ciężar mózgow w zależności od wieku zwierzęcia.

Badania przeprowadzone na mózgach płodów w wieku 18, 20 i 21 dni oraz zwierząt 1, 7 dniowych i 1, 3 i 6-miesięcznych wykazały, że wpływ utrwalań, odwadniania i prześwietlania na ciężar mózgu zależy w dużym stopniu od wieku zwierzęcia (tab. 3). Różnice są szczególnie duże we wczesnym okresie życia, natomiast są znikome u płodów 20–21-dniowych (wzrost ciężaru mózgu tylko o 5%), ale zwiększają się gwałtownie tuż po porodzie u zwierząt w wieku

Tabela 1. Wpływ utrwalania w formaldehydzie na masę mózgu
 Table 1. The influence of the formaldehyde fixation of the brain weight

Masa świeżej tkanki Fresh weight		Formaldehyd Formaldehyde		Czas utrwalania (dni) Time of fixation (days)													
		Stęż. Conc.	Temp.	1		2		3		4		7		10		14	
mg	%	%	°C	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
1698	(100)	4	20	2478	(146)	2577	(152)	2542	(149)	2541	(149)	2474	(145)	2472	(144)	2423	(143)
1708	(100)	4	4	2365	(138)	2502	(146)	2487	(146)	2484	(145)	2428	(142)	2406	(141)	2398	(140)
1662	(100)	8	20	2197	(133)	2277	(137)	2232	(134)	2219	(133)	2130	(128)	2093	(126)	2051	(123)
1691	(100)	8	4	2104	(124)	2211	(130)	2167	(128)	2173	(128)	2126	(126)	2104	(124)	2211	(131)

Tabela 2. Wpływ procedury histologicznej na masę mózgu
 Table 2. The influence of histological procedure on the brain weight

Masa świeżej tkanki Fresh weight mg	Formaldehyd Formaldehyde				Odwadnianie Dehydration	Prześwie- tlanie Clearing
	stężenie concentr	temp.	czas time			
			1 dzień day	2 dni days		
1706 (100%)	4%	20°C	2545 (149%)	2614 (153%)	1131 (66%)	1422 (83%)
1790 (100%)	4%	4°C	2491 (139%)	2623 (164%)	1227 (68%)	1534 (86%)
1747 (100%)	8%	20°C	2322 (133%)	2372 (136%)	1070 (61%)	1318 (75%)
1790 (100%)	8%	4°C	2211 (123%)	2267 (127%)	1130 (63%)	1373 (77%)

1 i 7 dni. Badania te dowodzą konieczności uwzględniania poprawek dla wyników ocen morfometrycznych, spowodowanych techniką histologiczną w zależności od wieku badanych zwierząt. Wpływ ten znacznie maleje, gdy ocenia się materiał od zwierząt w wieku 1–6 miesięcy.

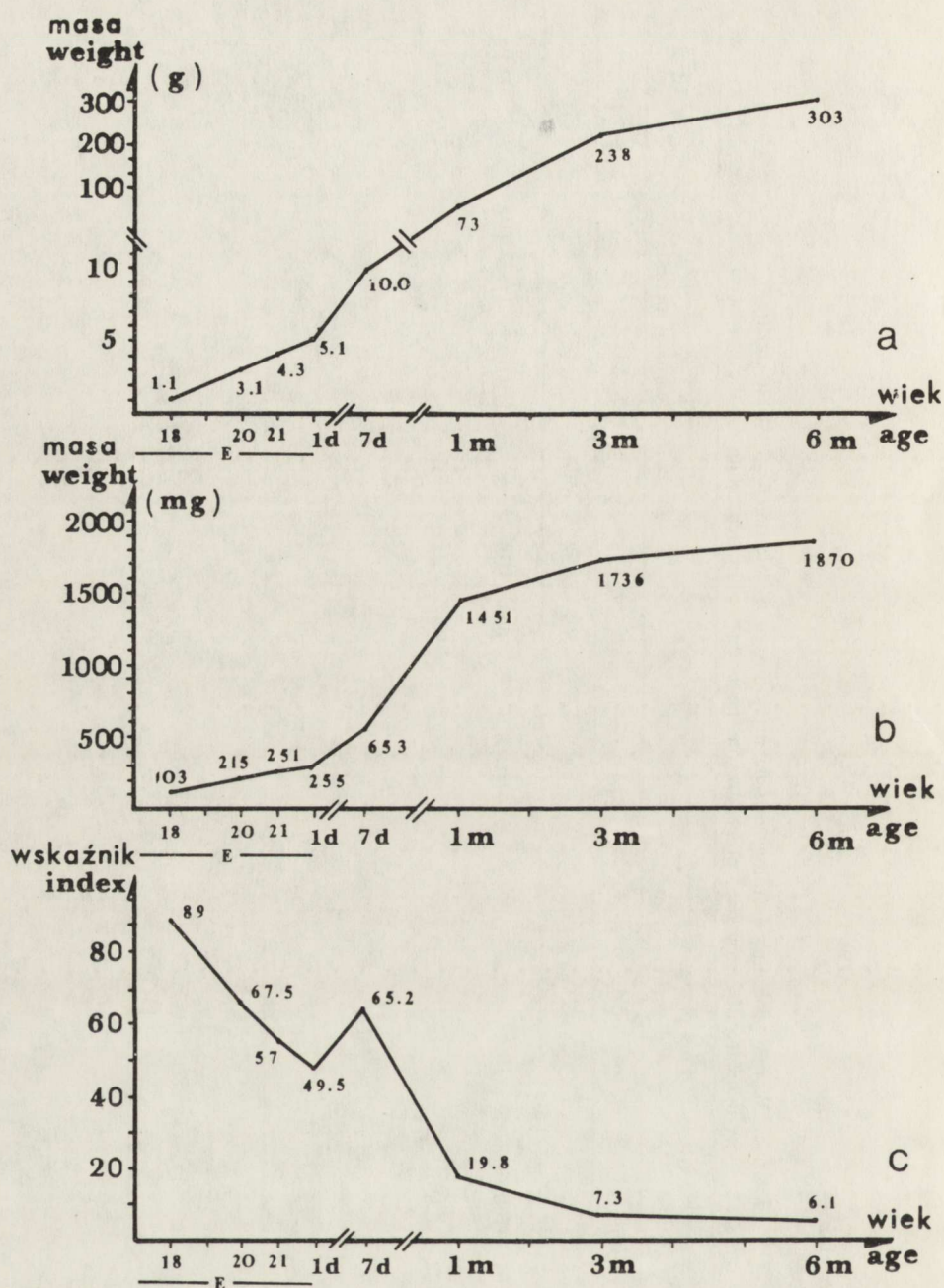
Dynamika zmian ciężaru ciała i mózgu szczura

Porównanie wykresów ilustrujących zmiany ciężaru ciała i mózgu, we wczesnym okresie życia szczura (do 6 miesięcy), sugeruje podobieństwo tych przemian biomorfotycznych. Ciężar ciała szczura wzrasta ponad dwukrotnie (z 1156 do 3187 mg), między 18 a 20 dniem życia płodu. Szczury 1-dniowe ważą 5153 mg. Podwojenie ich ciężaru wymaga już 7 dni (do 10016 mg). Szczury osiągające dojrzałość płciową w 3 miesiącu ważą 237g. Dalszy wzrost ciężaru ciała szczura jest powolny. Między 3 a 6 miesiącem życia przyrost ciężaru ciała wynosi tylko 27% (ryc. 1a). Ciężar mózgu podwaja się między 18 a 20 dniem życia płodowego. Mózg szczura 1-dniowego waży 255 mg. W ciągu pierwszych 7 dni życia następuje prawie potrojenie jego ciężaru (653 mg). Przyrost ciężaru mózgu między 3 a 6 miesiącem życia jest już bardzo wolny i sięga tylko 7% (z 1736 mg do 1870 mg) (ryc. 1b).

Relację zmian rozwojowych całego organizmu i mózgu ujawnia wskaźnik ciężaru ciała w przeliczeniu na 1000 mg ciężaru ciała. Wartość tego wskaźnika zmienia się w badanym okresie życia szczura w bardzo szerokich granicach: od 89,1 w 18 dniu życia płodowego do 6,1 w 6 miesiącu życia szczura. Tendencja spadkowa obserwowana jest w ciągu całego półrocza, z wyjątkiem okresu między 1 a 7 dniem życia. W tym czasie wartość wskaźnika przejściowo wzrasta z 49,5 do 65,2 (ryc. 1c). Obserwowane zmiany świadczą o relatywnie zaawansowanym rozwoju mózgu w ostatnich dniach życia płodowego i bardzo wczesnym okresie życia pozapłodowego szczura. Wartość tego wskaźnika maleje między 3 a 6 miesiącem, co oznacza wyrównywanie tempa rozwoju mózgu i całego organizmu.

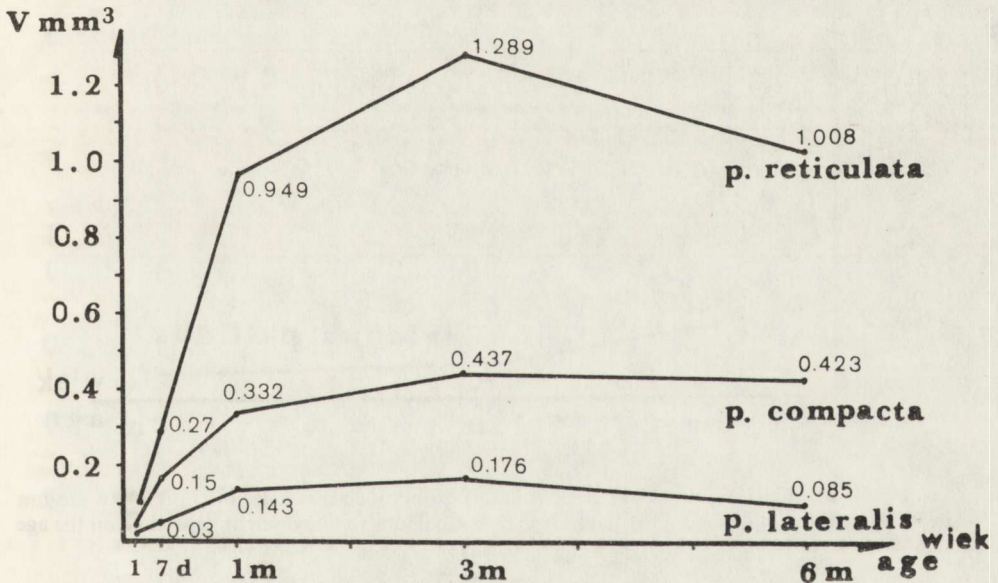
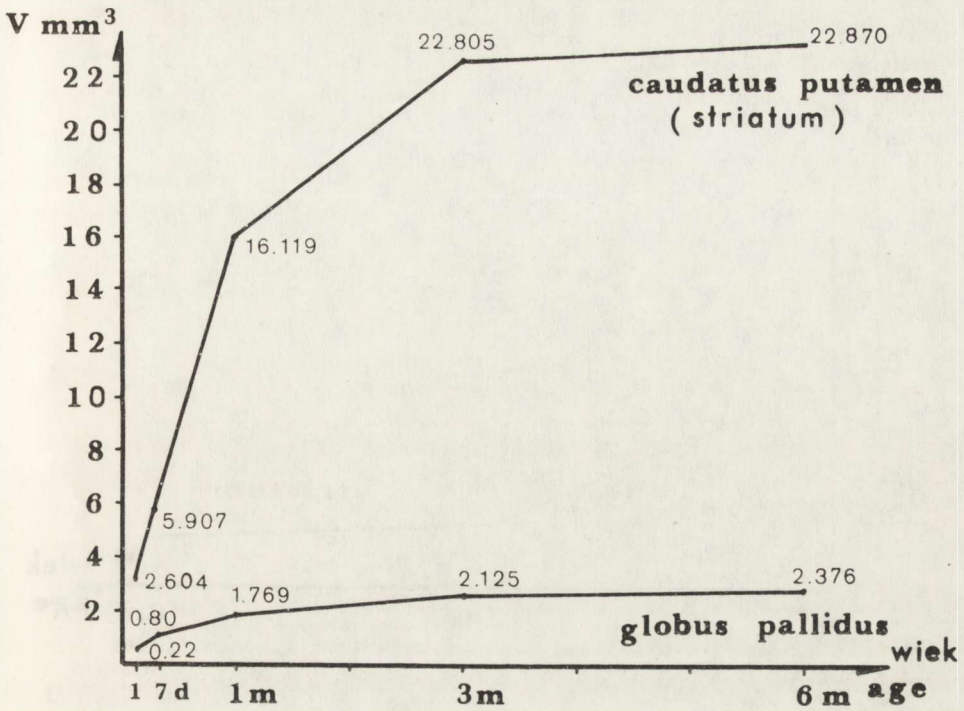
Tabela 3. Wpływ procedury histologicznej na masę mózgu w zależności od wieku szczura
 Table 3. The influence of histological procedure on the brain weight depending on the age of rat

Masa mózgu Brain weight	Okres płodowy Fetal period						Okres po urodzeniu Postnatal period									
	18 d		20 d		21 d		1 d		7 d		1 m		3 m		6 m	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Świeży (100) Fresh	104	(100)	215	(100)	251	(100)	255	(100)	653	(100)	1451	(100)	1763	(100)	1870	(100)
Utrwalony Fixation	138	(+33)	225	(+5)	262	(+5)	393	(+54)	983	(+57)	1837	(+27)	2257	(+28)	2230	(+19)
Odwodniony Dehydration	45	(-56)	78	(-64)	36	(-64)	108	(-58)	315	(-52)	762	(-47)	1065	(-40)	1085	(-42)
Prześwietlony Clearing	52	(-50)	99	(-54)	113	(-55)	144	(-44)	409	(-37)	924	(-36)	1290	(-27)	1358	(-27)

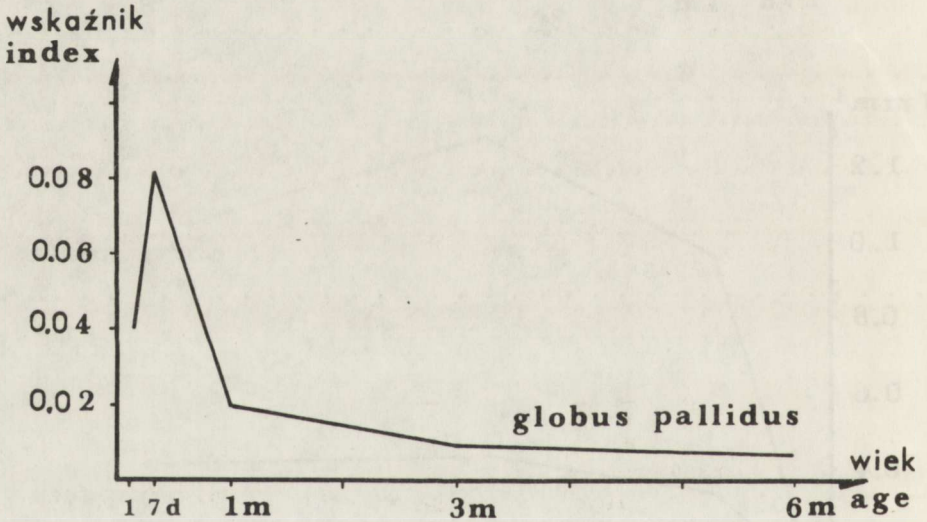
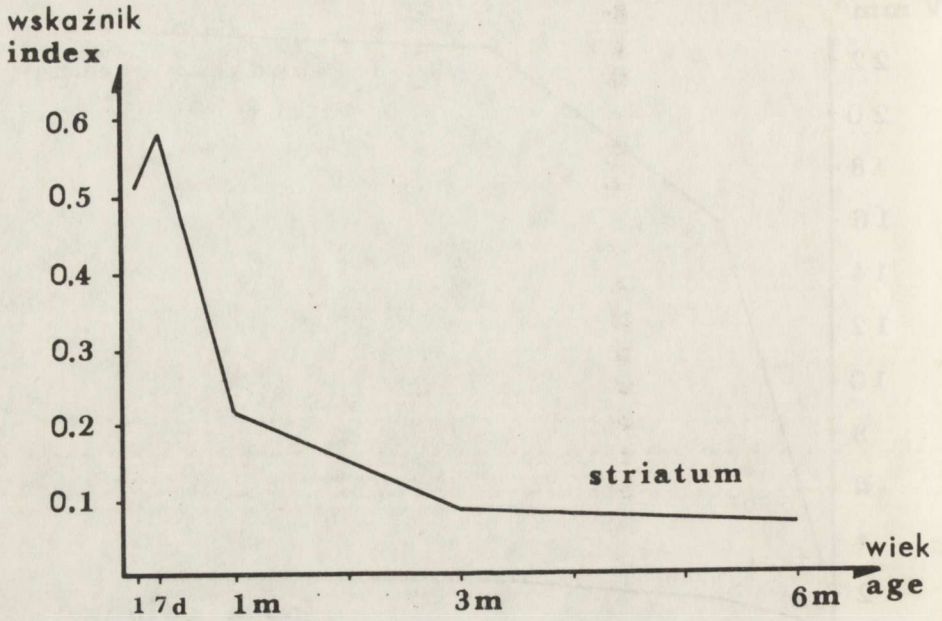


Ryc. 1: a – zmiany masy ciała w zależności od wieku szczura, b – zmiany masy świeżego mózgu w zależności od wieku szczura, c – stosunek masy świeżego mózgu do masy ciała (wskaźnik na 1000 mg masy ciała)

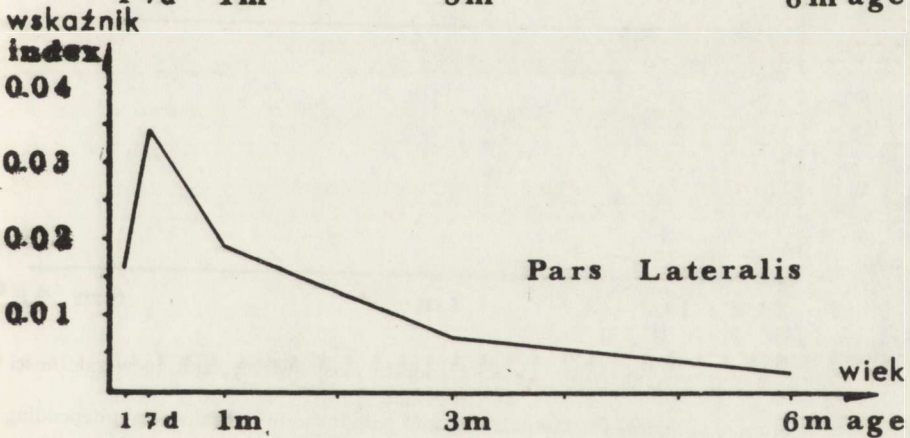
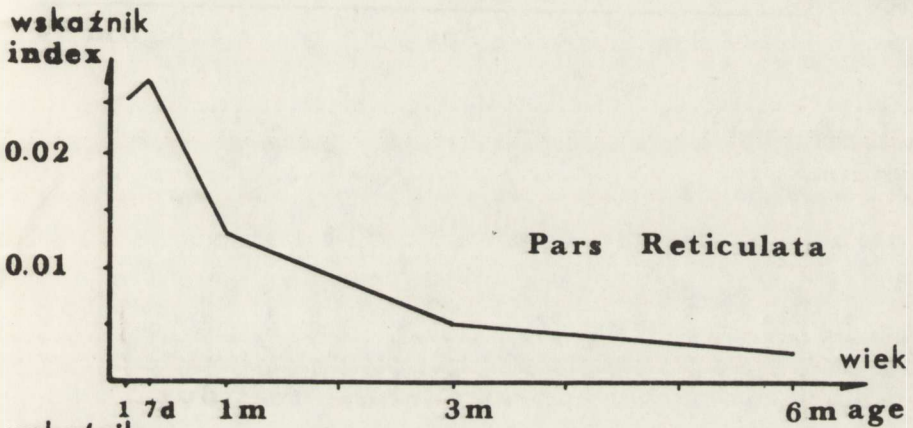
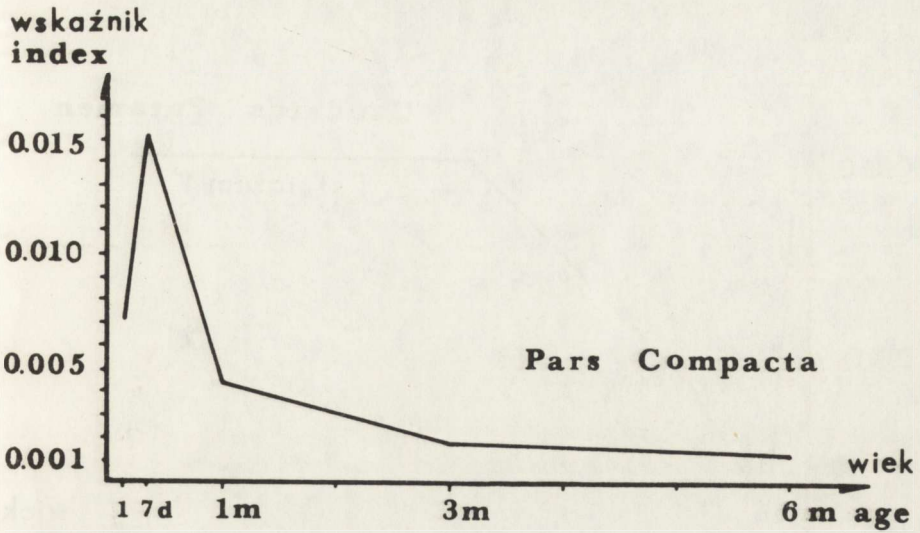
Fig. 1: a – changes of body weight depending on the age of rat, b – changes of fresh brain weight depending on the age of rat, c – the relation of fresh brain weight to body weight (index per 1000 mg of body weight) depending on the age of rat



Ryc. 2. Zmiany objętości prążkowiec, gałki bladej i istoty czarnej w okresie 6 miesięcy życia szczura
 Fig. 2. Changes of volumes of striatum, globus pallidus and substantia nigra during 6 months of life

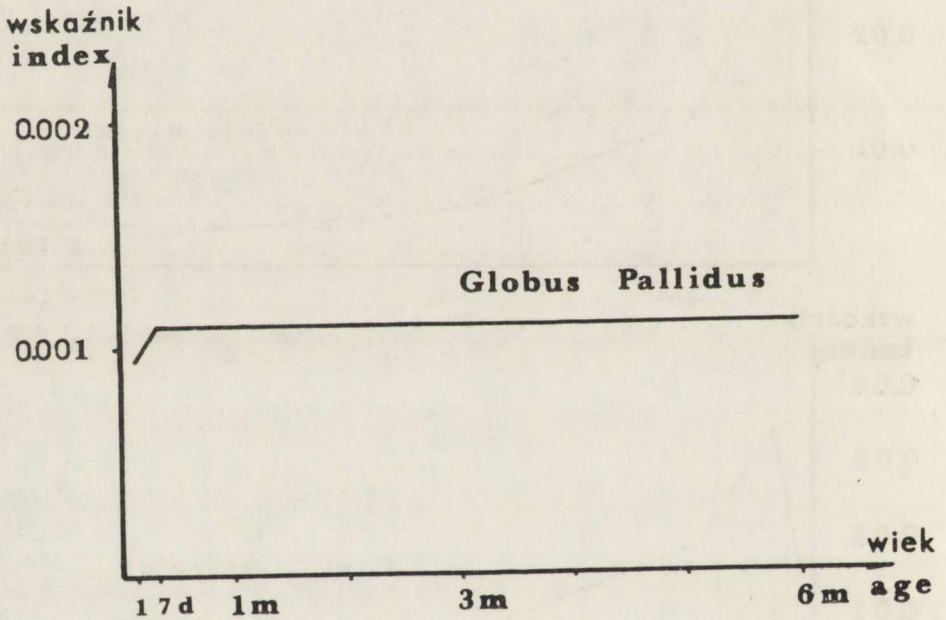
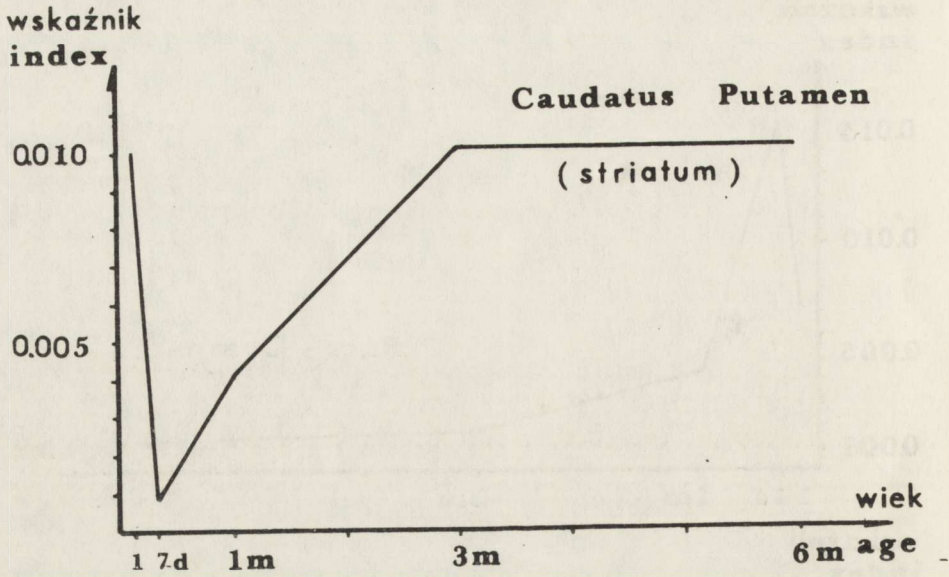


Ryc. 3. Stosunek objętości prążkowiec i gałki bladej do masy ciała w zależności od wieku szczura
Fig. 3. The relation of volumes of striatum and globus pallidus to body weight depending on the age of rat



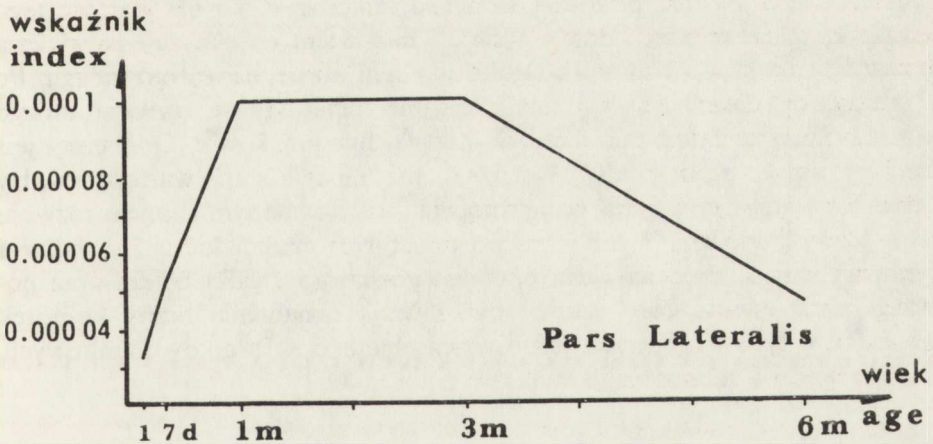
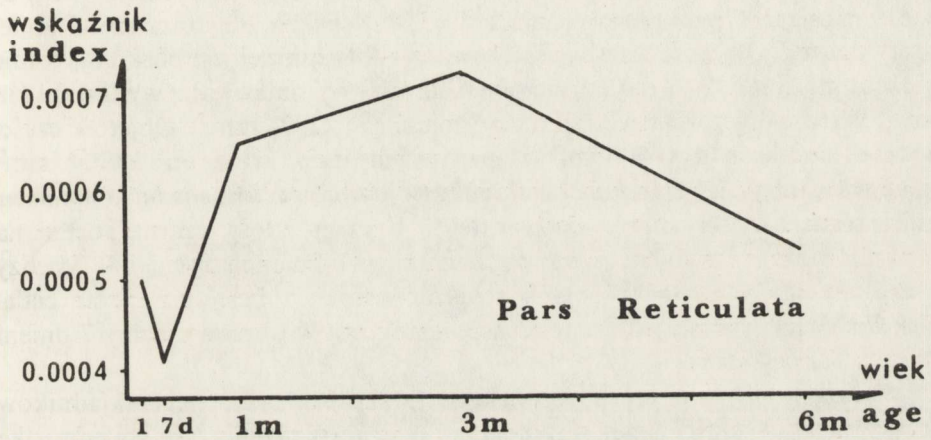
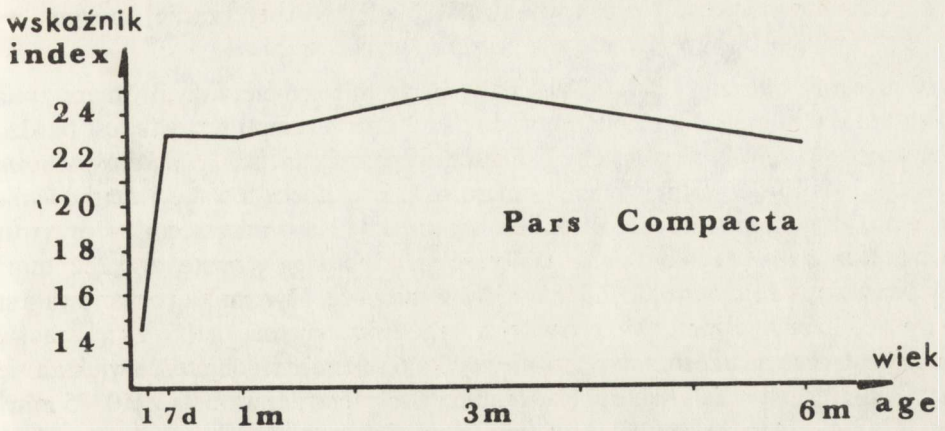
Ryc. 4. Stosunek objętości poszczególnych części istoty czarnej do masy ciała w zależności od wieku szczura

Fig. 4. The relation of volumes of substantia nigra parts to body weight depending on the age of rat



Ryc. 5. Stosunek objętości prążkownia i gałki bladej do masy świeżego mózgu w zależności od wieku szczura

Fig. 5. The relation of volumes of striatum and globus pallidus to fresh brain weight depending on the age of rat



Ryc. 6. Stosunek objętości poszczególnych części istoty czarnej do masy świeżego mózgu w zależności od wieku szczura

Fig. 6. The relation of volumes of substantia nigra parts to fresh brain weight depending on the age of rat

Zmiany objętości prążkowania, gałki bladej i istoty czarnej mózgu w pierwszym półroczu życia szczura

Objętość *nucleus caudatus-putamen* rośnie między pierwszym dniem życia szczura a 6 miesiącem z $2,604 \text{ mm}^3$ do $22,87 \text{ mm}^3$. Tempo wzrostu jest bardzo zróżnicowane. W pierwszych 7 dniach objętość *nucleus caudatus-putamen* wzrasta o 126%, między 7 a 30 dniem o 173%. Zdecydowane zahamowanie tempa wzrostu prążkowania obserwuje się między 3 a 6 miesiącem — przyrost objętości wynosi tylko 0,3%. Objętość gałki bladej wzrasta z $0,222 \text{ mm}^3$ w pierwszym dniu życia do $2,376 \text{ mm}^3$ w 6 miesiącu. Dynamika rozwojowa jest również zróżnicowana. W pierwszym tygodniu objętość gałki zwiększa się o 260%, w ciągu trzech miesięcy (między 3 a 6 miesiącem) objętość zwiększa się tylko o 12% (ryc. 2). Objętość części zbitej istoty czarnej wzrasta z $0,0375 \text{ mm}^3$ w 1 dniu życia do $0,4229$ w 6 miesiącu. Przyrost w pierwszym tygodniu przekracza 300%, ale między 7 a 30 dniem wynosi tylko 119%. Między 3 a 6 miesiącem ujawniono nieznaczny (3,3%) spadek objętości części zbitej istoty czarnej. Objętość warstwy siatkowatej istoty czarnej jest blisko 3-krotnie większa niż zbitej. W 1 dniu życia objętość warstwy siatkowatej wynosi $0,1286 \text{ mm}^3$. Wzrost objętości trwa tylko do 3 miesiąca ($1,2891 \text{ mm}^3$). Objętość części bocznej rośnie z $0,0083 \text{ mm}^3$ w pierwszym dniu życia do $0,1764 \text{ mm}^3$ w 3 miesiącu (ryc. 2). Dynamika zmian rozwojowych *nucleus caudatus-putamen*, gałki bladej, części zbitej, siatkowatej i bocznej istoty czarnej oceniana w porównaniu z rozwojem całego organizmu jest odmienna (ryc. 3 i 4). Między 1 a 7 dniem życia objętość tych struktur rośnie szybciej niż ciężar ciała. Wskaźnik ten ujawnia jednak tendencję spadkową w okresie między 7 dniem życia a 6 miesiącem.

Wskaźnik objętości jądra ogoniastego — skorupy oraz trzech składników istoty czarnej — części zbitej, siatkowatej i bocznej w przeliczeniu na jednostkę ciężaru mózgu ujawnia podobny kierunek zmian (ryc. 5 i 6). Wartość tego wskaźnika rośnie między 7 dniem życia a 3 miesiącem, co wskazuje na większą dynamikę rozwojową badanych struktur w tym czasie, niż całego mózgu. Po 3 miesiącach obserwuje się stabilizację lub przewagę w rozwoju mózgu w zestawieniu ze zmianami w istocie czarnej lub prążkowie. Odmienny jest przebieg zmian gałki bladej. Wskaźnik ma niemal stałą wartość między 7 dniem a 6 miesiącem życia, co przemawia za wyrównanym tempem rozwoju gałki bladej i mózgu. Wyniki przeprowadzonych badań kierunku, zakresu dynamiki zmian objętości jądra ogoniastego-skorupy, gałki bladej oraz poszczególnych części istoty czarnej umożliwiają oznaczenie liczby komórek zawartych w tych strukturach, jak również objętości składników tkankowych, komórkowych i subkomórkowych.

WNIOSKI

Wyniki badań morfometrycznych w mikroskopie świetlnym zależą od metod utrwalania, odwadniania i prześwietlania.

Utrwalanie w formaldehydzie powoduje wzrost objętości i ciężaru mózgu – nawet o 52%. Najmniejsze zmiany powoduje utrwalacz o wysokim stężeniu (8%) działający w temperaturze 20°C.

Wzrost objętości mózgu zależy od czasu utrwalania, jest największy w drugiej dobie, po czym stopniowo maleje.

Mózgi pobrane od zwierząt w różnym wieku zwiększają swoją objętość w trakcie utrwalania w różnym stopniu – największe zmiany występują w mózgach zwierząt w wieku 1–7 dni.

Odwadnianie mózgu w alkoholu etylowym powoduje spadek jego ciężaru i objętości o 32–39% w stosunku do mózgu świeżego.

Prześwietlenie w benzoesanie metylu powoduje kilkuprocentowy wzrost ciężaru i objętości mózgu w stosunku do mózgu świeżego.

Po utrwaleniu, odwodnieniu i prześwietleniu ciężar mózgu jest niższy od mózgu świeżego o 25% (formaldehyd 8%, temperatura 20°C).

W ciągu pierwszego półrocza życia objętość jądra ogoniastego-skorupy rośnie z 2,604 do 22,87 mm³, gałki bladej z 0,222 do 2,376 mm³, części zbitej istoty czarnej z 0,0375 do 0,42229 mm³, części siatkowatej z 0,1286 do 1,2891 mm³, a bocznej z 0,0083 do 0,1764 mm³.

Dynamika rozwoju tych struktur jest w pierwszych 7 dniach życia większa, niż dynamika wzrostu ciężaru całego ciała. Wskaźnik ten maleje jednak nieustannie między 7 dniem a 6 miesiącem życia.

Rozwój prądkowia i istoty czarnej jest szybszy od rozwoju mózgu między 7 dniem a 3 miesiącem życia. Dynamika rozwoju gałki bladej i mózgu jest jednakowa, równomierna w okresie życia pozapłodowego.

INFLUENCE OF HISTOLOGICAL PROCEDURE ON THE VOLUME AND WEIGHT OF SOME BRAIN STRUCTURES OF RAT IN THE EARLY STAGE OF LIFE

Summary

The aim of the studies was to elaborate technical procedure of material preparation for quantitative studies and determination of correction coefficients of morphometric parameters in dependence on histological procedure. Moreover, volume changes of the rat substantia nigra and striatum (structures degenerating in Parkinson's disease) during the first half year of life were estimated.

As fixatives 4 and 8% formaldehyde in 4 and 20°C were used. Irrespective of applied variant of fixation formaldehyde produced during first 48 hrs rapid increase of the brain weight and volume up to 52% of that of the fresh brain, which was followed by slow decrease of brain weight of about 1–3%/24 hrs. The most pronounced changes caused 4% formaldehyde in 20°C. The best conditions for morphometric studies were obtained with the use of 8% formaldehyde in 20°C. Dehydration in ethyl alcohol produced violent decrease of brain volume and weight (from 32% up to 39% of the fresh brain weight). Clearing in methyl benzoesane increases again the brain weight by a few percentage. The obtained results make possible to estimate error size in morphometric studies conducted on the formaldehyde-fixed material. It was stated also that the above histological procedure causes more pronounced changes in fetal rat brain and in brain of 1–2-day-old rats. Stabilization of changes caused by histological procedure is achieved between first and sixth months of rat life.

PIŚMIENICTWO

1. Bahr C. F., Bloom G., Friberg U.: Volume changes of tissue in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide of formaldehyde and during subsequent treatment. *J Hirnforsch*, 1957, 5, 23–38.
2. Frontera J. G.: Evaluation of the immediate effects of some fixatives upon the measurements of the brains of macaques. *J Comp Neurol*, 1958, 109, 3, 417–438.
3. Heidenhain M.: Das Anhauchen des Blockes als Hilfsmittel beim Abziehen der Paraffinschnitte. *Z Wissenschaft Mikrosk*, 1916, 33, 235–237.
4. Koenig J. F. R., Klippel R. A.: The rat brain — A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1963.
5. Kraus C.: Veränderungen der Paraffinschnitte durch das Mikrotomieren und das nachfolgende Aufziehen. *J Hirnforsch*, 1962, 5, 23–38.
6. Leibnitz L.: Untersuchungen zur Optimierung der Gewichts und Volumenänderungen von Hirnen während der Fixierung, Dehydrierung und Aufhellung sowie über Rückschlüsse von Gewicht des behandelten auf das Volumen des frischen Gehirns. *J. Hirnforsch*, 1971–1972, 13, 321–329.
7. Sherwood M. M., Timiras P. S.: A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 1970.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

28 kwietnia 1989 r. tytuły profesorów nadzwyczajnych otrzymały:

- doc. dr hab. Danuta Różniecka-Rościszewska, kierownik II Kliniki Neurologicznej Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze,
- doc. dr hab. Krystyna Cedro-Ceremużyńska, kierownik Pracowni Fizjologii Krążenia Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Jerzy Dymecki

W. Sobaniec, P. Rudziński, E. Jankowicz, M. Sobaniec-Łotowska, W. Kułak: Cardiazol-induced seizures and the concentrations of lipid peroxides in the brain of rats under the influence of valproic acid and vitamine E	229
E. Bertrand, E. Tarnowska-Dziduszko, S. Cichy: Generalized form of brain actinomycosis	237
G. M. Szpakowa, E. Tarnowska-Dziduszko, B. Iwińska-Buksowicz: Aspergillosis in the brain of patient with pancytopenia	245
W. Papierz, B. Lach: Ultrastructure of the sarcomatous component in gliosarcomas	255
P. Nowacki, C. Fryze, J. Kulczycki, K. Honczarenko: Cerebellar degenerative changes in adult non-lymphoblastic leukemias	269
J. Węgiel, E. Medyńska, W. Dziedziak, W. Szirkowiec-Gmurczyk, J. Dymecki: Influence of histological procedure on the volume and weight of some brain structures of rat in the early stage of life	279
J. Dymecki: Chronicle and informations	295

SPIS TREŚCI

J. Losy: Układ nerwowy i immunologiczny. Wspólne struktury antygenowe	145
H. Drac: Swoistość ogniskowych zgrubień mieliny w nerwach obwodowych	151
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerczewicz, D. Talkowska, J. Pankrac, A. Grochowalska: Wpływ ostrego doświadczalnego niedotlenienia na białko mieliny	169
G. M. Szpakowa: Topografia i struktura wtórnych uszkodzeń mózgu w przebiegu obrzęku towarzyszącego nadnamiotowym ogniskom rozmiękania mózgu	177
W. Rokicki, M. Rokicki, K. Kamiński, B. Peciak, E. Gębska: Badania doświadczalne nad patomechanizmem encefalopatii wrotnej. I. Zmiany aktywności monoaminooksydazy (MAO) w korze mózgowej i w mózdzku szczurów po chirurgicznym wytworzeniu przetoki wrotno-czecznej	199
M. Rokicki, W. Rokicki, R. Tarnawski, E. Gębska, B. Peciak: Badania doświadczalne nad patomechanizmem encefalopatii wrotnej. II. Zachowanie się aktywności monoami- nooksydazy (MAO) w tkance nerwowej szczurów po dwóch różnych sposobach zespolecia żyły wrotnej z żyłą próżną dolną	209
K. Renkawek, E. Matyja, E. Kida, W. Kuran: Badania morfologiczne hodowli mózdzku i prądkowia poddanych działaniu kwasu kainowego oraz kwasu kainowego z Tiapridem	217
W. Sobaniec, P. Rudziński, E. Jankowicz, M. Sobaniec-Łotowska, W. Kułak: Wpływ kwasu walproinowego i witaminy E na zawartość nadtlenków lipidów w mózgu szczurów oraz obraz drgawek kardiazolowych	229
E. Bertrand, E. Tarnowska-Dziduszko, S. Cichy: Uogólniona postać promienicy mózgu	237
G. M. Szpakowa, E. Tarnowska-Dziduszko, B. Iwińska-Buksowicz: Wybiórcza grzybica kropidlakowa mózgu (<i>Aspergillus</i>) u chorej z pancytopenią	245
W. Papierz, B. Lach: Ultrastruktura składnika mięsakaowego w <i>gliosarcoma</i>	255
P. Nowacki, C. Fryze, J. Kulczycki, K. Honeczarenko: Zmiany zwyrodnieniowe w mózdzku w białaczkach nie-limfoblastycznych u dorosłych	269
J. Węgiel, E. Medyńska, W. Dziedziak, W. Szirkowiec-Gmurczyk, J. Dymecki: Wpływ techniki histologicznej na objętość i masę niektórych struktur mózgu szczura we wczesnym okresie jego życia	279
J. Dymecki: Dział kroniki i informacji	295

CONTENTS

J. Losy: Nervous and immune systems: Shared antigenic properties	145
H. Drac: On the specificity of focal thickenings of myelin in peripheral nerves	151
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerczewicz, D. Talkowska, J. Pankrac, A. Grochowalska: Influence of experimental acute hypoxia on myelin proteins	169
G. M. Szpakowa: Topography and structure of secondary brain lesions in the course of edema associated with supratentorial foci of encephalomalacia	177
W. Rokicki, M. Rokicki, K. Kamiński, B. Peciak, E. Gębska: Experimental investigations on the pathomechanism of portal encephalopathy. I. Activity of monoamine oxidase (MAO) in brain cortex and cerebellum of rats after portacaval shunt	199
M. Rokicki, W. Rokicki, R. Tarnawski, E. Gębska, B. Peciak: Experimental investigations on the pathomechanism of portal encephalopathy. II. Activity of monoamine oxidase (MAO) in rat brain after two different methods of portacaval shunt	209
K. Renkawek, E. Matyja, E. Kida, W. Kuran: Morphological study on striatum and cerebellum cultures exposed to kainic acid and kainic acid and Tiapride treatment	217