

Dr. Zangheri  
0022  
PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROATOLOGIA POLSKA

TOM 25

1987

ZESZYT 3

---

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

<http://rcin.org.pl>



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 25

1987

ZESZYT 3

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY WSPÓŁPRACY

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

## REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

## REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski  
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina Zelman  
Sekretarz Redakcji: Anna Zaręba-Kowalska

## ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,  
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-54-10, 49-54-20

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1988.  
Nakład: 600 egz. Objętość: ark. wyd. 8,20, ark. druk. 7,25, ark.  
A<sub>1</sub> - 10. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania  
1987-06-22. Podpisano do druku 1987-12-29. Druk - ukończono  
w lutym 1988. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 324/87. C-7.  
Cena zł 180,—



MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ, JANINA  
STANISŁAWSKA, JÓZEF SZCZECH, ANTONI GODLEWSKI

## PATTERN OF MYELIN LIPIDS IN THE AGEING BRAIN\*

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Ageing brain has provided a subject for numerous studies. However, scientific efforts have been mainly concentrated on changes in the cerebral and cerebellar grey matter. Many contributions have concerned morphology and biochemistry of neuronal dystrophies and have involved attempts to clarify the pathomechanism of senile plaques development. Lastly the research has been concerned with neurotubular changes specific for the ageing process and with disturbances in the neurotransmitter systems connected with synaptic functions (Kulczycki 1973; Iwanowski, Kulczycki 1981).

In our research program we have focused attention on the white matter, especially on the myelin-oligodendroglia complex. The studies presented concern the pattern of myelin lipids in aged persons.

### MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on autopsy material of 10 patients deceased at the age of 74 to 87 years (mean age 78.1 years). The autopsies were performed 6 to 16 hours after death. The results were compared with the autopsy material of 3 patients aged 27 to 33 years, who died of diseases not involving the nervous system (mean age 29.3 years). Slices were taken from the frontal lobe as well as from the cerebellum and submitted to histological and biochemical studies.

Chemical studies. The myelin fraction was isolated from the dissected white matter according to the method of Norton and Poduslo (1973). Brain homogenates were layered on top of a discontinuous sucrose gradient (0.32 M and 0.85 M, pH 7.0) and centrifuged in a swing-out rotor. Subsequently the crude myelin fraction was dispersed in distilled water

\* Investigations supported by Research Grant No 06-02-II.1.3 from the Polish Academy of Sciences.



Table 1. Neuropathological characteristics of the studied material

Tabela 1. Charakterystyka neuropatologiczna badanego materiału

Sex Płeć	Age (in years) Wiek (w latach)	Diagnosis Rozpoznanie	Methods H + E and Nissl Metoda H + E i Nissl	Kanzler	Weil	PAS	Bielschowsky
1. Female	74	Cerebral arteriosclerosis Status lacunaris Senile atrophy	Vascular changes Many neurocytes with degenerative and pig- ment changes	Subependymal fibrillary gliosis	Mild perivascular pallor	Perivascular amyloid deposits	Moderate number of senile plaques
2. Female	73	Cerebral arteriosclerosis Senile atrophy	Vascular changes Numerous neurocytes with degenerative changes	Without changes	Without changes	PAS-positive deposits in many Purkinje's cells	Moderate number of senile plaques
3. Male	86	Cerebral arteriosclerosis Senile atrophy	Vascular changes Numerous neurocytes with degenerative and pigment changes	Without changes	Mild focal pallor	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Numerous senile plaques Single neurofibril- lary tangles
4. Female	80	Cerebral arteriosclerosis	Vascular changes Numerous neurocytes with degenerative and pigment changes	Mild perivascular gliosis	Mild spongious changes of the cerebral cortex	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Without changes
5. Male	80	Cerebral arteriosclerosis	Vascular changes	Without changes	Mild perivascular pallor	Without changes	Without changes
6. Female	74	Cerebral arteriosclerosis	Vascular changes Single neurocytes with degenerative and pigment changes	Without changes	Perivascular spongiosis	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Without changes
7. Female	78	Cerebral arteriosclerosis Senile atrophy	Vascular changes Numerous neurocytes with degenerative and pigment changes	Mild perivascular gliosis	Perivascular spongiosis Small foci of pallor	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Numerous senile plaques Single neurofibril- lary tangles



8. Female	84	Cerebral arteriosclerosis Senile atrophy	Vascular changes Fields of neuronal rarefaction in cerebral cortex Single neurocytes with degenerative and pigment changes	Perivascular gliosis	Mild perivascular pallor	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Very numerous senile plaques Single neurofibrillary tangles
9. Female	87	Cerebral arteriosclerosis Senile atrophy	Vascular changes Fields of neuronal rarefaction in cerebral cortex Single neurocytes with degenerative and pigment changes	Without changes	Mild perivascular pallor	Single neurocytes with PAS-positive deposits	Numerous senile plaques
10. Male	85	Cerebral arteriosclerosis	Vascular changes Fields of neuronal rarefaction in cerebral cortex Single neurocytes with degenerative and pigment changes	Without changes	Mild perivascular pallor	Single cortical neurocytes with PAS-positive deposits	Moderate number of senile plaques



and centrifuged at 70 000 g for 20 min. The washing procedure was repeated 3 times. The final sediment was then lyophilized.

Myelin lipids were extracted according to the method of Folch-Pi et al. (1957) and the extracted total lipids were then separated by means of column and thin-layer chromatography (TLC). Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated according to the method of Svennerholm (1964). Quantitation of cholesterol from TLC plates was accomplished by the method of Sperry and Webb (1950) and the content of cerebrosides and sulfatides by means of the method described by Radin et al. (1955). Phospholipids were separated by means of bidimensional TLC according to Singh et al. (1971), and quantitated on the basis of the phosphorus content of the individual phospholipid fractions, which was determined according to the method of Bartlett (1958).

Histological studies. Morphological evaluation of the material was performed after embedding it in paraffin and staining by the following methods: Nissl, Weil, hematoxylin-eosin, Kanzler, Van Gieson and PAS. Frozen sections were silver-stained by the method of Bielschowsky.

## RESULTS

Short neuropathological characteristics of the material under study are presented in Table 1. The data provided rationale for classifying aged persons (above 70 years of age) into two subgroups: patients in which only vascular changes existed in the brain (atheromatosis, arteriosclerosis or amyloid angiopathy) — 3 cases, and those in whom vascular changes of a similar character were accompanied by senile atrophy. Signs of the latter process, evident in the cerebral cortex, included the presence of senile plaques, of early, immature and mature character as well as dystrophy of neurocytes, mainly of pigment type. Neurofibrillary tangles of Alzheimer type were found only in single cases and in few neurocytes, so that none of the studied cases could be classified as Alzheimer senile dementia.

In all cases the white matter did not exhibit pronounced demyelination. Only in few cases was some myelin pallor noticed, localized perivascularly, or, more rarely, in the axes of gyri or as scattered small fields in the cerebral and cerebellar white matter.

Results of chemical studies on myelin lipids of the frontal lobe are present in Table 2, and those concerning the cerebellar white matter are shown in Table 3. Changes in both studied structures, i.e. in the frontal lobe and in the cerebellum, were very similar. The characteristic changes, observed in all studied cases and statistically significant when calculated as respective means, involved increase in lysophosphatidylcholine content, increased content of cholesteryl esters and a slight increase in total phospholipids as well as in the majority of phospholipid fractions



(phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine + phosphatidylinositide and plasmalogens). The only phospholipid fraction, which showed an unaltered level were sphingomyelins. The obtained results were almost identical in two subgroups of patients, differing in the neuropathological pattern, i.e. in patients exhibiting only vascular changes in the brain, and those who also showed signs of senile dementia.

#### DISCUSSION

The structure of the cerebral myelin sheath in the ageing process has been examined in morphological studies including ultrastructural ones. Iwanowski (1984) who studied, employing the electron microscope the white matter in Wistar rats, aged 26 to 36 months found several changes in the myelin sheath. They consisted of disintegration of the intraperiod line, formation of loops, vesicles and formation of irregular multivesicular structures. The changes in myelin were often accompanied by axon lesions and degeneration of oligodendrocytes. Iwanowski and Ostenda (1974) observed in ageing brain perivascular gliosis, indicating an increased permeability of vessel walls due to degenerative changes. For this reason the author, advocated the view that vascular degeneration is the primary factor leading to axon damage and subsequently to myelin alterations.

Tarnowska-Dziduszko (1973), in studies on the morphological pattern of the cerebellum during the ageing process in humans noted some changes in the myelin sheaths including pallor and lesion of myelin in the axes of gyri as well as some demyelination at the lobular top. Taraszewska et al. (1971) performed neuropathological analysis of changes in aged dogs with tumours of internal organs and noted advanced myelin pallor at all levels of the brain and of the spinal cord.

There are but few chemical studies of the myelin in the course of ageing. Norton and Cammer (1984) in the monographic summary of chemical changes in myelin in the course of ontogeny, presented data concerning only late adult age of the rat (425th day of life). In this period no changes in the lipid pattern of the myelin were noted, as compared with early adult age.

The fatty acid composition of phosphatidylethanolamine and glycerophospholipids in myelin isolated from human brain (Samorajski, Ordý 1972) showed a relative increase with age in the proportion of monoenoic fatty acids (18:1 and 20:1) and a decrease in polyunsaturated fatty acids (20:4, 22:4 and 22:6).

England and Brun (1986) performed neuropathological and biochemical studies of the white matter of senile and presenile dementia of Alzheimer type and established changes in 60% of cases. The changes consisted of a reduced number of oligodendrocytes, partial loss of axons and



Table 2. Pattern of myelin lipids of the cerebral white matter from the frontal lobe of aged patients (autoptic material)

Tabela 2. Obraz lipidów mieliny istoty białej płata czołowego z materiału autopsyjnego chorych zmarłych w wieku starczym

	Control cases Przypadki kontrolne n = 3	Total material of aged brains Całość materiału chorych zmarłych w wieku podeszłym n = 10	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi mózgu n = 7	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami naczyniowymi bez zmian starczych mózgu n = 3
Cholesterol	24.12 ± 2.68	26.47 ± 1.89	24.29 ± 2.12	31.55 ± 1.82
Cholesteryl esters Estry cholesterolu	0,08 ± 0.005	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.04
Sulfatides Sulfatydy	3.24 ± 0.18	3.41 ± 0.32	3,29 ± 0.18	3.71 ± 0.12
Cerebrosides Cerebrozydy	12.49 ± 1.12	13.65 ± 0.44	13.46 ± 0.61	14.14 ± 0.28
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	15,73 ± 1.28	17.06 ± 0.46	16.75 ± 0.62	17.85 ± 0.23
Sphingomyelins Sfingomieliny	3.48 ± 0.70	3.61 ± 0.45	3.61 ± 0.65	3.62 ± 0.35
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	4.97 ± 1.02	6.97 ± 0.70	7.68 ± 0.86	5.50 ± 0.71
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.31 ± 0.12	1.20 ± 0.29	1.14 ± 0.30	1.35 ± 0.21
Phosphatidylserine + Phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + Fosfatydylinozytol	2.60 ± 0.49	4.55 ± 0.82	4.89 ± 1.17	3.75 ± 0.15
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloestanolamina	1.86 ± 0.36	1.92 ± 0.37	2.00 ± 0.54	1.72 ± 0.35
Plasmalogens Plazmalogen	6.25 ± 1.23	8.50 ± 0.61	8.30 ± 0.87	8.99 ± 0.39
Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	19.47 ± 3.21	26.75 ± 1.55	27.62 ± 2.32	24.93 ± 1.12

Results in mmol/100 g of dry myelin

Wyniki w mmol/100 g suchej mieliny

Mean ± SE

Średnia ± SE



Table 3. Pattern of myelin lipids of the cerebellar white matter of aged patients (autoptic material)  
 Tabela 3. Obraz lipidów mieliny mózdzku z materiału autopsyjnego chorych zmarłych w wieku starym

	Control cases Przypadki kontrolne n = 3	Total material of aged brains Całość materiału chorych zmarłych w wieku podeszłym n = 10	Cases with vascular and senile changes Przypadki ze zmianami naczyniowymi i starczymi mózgu n = 7	Cases with vascular changes only Przypadki ze zmianami naczyniowymi bez zmian starczych mózgu n = 3
Cholesterol	25.06 ± 0.98	29.65 ± 2.17	26.88 ± 1.20	36.12 ± 3.55
Cholesteryl esters Estry cholesterolu	0.07 ± 0.005	0.32 ± 0.07	0.31 ± 0.09	0.32 ± 0.14
Sulfatides Sulfatydy	3.16 ± 0.26	3.34 ± 0.20	3.16 ± 0.23	3.78 ± 0.22
Cerebrosides Cerebrozydy	12.68 ± 0.42	13.43 ± 0.44	13.23 ± 0.62	13.91 ± 0.13
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	15.84 ± 0.21	16.77 ± 0.59	16.39 ± 0.82	17.69 ± 0.27
Sphingomyelins Sfingomieliny	4.31 ± 1.56	4.65 ± 0.50	4.44 ± 0.52	5.11 ± 1.03
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	5.54 ± 0.19	7.48 ± 1.02	7.49 ± 1.32	7.46 ± 1.58
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.36 ± 0.09	1.02 ± 0.18	0.85 ± 0.19	1.42 ± 0.35
Phosphatidylserine + Phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + Fosfatydyloinozytol	2.82 ± 0.12	3.21 ± 0.51	2.91 ± 0.63	4.26 ± 0.54
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	1.33 ± 0.26	2.22 ± 0.26	2.12 ± 0.25	3.08 ± 0.44
Plasmalogens Plazmalogen	6.79 ± 0.41	8.70 ± 0.82	8.63 ± 1.06	8.84 ± 1.52
Total phospholipids	21.15 ± 0.28	27.28 ± 2.39	26.44 ± 2.88	30.17 ± 3.08

Results in mmol/100 g of dry myelin

Wyniki w mmol/100 g suchej mieliny

Mean ± SE

Średnia ± SE



myelin sheaths and a mild reactive astrogliosis. Quantitative studies of white matter lipids showed that cerebrosides and sulfatides were in 30—40% reduced in senile dementia of Alzheimer type with concomitant lesion of the white matter. The authors suggested that the white matter changes were an independent pathological process, and not secondary demyelination. However, the changes are not necessarily related to the process of Alzheimer senile dementia itself.

In our own studies of the myelin lipid pattern of the brain in aged patients, three main types of changes were disclosed: the increased contents of lysophosphatidylcholine and cholesteryl esters as well as the increase in total phospholipid content, resulting from increased levels of the majority of phospholipid fractions. The only exception in the phospholipids involved was the normal content of sphingomyelins.

The character of changes observed in the myelin lipids of the ageing brain is strikingly similar to that found by us in experiments on the effect of hypoxia on myelin lipids of the rat (Wender et al. 1987). In the latter experimental studies a markedly increased cholesterol esterification, production of an excess of lysophosphatidylcholine and an increased content of several phospholipid fractions were noted as the result of hypoxia. In the experimental model, we have also noticed a marked decrease in free cholesterol content.

The presented similarity between the pattern of myelin lipids observed in human aged brain and that found after hypoxia in rats, despite of species differences, suggests that the decisive role in the pathomechanism of myelin changes in aged persons, is played by vascular degeneration. Another important point proving this conclusion is the fact that, despite the lesions of the molecular myelin structure, no clear cut demyelination of the central nervous system was observed either in human aged brains or in experimental material after hypoxia. A similar opinion concerning the pathomechanism of myelin changes in the aged is expressed by Iwanowski (1984), following his ultrastructural studies.

An additional discussion seems necessary concerning the observation that in the aged brain as well as after hypoxia an increase occurred in the majority of phospholipid fractions. In such conditions the enhancement of phospholipid synthesis seems unprobable. Gaiti et al. (1986) have even clearly demonstrated that during ageing the brain loses progressively its ability to synthesize the main phospholipid by the *de novo* pathway. According to these authors, the loss is due to different causes, the most important being the reduced capacity to utilize the simple precursors of the glycerophospholipids biosynthesis. It appears also from the results of the authors' group, that brain structures counteract this decline by the enzymatic mechanisms involved in modification of only a portion of the phospholipid molecule. Therefore, the only explanation of the increased phospholipid content in the aged brain, seems to involve a reciprocal



shift in the lipid and nonlipid compounds of myelin, this causing the phospholipids which are less sensitive to the action of hypoxia (playing also the main role in the pathomechanism of changes in the aged white matter), show a relative increase in relation to the dry myelin mass.

### CONCLUSIONS

1. The pattern of myelin lipids in the ageing brain exhibits an increase of lysophosphatidylcholine, cholesterol esters and of the majority of phospholipid fractions.

2. Changes of myelin lipids in the ageing brain are strikingly similar to those observed in the experimental material of animals subjected to hypoxia.

3. In the pathomechanism of myelin changes in the ageing brain vascular alterations play a decisive role.

### LIPIDY MIELINY W STARZEJĄCYM SIĘ MÓZGU

#### Streszczenie

Badania przeprowadzono na materiale autopsyjnym, chorych zmarłych w wieku powyżej 70 lat. Płat czołowy i mózdzek poddano badaniom histologicznym i biochemicznym. Lipidy wyizolowanej frakcji mielinowej określono ilościowo po rozdziale za pomocą chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej.

W badaniach obrazu lipidów mieliny mózgu chorych zmarłych w wieku starczym stwierdzono trzy główne typy zmian: wzrost zawartości lizofosfatydylocholin i estrów cholesterolu, oraz podwyższenie zawartości całkowitych fosfolipidów wynikające ze wzrostu poziomu większości frakcji fosfolipidowych. Spośród fosfolipidów jedynym wyjątkiem była niezwiększona zawartość sfingomielin.

Uderzające podobieństwo pomiędzy obrazem lipidów mieliny obserwowanym w mózgach starczych u ludzi a stwierdzanym w umiarkowanym i ostrym niedotlenieniu u szczurów, pomimo różnic gatunkowych sugeruje, że w patomechanizmie zmian mielinowych w wieku podeszłym decydującą rolę odgrywają zmiany naczyniopochodne.

Wyjaśnieniem wzrostu zawartości kilku frakcji fosfolipidowych wydaje się przypuszczenie, że w następstwie przesunięcia we wzajemnym stosunku lipidowych i nie-lipidowych składników mieliny, te spośród lipidów osłonki, które odznaczają się najwyższą odpornością, przy przeliczeniu w odniesieniu do suchej masy mieliny, wykazują względny wzrost.

### МИЕЛИНОВЫЕ ЛИПИДЫ В СТАРЕЮЩИМСЯ МОЗГУ

#### Резюме

Исследования были проведены на секционном материале умерших в возрасте выше 70 лет. Фронтальная область и мозжечок исследовались гистологически и биохимически. Количество липидов изолированной миелиновой фракции было определено после распределения при помощи колонной и тонко-слойной хроматографии.



В исследованиях липидов миелина мозга больных умерших в старческом возрасте обнаружено три главные типы изменений: увеличение содержания лизофосфатидильхолина и холестериновых эфиров, а также повышение содержания полных фосфолипидов, связанное с увеличением уровня большинства фосфолипидных фракции. Единственным исключением среди фосфолипидов было неповышенное содержание сфингомиелинов.

Поразительное сходство изменений миелиновых липидов старческих мозгов у людей а наблюдаемых в умеренной и острой гипоксии у крыс, несмотря на междувидовые различия, внушает, что сосудистые изменения имеют решающее значение в патомеханизме миелиновых изменений старческого возраста.

В связи с увеличением содержания нескольких фосфолипидных фракции, можно, вероятно допустить, что вследствие сдвигов во взаимоотношении липидных и нелипидных элементов миелина, самые устойчивые липиды оболочки, при пересчете на сухой вес миелина, проявляют относительное увеличение.

#### REFERENCES

1. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
2. England E., Brun A.: The white matter changes in senile dementia of Alzheimer type: Neuropathological and biochemical correlates. X. Intern. Congr. Neuropathol., Abstracts Stockholm 1986, 291.
3. Folch-Pi J., Less M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
4. Gaiti A., Gatti C., Puliti M., Brunetti M.: Phospholipid metabolism in ageing brain. In: Phospholipid research and the nervous system. Biochemical and molecular pharmacology. Eds. L. Horrocks, L. Freyn, G. Taffano. Liviano Press, Padova, 1986, pp. 225—231.
5. Iwanowski L., Ostenda M.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old age. *Alternsveränderungen des zentralen Nervensystems. Material der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR. Mülhausen (Thür.) 1974*, 121—122.
6. Iwanowski L., Kulczycki J.: Zmiany starcze i choroby przedstarcze. In: *Podstawy Neuropatologii*. Eds. M. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. Warszawa 1981, PZWL.
7. Iwanowski L.: Myelin in the senile rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 219—223.
8. Kulczycki J.: Morfologiczne podłoże procesu starzenia się mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 191—198.
9. Norton N., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—758.
10. Norton W., Cammer W.: Isolation and characterisation of myelin. In: *Myelin*, Ed. P. Morell, Plenum Press, New York and London, 1984, 147—195.
11. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determination of cerebrosides. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
12. Singh H., Spritz M., Geyer B.: Studies of brain myelin in the "quaking mouse". *J. Lipid. Res.*, 1971, 12, 473—483.
13. Samorajski T., Ordy J.: *Neurochemistry of ageing*. Ed. Ch. Gaiti, Plenum Press, New York and London, 1972, pp. 41—63.
14. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—106.
15. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839—859.



16. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w procesie starzenia się. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 199—208.
17. Taraszewska A., Lewicka-Wysocka H., Nozdryn-Plotnicki B.: Analiza neuropatologiczna zmian u psów starczych z nowotworami narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 219—230.
18. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J.: Pankrac J., Tal-kowska D., Grochowalska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipid. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 107—115.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 60-355 Poznań, Poland, Przybyszewskiego 46.



## KOMUNIKATY

Od 18 do 22 kwietnia 1988 r. odbędzie się w Pradze I Europejski Kongres Neurologii.

Głównymi tematami będą:

- Ostre zaburzenia neurologiczne (aspekty kliniczne i doświadczalne),
- Monitorowanie i mapowanie funkcji mózgu,
- Zaburzenia ruchowe,
- Ból.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Association of Czechoslovak Medical Societies, J. E. Purkyne, 1st European Congress of Neurology, Tř. Vítězného února 31, 120 26 Praha 2, Czechoslovakia.

\*

Od 26 do 28 maja 1988 r. odbędzie się w Innsbrucku Międzynarodowy Kongres Chorób Naczyniowych Mózgu.

Termin nadsyłania zgłoszeń i streszczeń prac upływa 1 stycznia 1988 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Sepp Weimann, M. D., Department of Vascular Surgery, Innsbruck University, Annichstrasse 35, A 6020 Innsbruck, Austria.

\*

Od 2 do 4 czerwca 1988 r. odbędzie się w Rzymie II Międzynarodowy Kongres Towarzystwa Zaburzeń Ruchowych.

Termin nadsyłania zgłoszeń i streszczeń prac upływa 10 stycznia 1988 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

A. Berardelli, Quinta Clinica Neurologica, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Viale dell'Università 30, I-00185 Roma, Italia.

\*

Od 7 do 9 września 1988 r. odbędzie się w Zurychu XI Doroczny Zjazd Europejskiego Towarzystwa Nauk Neurologicznych.

Termin nadsyłania zgłoszeń i streszczeń prac upływa 15 marca 1988 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

XI Annual Meeting of the European Neuroscience Association, c/o AKM Congress Service, P.O.Box, CH-4005 Basel, Switzerland.



MIECZYŚLAW WENDER, ANDRZEJ GONCERZEWICZ

## SUSCEPTIBILITY OF WISTAR RATS TO ENCEPHALITOGENIC ANTIGEN DERIVED FROM AGED ANIMALS\*

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The majority of data concerning immunology of the central nervous system, especially those related to the antigenic properties of myelin compounds, have been gained in experiments on the model of allergic experimental encephalomyelitis, a disease well characterized as to its clinical and morphological pattern but of not fully explained pathogenesis.

In studies on EAE induction, great species differences have been found as well as differences between some strains of the same species in susceptibility to the action of encephalitogenic antigen, which has been interpreted as the proof of a genetic background of the immunological reaction within the central nervous system (Levine et al. 1967). It has also been found, that the immunological system of very young animals reacts in a different manner than that adult animals (Brostoff 1984). This correlates well with clinical observations revealing a genetic influence in induction of demyelinating diseases in humans (Wender et al. 1982), as well as with the marked dependence of these diseases from the period of ontogenic development (Traugott, Raine 1984). In particular, the occurrence of primary demyelinating diseases in aged persons is exceptional only. This arouses the question whether the myelin loses or changes its encephalitogenic properties in this period of ontogenic development. We have attempted to approach the problem using the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

### MATERIAL AND METHODS

Wistar rats served as experimental material. The experiments were performed in two groups of 12 animals each. The animals of both groups were challenged with encephalitogenic antigen in the following way.

---

\* The studies were supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No 06-02.II.1.3).



They received a double injection of 0.1 ml of encephalitogenic mixture for three successive days, into each hind foot pad. The composition of the encephalitogenic mixture was as follows: homogenate of rat white matter derived from brain and spinal cord, one part mixed with 2 parts of lanoline and 1 part of paraffin with admixture of 10 mg/ml of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis*. In one experimental group the antigen was taken from cerebral and spinal white matter of aged rats (older than 2 years of life) and in the second one from the same tissues of adult young animals.

Clinical rating of the experimental disease was based on the work of Elliot et al. (1973):

I° — slowing of movements, weight loss, general weakness slightly wobbly gait,

II° — weakness of hind limbs to slight paresis, altered (ataxic) gait,

III° — moderate paraparesis of hind limbs, urine incontinence,

IV° — severe paraparesis to paralysis of hind limbs, impaired respiration.

The dynamics of the disease progress was rated as follows:

I° — nonprogressive type. Intensity of disease of grade I during the first 7 days.

II° — slowly progressing type. Intensity of disease progressing from grade I to II during the first 7 days.

The morphological evaluation of the experimental disease was based on histology of the brain and spinal cord fragments stained by Nissl, hematoxylin-eosin or Spielmeyer method and was rated according to the scale of Alvord and Kies (1959).

I° — mild cellular reaction, visible in single, topographically typical places,

II° — disseminated inflammatory reaction seen as severe perivascular infiltrates in few microscopic fields or weak infiltrates in many fields,

III° — severe, perivascular infiltrates, partially diffused, seen in all microscopic fields under  $\times 30$  magnification in typical regions.

The animals of both experimental groups were killed between the 21–23th day after first inoculation. The results of clinical and morphological studies were statistically checked using the  $\chi^2$  test, for small numbers.

## RESULTS

The clinical syndrome of EAE developed in 7 out of 12 inoculated animals of the control group which were challenged with the encephalitogenic antigen derived from adult young rats. The sick animals showed slowing of movements and altered gait. In the experimental group of rats inoculated with the encephalitogenic mixture containing antigen de-



rived from aged animals (older than two years) clinical symptoms of the same character and intensity were found only in 2 out of 12 inoculated rats. The observed syndrome is comparable to grade I of the Elliot et al. scale. In none of the animals, in either the control or the experimental group paralysis of hind limbs or sphincter insufficiency were observed. The dynamics of the observed morbid process might be reckoned to represent type II (slowly progressing disease). Histopathological studies in the control group revealed in 6 animals inflammatory changes, which could be rated in five animals as grade I and in one rat as grade II of Alvord and Kies scale. In the group of animals challenged with the antigen from aged myelin inflammatory changes of grade I were found in 2 animals. The results are summarized in Table 1. All differences observed between the two groups proved to be statistically significant.

#### DISCUSSION

Various strains of experimental animals are genetically prone to react to the action of encephalitogenic antigen. In many strains considered resistant, it is possible to overcome the low susceptibility by some special combination of adjuvant and encephalitogenic antigen, for induction of the necessary immunological reaction. Wistar rats belong to animals of low susceptibility to the action of antigen provoking experimental allergic encephalomyelitis. Therefore, it is not surprising that in our studies we noted a positive result of inoculation only a little more frequently than in one half of the experimental animals and that the induced morbid process was of low intensity. Nevertheless, and possibly due to this low sensitivity we found significant differences between the action of antigens derived from aged or young adult animals. This indicates changes in the encephalitogenic properties of myelin occurring with age.

The whole problem of differences in induction of experimental allergic encephalomyelitis related to the animal's age arises mainly in the experiments with very young animals, the immunological system of which reacts differently than that of adult ones. The mentioned differences varied from species to species. EAE may be induced early in newborn guinea pigs of strain 13, whereas guinea pigs of strain 2 are resistant (Stone, Lerner 1965). Also chronic relapsing EAE, the experimental disease, which is morphologically and clinically very similar to the most frequent demyelinating disease in humans, to multiple sclerosis, may be induced almost exclusively in very young animals and only in sensitive species and strains (Lassmann, Wiśniewski 1979).

The finding that the antigen derived from aged animals exhibits lower encephalitogenic properties may be taken into consideration in



Table 1. Susceptibility of Wistar rats to encephalitogenic antigen deriving from aged animals  
 Tabela 1. Podatność szczurów Wistar na antygen encefalitogenny pochodzący od zwierząt starych

		Control animals inoculated with encephalitogenic mixture containing antigen deriving from young adult rats Zwierzęta kontrolne zaszczone mieszaniną encefalitogenną z antygenem pochodzącym od szczurów młodych dojrzałych			Animals inoculated with encephalitogenic mixture containing antigen deriving from aged rats Zwierzęta zaszczone mieszaniną encefalitogenną z antygenem pochodzącym od szczurów w wieku starym		
		Number of studied animals Liczba zwierząt badanych	Number of affected animals Liczba zwierząt chorych	Percent of affected animals % zwierząt chorych	Number of studied animals Liczba zwierząt badanych	Number of affected animals Liczba zwierząt chorych	Percent of affected animals % zwierząt chorych
		12	7	58	12	2	17*
Clinical rating in 4-degree scale	I		7	58		2	17*
	II		0	0		0	0
Kliniczna ocena punktowa wg skali czteropunktowej	III		0	0		0	0
	IV		0	0		0	0
Disease process in 4-degree scale	I		0	0		0	0
	II		7	58		2	17*
Dynamika choroby wg skali czteropunktowej	III		0	0		0	0
	IV		0	0		0	0
			Number of animals with inflammatory process Liczba zwierząt z procesem zapalnym	Percent of animals with inflammatory process % zwierząt		Number of animals with inflammatory process Liczba zwierząt z procesem zapalnym	Percent of animals with inflammatory process % zwierząt
Morphology rated in 3-degree scale	I		5	42		2	17*
	II		1	8		0	0
Ocena morfologiczna wg skali trójpunktowej	III		0	0		0	0

\* Differences statistically significant; \* Różnice istotne statystycznie



production of vaccines directly from homogenate of the central nervous systems of inoculated animals, when no possibilities are available of its full purification from myelin antigens and no possibilities exist of using other media for cultivation of a given virus.

#### CONCLUSION

1. Antigen derived from the central nervous system of aged animals exhibits lower encephalitogenic properties as compared with the antigen from the nervous tissue of young adult animals.

#### PODATNOŚĆ SZCZURÓW WISTAR NA ANTYGEN ENCEFALITOGENNY POCHODZĄCY OD ZWIERZĄT W WIEKU STARCZYM

##### Streszczenie

Porównano podatność szczurów rasy Wistar na antygen encefalitogeny w grupach doświadczalnych z użyciem antygeny pochodzącego z istoty białej mózgu i rdzenia kręgowego szczurów, których wiek przekroczył 2 lata, oraz zwierząt młodych dorosłych.

Stwierdzono, że antygen pochodzący z mieliny zwierząt starych posiada mniejsze właściwości encefalitogenne w porównaniu z antygenem od zwierząt młodych dorosłych. Może to być wzięte pod uwagę przy wytwarzaniu szczepionek bezpośrednio z homogenatu ośrodkowego układu nerwowego zaszczepionych zwierząt, jeżeli nie ma możliwości jego pełnego oczyszczenia od antygenów mielinowych i nie można zastosować innego podłoża dla rozwoju danego wirusa.

#### ВОСПРИИМЧИВОСТЬ КРЫС ВИСТАР К ЭНЦЕФАЛИТОГЕННОМУ АНТИГЕНУ, ПРОИСХОДЯЩЕМУ ОТ ЖИВОТНЫХ В СТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

##### Резюме

Сравнивалась восприимчивость крыс расы Вистар к энцефалитогенному антигену в экспериментальных группах, в которых употреблялся антиген, происходящий из белого вещества мозга и спинного мозга крыс в возрасте выше 2 лет и молодых взрослых животных.

Обнаружено, что антиген происходящий из миеллина старых животных обладает меньшими энцефалитогенными свойствами по сравнению с антигеном от молодых взрослых животных. Может быть, нужно это учесть при изготовлении сыворотки непосредственно из гомогената центральной нервной системы привитых животных, если нет возможности его полного очищения от миелиновых антигенов и если невозможно применить другой питательной среды для развития данного вируса.

#### REFERENCES

1. Alvord E. Jr., Kies M.: Clinico-pathologic correlations in experimental allergic encephalomyelitis. II. Development of an index for quantitative assay of encephalitogenic activity of "antigens". J. Neuropath. exper. Neurol., 1959, 19, 447—457.
2. Brostoff S.: Immunological responses to myelin and myelin components. In: Myelin. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 405—440.



3. Elliot G., Gibbons A., Greig H.: A comparison of the effect of melengestrol acetate with the combination of hydrocortisone acetate and with other steroids in the treatment of EAE in Wistar rats. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1973, 23, 95—104.
4. Lassmann H., Wiśniewski H.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Arch. Neurol.*, 1979, 36, 190.
5. Levine S., Wenk E., Hoening E.: Passive transfer of allergic encephalomyelitis between inbred rat strains. Correlation with transplantation antigens. *Transplantation*, 1967, 5, 534—541.
6. Stone S., Lerner E.: Chronic disseminated allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *Science* 1965, 122, 226—227.
7. Traugott U., Raine C.: The neurology of myelin diseases. In: *Myelin*. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York and London, 1984, pp. 311—336.
8. Wender M., Wajgt A., Przybylski Z., Stawarz H., Michałowska G.: CSF immunoglobulin abnormalities in relation to HLA system in multiple sclerosis. *Jub. Conf. on Multiple Sclerosis, Copenhagen, 1982*, 103.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 49 Przyby-  
szewskiego St. 60-355 Poznań.



MARTA STRYJECKA-ZIMMER, IRMINA B. ZELMAN

## BIAŁKA NIEHISTONOWE RÓŻNYCH OBSZARÓW MÓZGU U KRÓLIKA ZDROWEGO I KRÓLIKA PT

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, Lublin, Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Białka niehistonowe pełnią w chromatynie bardzo zróżnicowane funkcje: stanowią jej elementy strukturalne, pełnią funkcje enzymatyczne oraz zawierają komponenty biorące bezpośredni lub pośredni udział w regulacji aktywności genów. Charakteryzują się one znaczną heterogennością i swoistością tkankową (Paul, Gilmour 1968; Elgin, Weintraub 1978; Kleinsmith 1978; Adolph i wsp. 1982). Zmiany w składzie jakościowym, ilościowym oraz metabolizmie białek niehistonowych chromatyny obserwowano w trakcie rozwoju i różnicowania oraz karcinogenezy (Choi i wsp. 1977; OH'Hara, Yanagihara 1977; Hnilica i wsp. 1978; Stein i wsp. 1978; Heizman i wsp. 1980).

Celem niniejszego doniesienia jest porównanie jakościowego i ilościowego składu białek niehistonowych chromatyny jądrowej z mózgu królika pt, mutantu neurologicznego, z białkami niehistonowymi mózgu królika zdrowego, nie obciążonego genetycznie. Badania morfologiczne ośrodkowego układu nerwowego przeprowadzone na materiale królików pt wykazały rozlane, nieswoiste uszkodzenie neuronów i nieprawidłowy przebieg mielinizacji włókien nerwowych ze współistniejącymi zmianami w populacji oligodendrocytów i komórkach astrocytarnych (Taraszewska, Zelman 1981; Taraszewska 1983; Zelman, Taraszewska 1984). Klinicznie zespół pt charakteryzuje się zaburzeniami ruchowymi w postaci zrytmizowanych drżeń, które wyprzedzają rozwijające się później niedowłady lub bezwłady spastyczne (Osetowska i wsp. 1975).

Porównywano białka niehistonowe chromatyny uzyskane z trzech obszarów ośrodkowego układu nerwowego królików pt i kontrolnych: płatów mózgowych (kora i obszary podkorowe), mózdzku i pnia mózgu — struktur różniących się znacznie metabolizmem i zdolnością do syntezy RNA (Mc Ewen i wsp. 1972).

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na królikach pt, 6 tygodniowych samcach i samicach, u których stwierdzono pełny zespół objawów neurologicznych. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w Ośrodku Doświadczalnym



Neurologii Porównawczej CMDiK PAN w Mińsku Mazowieckim. Materiał porównawczy stanowiły króliki zdrowe w tym samym wieku. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację. Z mózgow wyjętych z jamy czaszkowej preparowano płaty mózgowe, mózdzek oraz pień mózgu. Do jednego doświadczenia pobierano mózgowie 4—6 zwierząt. Preparatykę prowadzono w temperaturze 0—4°C. Wszystkie używane roztwory zawierały w swoim składzie 0,1 mM PMSF, w celu zahamowania aktywności enzymów proteolitycznych.

Jądra komórek trzech wyizolowanych obszarów mózgu, zarówno królików pt, jak i kontrolnych, otrzymywano z homogenatów tkankowych. Tkanki homogenizowano wstępnie w 0,25 M sacharozie w 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 z dodatkiem 4 mM MgCl<sub>2</sub>, sączono przez gazę i wirowano 3000 × g przez 10 minut. Z otrzymanego osadu izolowano jądra komórkowe przez homogenizację w roztworze 2,0 M sacharozy, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 mM MgCl<sub>2</sub> i wirowanie przy 32 000 obr./min w ciągu 45 minut w ultrawirówce MSE.

Chromatynę jądrową otrzymywano według metody Spelsberga i Hnily (1971), po uprzednim przemyciu jąder komórkowych w roztworze 0,33 M sacharozy, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% Triton X-100. Postępowanie to miało na celu uniknięcie ewentualnego zanieczyszczenia białek chromatyny białkami pochodzącymi z błon jądrowych. Jądra komórkowe homogenizowano trzykrotnie w 0,08 M NaCl, 0,02 M EDTA pH 6,3 i wirowano przy 4000 obr./min przez 10 minut.

Z chromatyny uzyskanej z każdego z trzech obszarów mózgu królików kontrolnych i królików pt przeprowadzono ekstrakcję białek rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl, pH 7,0, zgodnie z metodą opisaną przez Goodwina i wsp. (1973). nierozpuszczalną chromatynę uwadniano w roztworze 1/100 SSC i pozostawiano w temperaturze -20°C lub izolowano z niej bezpośrednio pozostałe białka niehistonowe. Białka niehistonowe luźno związane z chromatyną ekstrahowane 0,35 M NaCl precypitowano TCA do stężenia 2% i otrzymywano frakcję LMG (low mobility group) oraz frakcję HMG (high mobility group), rozpuszczalną w 2% TCA. Białka niehistonowe silnie związane z chromatyną izolowano z chromatyny z poszczególnych obszarów mózgu metodą opisaną przez Gronowa i Griffithsa (1971). Chromatynę jądrową zawieszano dwukrotnie w roztworze zawierającym 8,0 M mocznik w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7,6. Zawiesinę homogenizowano, pozostawiano na 30 minut w temperaturze +10°C, a następnie wirowano 25 000 × g przez 30 minut w temperaturze 4°C. Połączone supernatanty zawierały białka niehistonowe silnie związane z chromatyną. Roztwory białek zagęszczano za pomocą Sephadex-G 200. Z nierozpuszczalnego materiału, pozostałego po ekstrakcji białek niehistonowych, eluowano histony za pomocą 0,4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pozostały osad zawieszano w buforze 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0 z 1% SDS, ekstrahowano w temperaturze 37°C przez 12 godzin (Tsitilou i wsp. 1979) i wirowano 5000 × g przez 20 minut. Supernatant zawierał białka tzw. „resztkowe”.



Uzyskane frakcje białek niehistonowych analizowano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym z SDS według Laemmli (1971) w rurkach i na płytkach lub zgodnie z Bhorjee i Pedersonem (1973) w 7,5% żelu z 0,1% SDS w buforze fosforanowym, pH 7,0. W celu oznaczenia mas cząsteczkowych białek używano wzorców firmy Pharmacia: rybonukleaza (m.cz. 13 700), chymotrypsynogen (m.cz. 25 000), owoalbumina (m.cz. 43 000), albumina (m.cz. 67 000), aldolaza (m.cz. 158 000). Stężenie białka oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951). W roztworach zawierających duże stężenia soli, mocznika i SDS białka oznaczano metodą turbidymetryczną. Stężenie DNA w chromatynie oznaczano spektrofotometrycznie przy 260 nm w roztworze 5 M mocznika.

## WYNIKI

Do badań wykorzystano całe mózgi królików pt i zdrowych oraz wydzielone struktury anatomiczne: płaty mózgowie (kora z obszarem podkorowym), mózdzek i pień mózgu. Stanowiły one odpowiednio  $59 \pm 5\%$ ,  $16 \pm 2\%$  i  $25 \pm 4\%$  masy całych mózgów.

Zawartość DNA oraz poszczególnych frakcji białek jądrowych uzyskanych z jąder komórkowych całych mózgów królików pt i zdrowych nie różnią się w sposób istotny (tab. 1). Nie stwierdzono także istotnych

*Tabela 1.* Zawartość DNA i białek w jądrach komórek mózgowych (mg/100 g tkanki mózgowej)

*Table 1.* Content of DNA and proteins in nuclei of cerebral cells (mg /100 g brain tissue)

	Króliki kontrolne Control rabbits	Króliki pt pt rabbits
DNA	87,6	88,1
Białko całkowite Total protein	420,8	417,5
Białka rozp. w 0,08 M NaCl, 0,02 M EDTA Proteins soluble in 0.08 M NaCl, 0,02 M EDTA	132,6	134,0
Białka rozp. w 0,35 M NaCl Proteins soluble in 0.35 M NaCl	61,2	60,8
Białka niehistonowe silnie związane z chromatyną Nonhistone proteins tightly chromatine-bound	57,1	55,8
Histony Histones	65,8	64,1
Białka „reszkowe” “Residue” proteins	20,8	22,3

Wyniki podano na podstawie 3—5 oznaczeń  
Results are given on the basis of 3—5 estimations



różnic pomiędzy zawartością chromatyny w takich samych obszarach mózgu królików pt i zdrowych (tab. 2).

Wykazano natomiast wyraźne różnice w stosunkach białek niehistonowych do DNA w poszczególnych obszarach mózgu. Najwyższy stosunek białek niehistonowych do DNA występował w chromatynie otrzymanej z płatów mózgowych (2,85 u królików kontrolnych), a najniższy w mózdzku (2,10 u królików kontrolnych). Różnice te wynikają głównie z niejednakowej zawartości białek niehistonowych luźno związanych z chromatyną.

*Tabela 2.* Białka chromatyny różnych obszarów mózgów królików kontrolnych i królików pt (mg/mg DNA)

*Table 2.* Chromatine proteins in different brain regions in control and pt rabbits (mg/mg DNA)

		Płaty mózgowe Brain hemispheres	Mózdzek Cerebellum	Pień Brainstem
Białko całk. Total protein	kontrola control	2,85±0,35	2,10±0,31	2,45±0,25
	pt	2,93±0,31	2,19±0,24	2,50±0,34
Białka rozp. 0,35 M NaCl Proteins soluble in 0.35 M NaCl	kontrola control	0,61±0,10	0,35±0,08	0,50±0,10
	pt	0,63±0,09	0,32±0,05	0,53±0,08
Białka silnie związane z chromatyną Proteins tightly chroma- tine-bound	kontrola	0,60±0,10	0,51±0,98	0,56±0,10
	control			
	pt	0,58±0,08	0,51±0,12	0,58±0,12
Histony Histones	kontrola control	0,68±0,12	0,72±0,15	0,73±0,15
	pt	0,70±0,15	0,70±0,12	0,75±0,10
Białka „reszkowe” „Residue” proteins	kontrola control	0,25±0,12	0,22±0,10	0,22±0,09
	pt	0,26±0,08	0,23±0,14	0,24±0,12

Wyniki podano jako średnie arytmetyczne z 3—5 oznaczeń oraz odchylenie standardowe

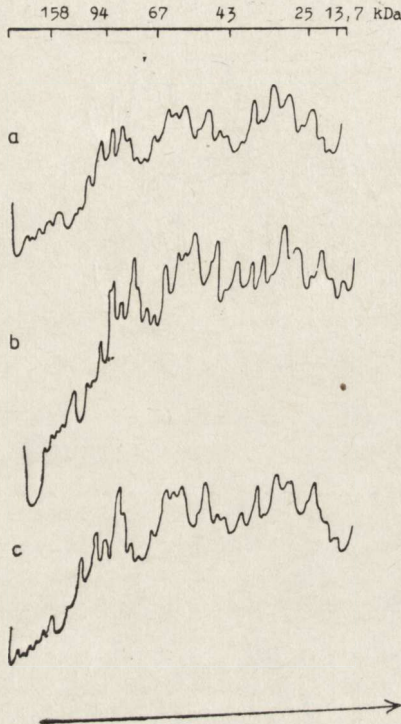
Results are means from 3—5 estimations ± standard deviations.

Zawartość białek niehistonowych silnie związanych z chromatyną różni się bardzo nieznacznie w badanych obszarach mózgu. Najwyższą zawartość białek niehistonowych rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl stwierdzono w płatach mózgowych — 0,61 mg/1 mg DNA, najniższą w mózdzku — 0,35 mg/1 mg DNA. Stężenie histonów i białek reszkowych w chromatynie trzech badanych obszarów mózgu nie różni się w sposób istotny.

Białka luźno związane z chromatyną (frakcja LMG) poddawano elektrofrezie w żelu poliakrylamidowym z SDS. W trakcie elektrofrezы według Laemmli (1971) rozdzielały się one na 32 pasma o różnej intensywności.



ności (kilka frakcji białkowych pozostaje zamaskowanych pomiędzy pasmami o dużej intensywności). Masy cząsteczkowe białek LGM pozostawały w granicach 11 000—165 000. Obrazy elektroforetyczne tych białek, otrzymanych z chromatyny trzech obszarów mózgu, zarówno królików kontrolnych, jak i pt, różnią się nieznacznie; są to głównie różnice ilościowe w zawartości frakcji białkowych (ryc. 1).



Ryc. 1. Wykresy densytometryczne elektroforegramów białek LMG (elektroforeza wg Laemmli 1971) z różnych obszarów mózgu królików kontrolnych: a — płaty mózgowe, b — mózdzek, c — pień mózgu

Fig. 1. Densitometric scans of LMG proteins electrophoregrams (electrophoresis according to Laemmli 1971) from different brain regions of control rabbits: a — cerebral hemispheres, b — cerebellum, c — brain stem

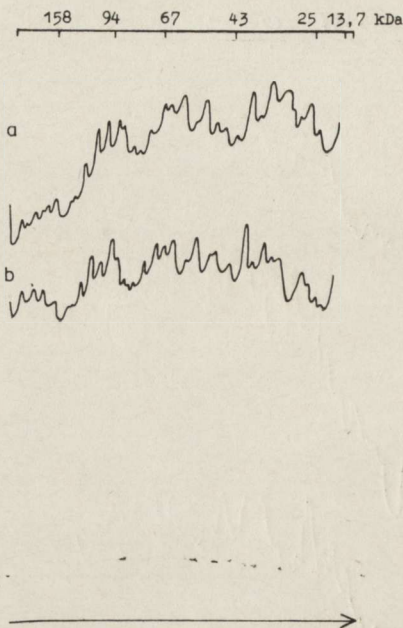
Porównanie densytogramów z rozdziałów elektroforetycznych białek LMG mózgow królików kontrolnych i królików pt ilustrują kolejne wykresy: z płatów mózgowych — rycina 2 i z pnia mózgu — rycina 3. Nieco większe różnice widoczne są w obrazie elektroforetycznym białek LMG otrzymanych z chromatyny mózdzków. Białka LMG z mózdzków królików pt zawierają dodatkową frakcję o m.c. około 80 000 oraz wykazują inny profil rozdziału białek o m.c. 110 000—95 000 w porównaniu z kontrolą (ryc. 4).

Białka niehistonowe ekstrahowane z chromatyny jąder komórek mózgu mocznikiem dawały zbliżony, ale nie identyczny obraz elektrofore-



tyczny, zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym, z frakcjami LMG (ryc. 5).

Białka niehistonowe silnie związane z chromatyną rozdzielały się w trakcie elektroforezy na 26 pasm o różnej intensywności. W obrazie elektroforetycznym stwierdzono tylko nieznaczne różnice ilościowe tych białek pochodzących z różnych obszarów mózgu królików zdrowych. Po-



Ryc. 2. Wykresy densytometryczne elektroforegramów białek LMG (elektroforeza wg Laemmli 1971) z płatów mózgowych: a — króliki kontrolne, b — króliki pt  
 Fig. 2. Densitometric scans of LMG proteins electrophoregrams (electrophoresis according to Laemmli 1971) from cerebral hemispheres: a — control rabbits, b — pt rabbits

równawcza analiza białek niehistonowych silnie związanych z chromatyną, otrzymanych z mózdków królików kontrolnych i pt, wykazała istnienie różnic w ich obrazie elektroforetycznym (ryc. 6). Białka niehistonowe z mózgow królików pt charakteryzuje obecność dodatkowej frakcji o m.cz. 56 000 oraz znacznie wyższa zawartość frakcji białkowych o m.cz. 44 000, 115 000 i 140 000; w porównaniu z kontrolą.

#### OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania pozwoliły na porównanie białek niehistonowych w różnych obszarach anatomicznych mózgu, wykazały również, że genetycznie uwarunkowane schorzenie prowadzące do uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego ma wpływ na skład białek niehistonowych mózgu. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w zawartości DNA i w ilości poszczególnych frakcji białkowych w jądrach komórek mózgu pomiędzy mutantem pt oraz królikiem kontrolnym.



Porównanie składu chromatyny otrzymanej z trzech badanych obszarów mózgu królików pt i kontrolnych wykazało, że najwyższą zawartością białek niehistonowych w stosunku do DNA charakteryzuje się chromatyna płatów mózgowych, najniższą chromatyna mózdzku. Różnice te są spowodowane znacznie wyższą zawartością białek niehistonowych rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl w płatach mózgowych, w porównaniu z in-



Ryc. 3. Wykresy densytometryczne elektroforegramów białek LMG (elektroforeza wg Laemmli 1971) z pnia mózgu: a — króliki kontrolne, b — króliki pt

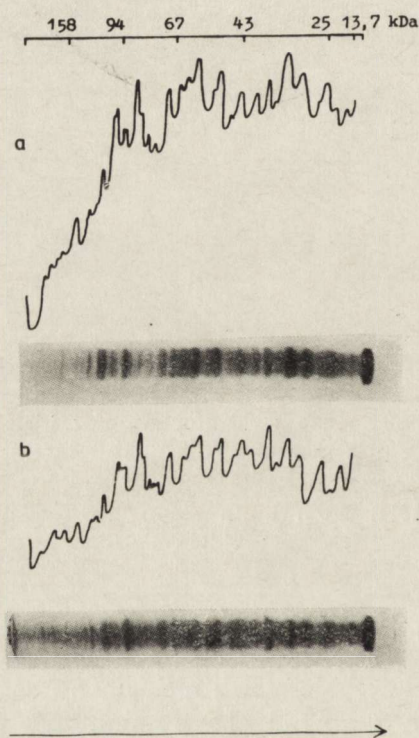
Fig. 3. Densitometric scans of LMG proteins electrophoregrams (electrophoresis according to Laemmli 1971) from brain stem: a — control rabbits, b — pt rabbits

nymi badanymi strukturami mózgowia, co prawdopodobnie jest związane ze znacznie wyższą aktywnością metaboliczną kory mózgowej (Mc Ewen i wsp. 1972). Wyższą zawartość białek niehistonowych w korze mózgowej szczura w porównaniu z innymi obszarami mózgu stwierdzili Fujitani i Holoubek (1974), przy czym dotyczyło to białek luźno związanych z chromatyną. Wykazano także wyższą aktywność metaboliczną białek chromatyny rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl (Umansky i wsp. 1976), ich stymulujący wpływ na procesy transkrypcji (Kostraba i wsp. 1975) oraz zmiany w składzie ilościowym i jakościowym w czasie rozwoju i różnicowania (Heizman i wsp. 1980; Bojanovic i wsp. 1981).

Skład ilościowy i jakościowy białek niehistonowych mózgu był przedmiotem wielu badań. Zastosowanie metod elektroforetycznych pozwoliło na wykazanie ich homologii, jak również różnic gatunkowych i tkankowych. Liczba i natężenie prążków oraz plam uzyskanych w trakcie elektroforezy białek niehistonowych jest różna w pracach poszczególnych



autorów, co wynika zarówno z metod stosowanych do izolowania białek, jak i siły rozdzielającej układu elektroforetycznego. Za pomocą metod elektroforetycznych wykazano ograniczoną swoistość białek niehistonowych w różnych obszarach mózgu oraz swoistość związaną z rodzajem komórek (Fujitani, Holoubek 1974; Choie i wsp. 1977; OH'Hara i wsp. 1977; Tsitilou i wsp. 1979; Heizman i wsp. 1980). Fleischer-Lambrapoulos i Pollow (1978), w bardzo precyzyjnych badaniach polegających na rozdzieleniu białek niehistonowych izolowanych z komórek nerwowych i glijowych na mikrokapilarach oraz preparatywnym izoogniskowaniu, otrzymali 1200 frakcji białkowych i wykazali ich wyraźną swoistość komórkową.



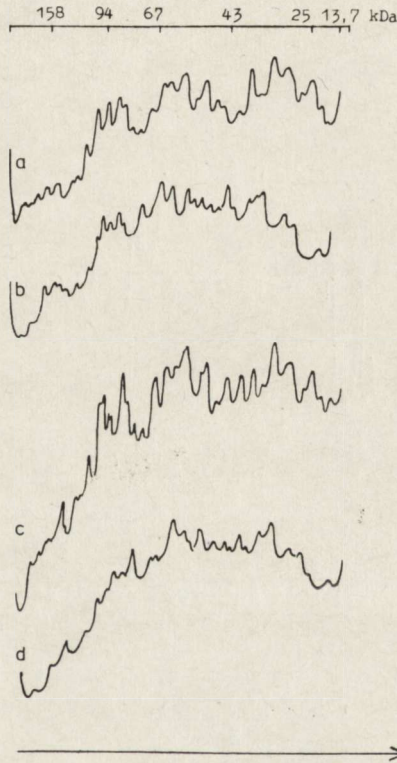
Ryc. 4. Wykresy densytometryczne i zdjęcia elektroforegramów białek LMG (elektroforeza wg Laemmli 1971) z mózdków: a — króliki kontrolne, b — króliki pt  
 Fig. 4. Densitometric scans and photographs of LMG proteins electrophoretograms (electrophoresis according to Laemmli 1971) from cerebellum: a — control rabbits, b — pt rabbits

Przeprowadzone przez nas porównanie białek niehistonowych z różnych obszarów mózgu królików wykazało nieznaczne różnice w ich składzie, głównie ilościowe. Analiza odpowiadających sobie frakcji białek nie-



histonowych z mózgow królików zdrowych i mutantów pt wykazała istnienie pewnych różnic w ich składzie ilościowym i jakościowym, zwłaszcza w białkach wypreparowanych z mózdków. Wśród białek LGM królików pt obserwuje się dodatkową frakcję o m.cz. około 80 000 oraz różnice w rozdziale frakcji m.cz. 110 000—95 000. W białkach niehistonowych ekstrahowanych mocznikiem z mózdku królików pt stwierdzono obecność dodatkowego pasma o m.cz. 56 000 oraz znacznie intensywniejsze w porównaniu z kontrolą pasma białek o m.cz. 140 000, 115 000 i 44 000.

Niewielkie, trudne do uchwycenia różnice w składzie białek niehistonowych mogą być spowodowane faktem, że przeważająca ich część spełnia w komórkach podobne funkcje enzymatyczne i strukturalne oraz ma

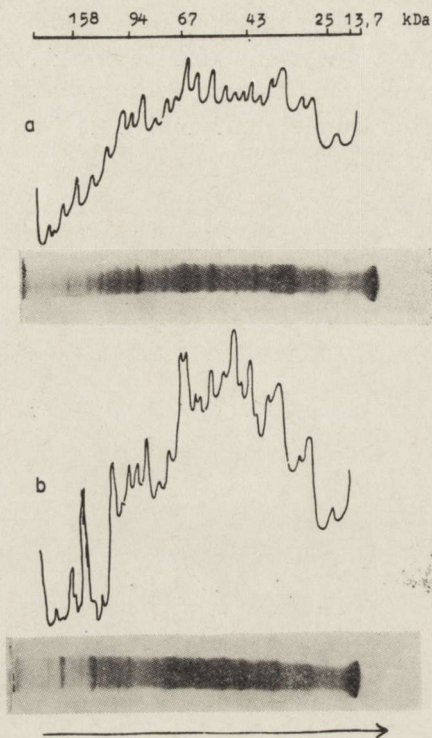


Ryc. 5. Wykresy densytometryczne elektroforegramów białek LMG i białek silnie związanych z chromatyną (elektroforeza wg Laemmli 1971) z mózgow królików kontrolnych: a — białka LMG z płatów mózgowych, b — białka silnie związane z chromatyną z płatów mózgowych, c — białka LMG z mózdku, d — białka silnie związane z chromatyną z mózdku

Fig. 5. Densitometric scans of LMG proteins and proteins tightly chromatin-bound (electrophoresis according to Laemmli 1971) in brains of control rabbits: a — LMG proteins from cerebral hemispheres, b — proteins tightly chromatin-bound from cerebral hemispheres, c — LMG proteins from cerebellum, d — proteins tightly chromatin-bound from cerebellum



podobną lokalizację w chromatynie, a tylko nieznaczna ilość wykazuje ścisłą swoistość i może pełnić funkcje regulacyjne. Obserwowane różnice w składzie białek niehistonowych w mózгах królików zdrowych i królików pt — mutantów neurologicznych, mogą być wyrazem zaburzeń metabolizmu w ośrodkowym układzie nerwowym.



Ryc. 6. Wykresy densytometryczne i zdjęcia elektroforegramów białek niehistonowych silnie związanych z chromatyną (elektroforeza wg Laemmli 1971) z mózdków: a — króliki kontrolne, b — króliki pt

Fig. 6. Densitometric scans and photographs of nonhistone tightly chromatine-bound proteins (electrophoresis according to Laemmli 1971) from cerebellum: a — control rabbits, b — pt rabbits

#### NONHISTONE NUCLEAR PROTEINS FROM DIFFERENT REGIONS OF HEALTHY AND PT RABBIT'S BRAIN

##### Summary

The nonhistone chromosomal proteins from three different anatomical brain regions of the pt rabbit mutant were compared with those from control rabbit. The amount of the nonhistone chromosomal proteins is characteristic of each studied brain region and similar in the brains of pt and control rabbits. Two fractions of the nonhistone chromosomal proteins: LMG and tightly bound were



analysed by SDS electrophoresis. Some quantitative and qualitative differences were found to exist between nonhistone proteins obtained from the cerebellum of the pt rabbits and from the cerebellum of the control group.

## НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ ХРОМАТИНА ИЗ РАЗНЫХ РАЙОНОВ МОЗГА КРОЛИКА РТ И ЗДОРОВОГО

### Резюме

Проведено сравнение негистоновых белков выделенных из хроматина анатомически разных областей мозга кроликов—мутантов с наследственным дрожательным параличом (pt) и контрольных животных. Концентрация негистоновых белков не различалась в мозгах кроликов pt и контрольных и была выше в полушариях головного мозга, чем в мозжечке. С помощью электрофореза в полиакриламидном желе было показано наличие компонентов прочно и непрочно связанных негистоновых белков, различающихся в мозгах кролика pt и контрольных животных.

### PIŚMIENICTWO

1. Adolph K. W., Phelps J. G.: Role of non-histone in chromosome structure. Cell cycle variations in protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 9086—9092.
2. Bhorjee J. S., Pedreson T.: Chromatin: its isolation from cultured mammalian cells with particular reference to contamination by nuclear ribonucleoprotein particles. *Biochemistry*, 1973, 12, 2766—2773.
3. Bojanovic J. J., Drazic A. M., Vujivic R.: Non-histone nuclear proteins in active and involuted rat thymus. *Biochemie*, 1981, 63, 791—794.
4. Choie D. D., Friedberg M. C., Vanden Berg S. R., Herman M. N.: Non-histone chromosomal proteins in mouse brain at different stages of development and in transplantable mouse teratoma. *J. Neurochem.*, 1977, 29, 811—817.
5. Elgin S. C. R., Weintraub H.: Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, 44, 725—774.
6. Fleischer-Lambropoulos H., Pollow K.: Comparison of nonhistone chromosomal proteins from neuronal and glial chromatin by isoelectric focussing and microdisc electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 80, 773—780.
7. Fujitani H., Holoubek V.: Nonhistone nuclear proteins of rat brain. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 1215—1224.
8. Goodwin G. H., Sanders C., Johns E. W.: A new group of chromatin associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.*, 1973, 38, 14—19.
9. Gronow M., Griffiths G.: Rapid isolation and separation of the nonhistone proteins of rat liver nuclei. *FEBS Lett.*, 1971, 15, 340—344.
10. Heizman C. W., Arnold E. M., Kuenzle C. C.: Fluctuations of non-histone chromosomal proteins in differentiating brain cortex and cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 11 504—11 512.
11. Hnilica L. S., Chiu J. F., Hardy K., Fujitani H.: Chromosomal proteins in differentiation. W: Cell differentiation and neoplasia. Red. J. F. Sanders, Raven Press, New York, 1978, 325—346.
12. Kleinsmith L. J.: Phosphorylation of nonhistone proteins. W: The cell nucleus. Red. H. Busch, vol. 6, Acad. Press, New York, 1978, 221—261.



13. Kostraba N. C., Montagna R. A., Wang T. Y.: Study of the loosely bound non-histone chromatin proteins. Stimulation of deoxyribonucleic acid-templated ribonucleic acid synthesis by a specific deoxyribonucleic acid, binding phosphoprotein fraction. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 1548—1555.
14. Laemli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 1971, 227, 680—685.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
16. Mc Ewen B. S., Plapinger L., Wallach G., Magnus C.: Properties of cell nuclei isolated from various regions of rat brain: divergent characteristic of cerebellar cell nuclei. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 1159—1165.
17. OH'Hara Y., Yanagihara T.: Nuclear chromatin proteins from rabbit cerebrum, cerebellum and liver: synthesis and phosphorylation. *J. Neurochem.*, 1977, 1065—1073.
18. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 135—149.
19. Paul J. S., Gilmour R. S.: Organ specific restriction of transcription in mammalian chromatin. *J. Mol. Biol.*, 1968, 34, 305—316.
20. Spelsberg T. C., Hnilica L. S.: Protein of chromatin in template restriction. III. The macromolecules in specific restriction of the chromatin DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 228, 202—211.
21. Stein G. S., Stein J. L., Thomson J. A.: Chromosomal proteins in transformed and neoplastic cells. A review. *Cancer Res.*, 1978, 39, 1181—1201.
22. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt w oparciu o badania mikroskopowo-elektronowe rdzenia kręgowego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327—342.
23. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441—459.
24. Tsitilou S. G., Cox D., Mathias A. P., Ridge D.: The characterization of the non-histone chromosomal proteins of the main classes of nuclei from rabbit brain fractionated by zonal centrifugation. *Biochem. J.*, 1979, 177, 331—346.
25. Umansky S. R., Zotova N. N., Kovalev Y. J.: Comparison of some properties of chromatin nonhistone proteins and nuclear sap. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 65, 505—512.
26. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

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



MICHAŁ KRASZPULSKI, TERESA WRZOŁKOWA

BLOOD-BRAIN EXCHANGE IN VARIOUS REGIONS  
OF THE LIMBIC SYSTEM. MORPHOMETRIC STUDIES\*

Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, Gdańsk

The terminal vessels of the central nervous system have for many years been the subject of studies carried out in our Laboratory (Łukaszyk et al. 1984; Wrzołkowska et al. 1984; Kraszpulski et al. 1985; Łukaszyk 1985; Kraszpulski, Wrzołkowska 1986; Wrzołkowska, Łukaszyk 1987). Our previous morphometric studies carried out in the light microscope on healthy, adult individuals, have shown a difference in the vascularization density in the motor, limbic and visual cortex of the cat and rat (Wrzołkowska et al. 1984) and in particular nuclei of the cat amygdaloid body (Kraszpulski et al. 1985). We have also ascertained differences in the vascularization density in various areas of the cat limbic system (amygdaloid body —  $190 \pm 45$  and limbic cortex from the region of the sulcus cruciatus —  $241 \pm 47$  vessels per  $\text{mm}^2$ ). We suggested that these results may be dependent on the differences in the phylogenesis of the investigated areas.

In order to verify the above hypothesis, in the present paper, the vascularization density in old and new cortex (archi- and neocortex) are compared. Specimens obtained from three regions of the limbic system: hippocampus (archicortex), the region of sulcus cruciatus and the gyrus cinguli (neocortex) were studied. The following morphological patterns of blood-brain exchange were studied: the number of capillary vessels per  $1 \text{ mm}^2$ , the ratio of the circumferences of these vessels and their cross-sectional area to the tissue area, and the mean cross-sectional area of a single terminal vessel.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on 272 specimens obtained from 11 healthy, adult cats. From each individual 5—60 specimens were examined. Thirty specimens from the hippocampus represented the archi-

\* Supported by Polish Academy of Sciences, Grant No 06.02.II.1.5.



cortex, 88 specimens from gyrus cinguli and 154 from sulcus cruciatus represented the neocortex.

The location of the chosen area, preparation of specimens and semi-automatic data collection were carried out according to the method described in the previous paper (Kraszpulski et al. 1985). The results obtained were analysed by one-way ANOVA followed by multiple comparison procedure (Tukey) with a significance level  $\alpha = 0.05$  (Johnson, Leone 1977).

## RESULTS

The number of terminal vessels per 1 mm<sup>2</sup> of tissue in the examined specimens from different regions of the limbic system varied between 123 and 385. The mean values for particular regions were: hippocampus —  $168 \pm 31$ , sulcus cruciatus —  $255 \pm 48$  and gyrus cinguli —  $279 \pm 48$  (Fig. 1). Statistically significant differences in the vascularization density were found among all examined regions.

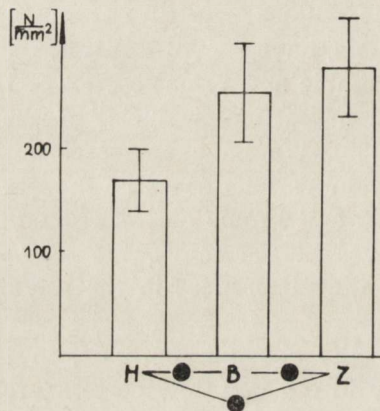


Fig. 1. Vascularization density in the various regions of the limbic system. H — hippocampus, B — sulcus cruciatus, Z — gyrus cinguli, —●— statistically significant differences according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ )

Ryc. 1. Gęstość unaczynienia terminalnego w różnych okolicach układu limbicznego. H — hipokamp, B — bruzda krzyżowa, Z — zakręt obręczy, —●— statystycznie istotna różnica w teście Tukeya ( $\alpha = 0,05$ )

The ratio of terminal vessel circumferences to tissue cross-sectional area, representing in two-dimensional specimens the area of exchange between blood and the tissue surrounding the vessels, ranged in the examined specimens from  $3.76 \times 10^{-3}$  to  $14.75 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ . The mean values for the examined regions of the limbic system were: hippocampus —  $6.06 \times 10^{-3} \pm 1.37 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ , sulcus cruciatus —  $9.21 \times 10^{-3} \pm 1.89 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ , gyrus cinguli —  $9.75 \times 10^{-3} \pm 1.54 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$  (Fig. 2). Statistically significant differences were found between



the hippocampus and the sulcus cruciatus and between the hippocampus and the gyrus cinguli, whereas comparison of the sulcus cruciatus with the gyrus cinguli did not reveal any significant differences.

The ratio of terminal vessel area to tissue cross-sectional area ranged from  $6.49 \times 10^{-3}$  to  $36.09 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . The mean values for the examined regions of the limbic system were: hippocampus —  $13.07 \times 10^{-3} \pm$

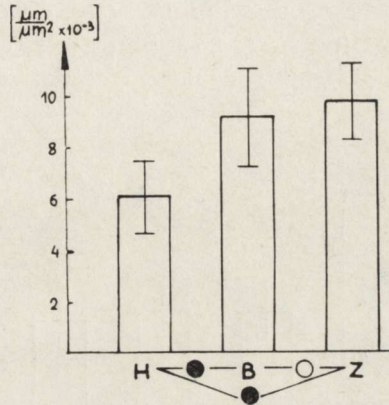


Fig. 2. Ratio of circumference of vessels to tissue area in the various regions of the limbic system. H — hippocampus, B — sulcus cruciatus, Z — gyrus cinguli, -o- statistically significant differences according to Tukey's test, -●- statistically insignificant differences according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ )

Ryc. 2. Stosunek obwodów naczyń terminalnych do powierzchni tkanki w różnych okolicach układu limbicznego. H — hipokamp, B — bruzda krzyżowa, Z — zakręt obręczy, -o- statystycznie istotna różnica w teście Tukeya, -●- statystycznie nieistotna różnica w teście Tukeya ( $\alpha = 0,05$ )

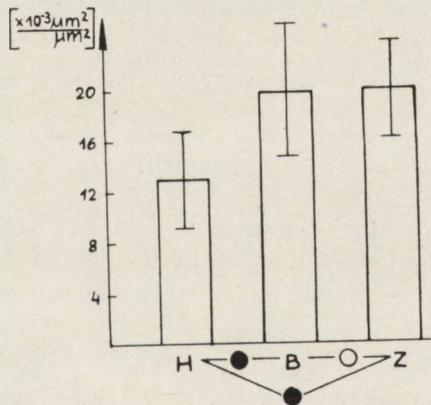


Fig. 3. Ratio of vessel area to tissue area in the various regions of the limbic system. H — hippocampus, B — sulcus cruciatus, Z — gyrus cinguli, -●- statistically significant differences according to Tukey's test, -o- statistically insignificant differences according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ )

Ryc. 3. Stosunek powierzchni naczyń terminalnych do powierzchni tkanki w różnych okolicach układu limbicznego. H — hipokamp, B — bruzda krzyżowa, Z — zakręt obręczy, -●- statystycznie istotna różnica w teście Tukeya, -o- statystycznie nieistotna różnica w teście Tukeya ( $\alpha = 0,05$ )



$\pm 3.79 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ , sulcus cruciatus —  $19.78 \times 10^{-3} \pm 5.43 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ , gyrus cinguli —  $20.03 \times 10^{-3} \pm 3.71 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$  (Fig. 3). Statistically significant differences were found between the hippocampus and the sulcus cruciatus and between the hippocampus and the gyrus cinguli. Comparison of the sulcus cruciatus with the gyrus cinguli did not reveal any significant differences.

The mean values of the cross-sectional area of a single terminal vessel in the examined regions of the limbic system were: hippocampus —  $77 \pm 14 \mu\text{m}^2$ , sulcus cruciatus —  $78 \pm 19 \mu\text{m}^2$ , gyrus cinguli —  $73 \pm 12 \mu\text{m}^2$  (Fig. 4). These values did not reveal any statistically significant differences between particular regions.

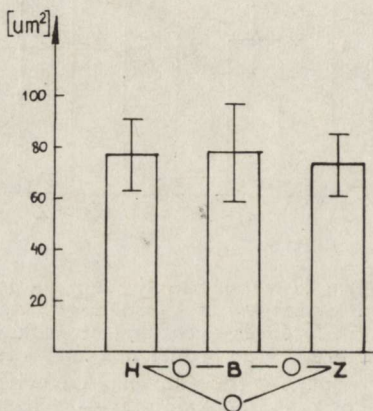


Fig. 4. Mean area of a single terminal vessel in the various regions of the limbic system, H — hippocampus, B — sulcus cruciatus, Z — gyrus cinguli, -o- statistically insignificant differences according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ )

Ryc. 4. Średnia powierzchnia jednego naczynia terminalnego w różnych okolicach układu limbicznego. H — hipokamp, B — bruzda krzyżowa, Z — zakręt obręczy, -o- statystycznie nieistotna różnica w teście Tukeya ( $\alpha = 0,05$ )

## DISCUSSION

The above results of the morphometric evaluation of the terminal vessel system enable us to find statistically significant differences in respect to the three examined parameters among the examined regions of the limbic system.

The hippocampus belonging to the archicortex differs distinctly from the examined regions of the neocortex (sulcus cruciatus and gyrus cinguli) showing less vascularization density, a lower area of blood-brain exchange and a lower area of blood flow for a brain area unit. A significant difference between the sulcus cruciatus and the gyrus cinguli refers only to the vascularization density, the values of other parameters remaining the same.

The mean cross-sectional area of a single terminal vessel in the spe-



cimen was identical in all examined regions of the limbic system. Assuming a random section angle of particular vessels, it means that the capillary vessels were similar in size both in the hippocampus and in the examined areas of the neocortex.

The differences showed in terminal vessels of both the hippocampus (archicortex) and the previously examined (Kraszpulski et al. 1985) amygdaloid body (paleocortex), in comparison with the sulcus cruciatus and the gyrus cinguli belonging to the neocortex, seem to confirm our previous suppositions as to the connection between these differences and the phylogenetic development of the brain.

The terminal vascularization could thus be another morphological feature differentiating the allo- and isocortex regions. However, the different vascularization density in the sulcus cruciatus and the gyrus cinguli as well as differences existing in the vascularization of particular nuclei of the amygdaloid body (Kraszpulski et al. 1985) signal the possible existence of other sources of this variation.

The literature data also point to differences in vascularization of the brain connected with the ontogeny level (Bär 1978; Meier-Ruge et al. 1980; Bell, Ball 1981) or with damages caused experimentally — protein deficiency in the first days after birth (Conradi et al. 1979), thyroid gland indisposition (Eayrs 1954) or brain ischemia (Imddahl, Hossmann 1986). These differences in the terminal vascularization of the brain are probably related to various mechanisms governing the organism functions in physiological conditions. Some of these mechanisms may also play a role in the development of terminal vascularization in phylogenetically different brain regions.

It cannot, however, be forgotten that the limbic system examined by us is characterized by a wide functional differentiation (Fonberg 1968; Adamec, Stark-Adamec 1983; Ellis, Kesner 1983; Femano et al. 1983; Lehman, Winans 1983; Caudarella et al. 1984). Thus, the role of the physiological function of the examined region may be the most significant factor connected with the development of the vessel system in these areas.

#### WYMIANA KREW—MÓZG W WYBRANYCH OKOLICACH UKŁADU LIMBICZNEGO. BADANIA MORFOMETRYCZNE

##### Streszczenie

W celu porównania wybranych parametrów unaczynienia terminalnego w różnych filogenetycznie strukturach układu limbicznego zbadano liczbę naczyń włosowatych na 1 mm<sup>2</sup> tkanki, stosunek powierzchni ich przekrojów do powierzchni tkanki, stosunek sumy ich obwodów do powierzchni tkanki oraz średnią powierzchnię jednego naczynia terminalnego w skrawku. Przedmiotem badań były 272 wyćinki z 11 mózgów dorosłych kotów, pochodzące z hipokampa (*archicortex*) oraz bruzdy krzyżowej i zakrętu obręczy (*neocortex*).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że hipokamp (*archicortex*)



zdecydowanie odbiega od badanych okolic *neocortex*, wykazując mniejszą gęstość unaczynienia terminalnego, mniejszy stosunek obwodów naczyń terminalnych do powierzchni tkanki (wykładnik powierzchni wymiany krew—tkanka) i mniejszy stosunek powierzchni tych naczyń do powierzchni tkanki (wykładnik powierzchni przepływu). Między bruzdą krzyżową a zakrętem obręczy statystycznie istotna różnica zachodziła jedynie w gęstości unaczynienia. Wielkość badanych naczyń terminalnych była podobna we wszystkich porównywanych okolicach układu limbicznego mózgu kota.

## ОБМЕН КРОВЬ — МОЗГ В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Резюме

Чтобы сравнить избранные параметры терминального кровоснабжения<sup>1</sup> в филогенетически разных областях лимбической системы, исследовалось количество капилляров в  $1 \text{ mm}^2$  ткани, соотношение площади их поперечного сечения к площади ткани, соотношение суммы их окружности к площади ткани, а также среднюю площадь одного терминального сосуда в срезе. Были исследованы 272 отрезка из 11 мозгов взрослых кошек. Отрезки были взяты из гипокамиальной коры (*archicortex*) а также крестцовой борозды и поясной извилины (*neocortex*). Результаты исследования показали, что *archicortex* четко отличается от исследованных областей *neocortex*, проявляя меньшую густоту терминального кровоснабжения, меньшее отношение окружностей терминальных сосудов к площади ткани (показатель площади обмена кровь — ткань) и меньшее отношение площади этих сосудов к площади ткани (показатель площади протока). Статистически существенная разница между крестцовой бороздой и поясной извилиной касалась только густоты кровоснабжения. Величина исследованных терминальных сосудов была сходная во всех сравниваемых областях лимбической системы мозга кошки.

### REFERENCES

1. Adamec R. E., Stark-Adamec C. I.: Limbic control of aggression in the cat. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.*, 1983, 7, 505—512.
2. Bär T.: Morphometric evaluation of capillaries in different laminae of rat cerebral cortex by automatic image analysis: changes during development and ageing. In: *Pathology of cerebrospinal microcirculation*. Ed. J. Cervós-Navarro, E. Betz, G. Ephardt, R. Ferszt, R. Wüllenweber. Raven Press, New York, 1978, 1—9.
3. Bell M. A., Ball M. J.: Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1981, 53, 299—318.
4. Caudarella M., Destrade C., Cazala P., Gauthier M.: Dissociation of limbic structures by pharmacological effects of diazepam on electrical self-stimulation in the mouse. *Brain Res.*, 1984, 302, 196—200.
5. Conradi N. G., Eins S., Wolff J.-R.: Postnatal vascular growth in the cerebellar cortex of normal and protein-deprived rats. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1979, 47, 131—137.
6. Eayrs J. T.: The vascularity of the cerebral cortex in normal and cretinous rats. *J. Anat.* 1954, 88, 164—173.
7. Ellis M. E., Kesner R. P.: The noradrenergic system of the amygdala and aversive information processing. *Behav. Neurosci.*, 1983, 3, 399—415.



8. Femano P. A., Edinger H. M., Siegel A.: The effects of stimulation of substantia innominata and sensory receiving areas of the forebrain upon the activity of neurons within the amygdala of the anesthetized cat. *Brain Res.*, 1983, 269, 119—132.
9. Fonberg E.: The role of the amygdaloid nucleus in animal behaviour. In: *Brain reflexes*. Ed. E. A. Asratyan. Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1968, 273—281.
10. Imdahl A., Hossmann K.-A.: Morphometric evaluation of post-ischemic capillary perfusion in selectively vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1986, 69, 267—271.
11. Johnson N. L., Leone F. C.: *Statistics and experimental design in engineering and the physical sciences*. J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 1977.
12. Kraszpulski M., Wrzołkowa T.: Morphometric evaluation of brain terminal vessels. *Methodological studies. Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 491—498.
13. Kraszpulski M., Wrzołkowa T., Mierzewski P.: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body. *Morphometric studies. Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 255—263.
14. Lehman M. N., Winans S. S.: Evidence for a ventral non-stria pathway from the amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis in the male golden hamster. *Brain Res.*, 1983, 268, 139—146.
15. Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. III. Terminal vessel ultrastructure in the nuclei of the cat amygdaloid body. *Morphometric studies. Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 265—272.
16. Łukaszyk I., Wrzołkowa T., Cofta T.: Capillary blood vessels of the brain. II. Axon terminals of capillary vessels in different parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 85—96.
17. Meier-Ruge W., Hunziker O., Schulz U., Tobler H.-J., Schweizer A.: Stereological changes in the capillary network and nerve cells of the ageing human brain. *Mech. Ageing Dev.*, 1980, 14, 233—243.
18. Wrzołkowa T., Cofta T., Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularization density in various parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77—83.
19. Wrzołkowa T., Łukaszyk I.: Capillary vessels and pericapillary axon terminals of the subfornical organ. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25 (in press).

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, 1 Dębinki Str., 80-210 Gdańsk-Wrzeszcz.



\*

Od 28 do 30 września 1988 r. odbędzie się w Weronie III Europejski Zjazd Neuropatologiczny.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Professor Niccolò Rizzuto, Division of Neuropathology, Institute of Neurology, Policlinico Borgo Roma, 37134 Verona, Italy.

\*

Od 28 maja do 1 czerwca 1989 r. odbędzie się w Bolonii XIV Międzynarodowe Sympozjum na temat przepływu krwi w mózgu i metabolizmu mózgowego.

Termin nadsyłania zgłoszeń upływa 1 lutego 1988 r., streszczeń -- 1 listopada 1988 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Brain 89: GIBI STUDIO CONGRESSI, Via Marco Besso, 40, 00191 Roma, Italy.

\*

Od 3 do 9 września 1989 r. odbędzie się w Porto (Portugalia) XII Europejski Kongres Patologii.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Secretariat XII European Congress of Pathology, Avenida Dos Aliados, 207, 4000 Porto, Portugal.

\*

Od 18 do 22 października 1989 r. odbędzie się w New Delhi XVIII Międzynarodowy Kongres Padaczkowy.

Termin nadsyłania zgłoszeń i streszczeń prac upływa 31 stycznia 1989 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego:

Prof. M. C. Maheshwari, Secretary General (18th IEC 1989), Department of Neurology, Neuro-Sciences Centre, All India Institute of Medical Sciences Ansari Nagar New Delhi — 110029, India.

*Jerzy Dymecki*



IRENA ŁUKASZYK, TERESA WRZOŁKOWA

## RELATIONS BETWEEN NERVE TERMINALS AND COMPONENTS OF TERMINAL VESSELS OF THE CAT AMYGDALOID BODY\*

Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, Gdańsk

The application of morphometric analysis in the evaluation of terminal vessels in central nervous system has enabled numerous scientists to discover that they have their own characteristic features dependent on the location, age and nutrition, changing in different physiological and pathological conditions (Bär, Wolff 1977; Conradi et al. 1979; Maier-Ruge et al. 1980; Bell, Ball 1981; Imdahl, Hossmann 1986).

The morphometric investigations carried out in our laboratory comprised both terminal vessels and perivascular nerve terminals. We found some ultrastructural features in the examined regions of the cat and rat cerebral cortex, suggesting the possibility of functional relations between perivascular nerve terminals and components of terminal vessel walls (Łukaszyk et al. 1984). We have also found that there are some features differentiating the examined areas of the cortex from one another as has also been confirmed at the light microscope level (Wrzołkowa et al. 1984). Taking for granted that these differences are the reflection of an active differentiation of the examined regions of the brain, we have carried out further investigations on the amygdaloid body consisting of numerous nuclei varying in structure, function, and connections (Koikegami 1963; Fonberg 1968; Juraniec et al. 1974; Narkiewicz et al. 1978; Kevetter, Wilians 1981a, b; Femano et al. 1983).

In our investigations of the amygdaloid body terminal vessels at the light microscope level we distinguished two groups of nuclei: basal-lateral and central-medial-cortical (Kraszpulski et al. 1985). However, morphometric examinations of the ultrastructural components of terminal vessels showed stability of the features examined within the amygdaloid body (Łukaszyk 1985).

Assuming, on the basis of other author's observations and our previous

---

\* Supported by Polish Academy of Sciences, Grant 06-02.II.1.5.



studies (Rennels, Nelson 1975; Swanson et al. 1977; Edvinsson et al. 1979; Łukaszyk et al. 1984) that the terminal vessels in the central nervous system may constitute together with the perivascular nerve terminals an active conjugate unit, we included some of their features in the morphometric analysis.

This required extension of statistical methods. The previously used one-dimensional analysis of variance did not take into account prospective connections between particular examined features defining vessels of nerve terminals. The multivariate analysis of variance (MANOVA) used in this paper is based on joint consideration of all examined features of vessels and perivascular nerve terminals taking into account correlations between them.

The purpose of the present work is the examination of the relations existing between the perivascular nerve terminals and components of terminal vessels and checking if these relations are differentiate between the examined nuclei of the cat amygdaloid body.

#### MATERIAL AND METHODS

The examinations were carried out on the material obtained from 8 adult cats. The subject of the examinations were specimens taken from 5 nuclei of the amygdaloid body (lateral, basal, central, medial and cortical).

The material was obtained and prepared for examination in a standard way (Wrzołkowa et al. 1984; Kraszpułski et al. 1985). The accuracy of the specimens obtained was checked in semi-thin sections stained with toluidine blue.

Ultra-thin sections were examined with JEM 7A electron microscope. 332 sections of terminal vessels and 319 "close" synapses were examined ("close" meaning the nerve terminal separated from the vascular basement membrane by a cell process not wider than 40 nm or adhering immediately to the basement membrane along a small segment). Electronograms of whole terminal vessel sections magnified  $\times 6500$ — $11\,000$  as well as electronograms of "close" axon terminals magnified  $\times 14\,000$ — $20\,000$  were analysed morphometrically by means of an accordingly programmed WANG 2200 VP minicomputer. The quantity and type of the data put into the computer and the activities associated with it were identical to the previously described ones (Łukaszyk 1985). Additionally, information connected with "close" axon terminals was introduced into the computer memory.

The computer outprint contained the following data: whole vessel lumen surface area and vessel walls endothelium and pericyte surface area, vessel circumference, endothelium external circumference, vessel lumen circumference, length of lines of direct and whole adherence of



pericytes to endothelium, area and circumference of synapse, length of lines of adherence of "close" axon terminals to vessel wall, number of "close" synapses contacting other nervous processes, number of axon terminals with spherical, flattened and mixed vesicles and number of synapses containing granular vesicles.

These sections of lines of complete adherence of pericytes in which no basement membrane was seen were taken for lines of direct adherence of pericytes to endothelium (Łukaszyk 1985). The part of the synapse perimeter, which lay at the distance of 40 nm from the vessel wall, was taken as the length of the line of adherence of the axon terminal to the vessel.

Statistical evaluation of the results obtained was carried out by means of a set of programmes in BASIC worked out in our Laboratory. The normality of distribution of the features examined was checked, and in cases when the dissolution deviated from normal, an adequate data transformation (logarithmic, hyperbolic, logit or arcus sinus) was used. The results were tested by means of:

1. Simultaneous comparison procedure (Newman-Keuls' test) after carrying out a one-dimensional and one-agent analysis of variance.

Newman-Keuls procedure allowed for isolation of arithmetic mean groups not differing from one another. The risk of error of the first kind was taken into account for the whole comparison family and not only for particular tests, reducing thus the possibility of a too big falsely positive error in conclusions (Johnson, Leone 1977).

2. A set of procedures based on a MANOVA which (in contradistinction to a one-dimensional analysis) takes into account the combined influence of all features on the phenomenon described by them. The ascertaining of the existence of the differences among the groups examined in reference to the simultaneously considered features was based on the hypothesis of the equality of vectors of mean values in particular groups. Conclusions were based on  $\wedge$ -Wilks' statistics approximated by means of the F-Snedecor distribution.

Apart from the global comparison of 5 groups of results, comparisons of particular pairs of groups were carried out making use of the same algorithm. Additionally, in order to find prospective differences between vectors of mean values in successive pairs of groups, Hotelling's test  $T^2$  was applied. The  $T^2$  statistics is built on the basis of the Mahalanobis  $D^2$  distance. For these pairs of groups, in which significant differences were ascertained, combinations of features having the greatest influence on these differences were chosen.  $\wedge$ -Wilks' statistics was taken for the criterion denoting the discrimination force (Ahrens, Läuter 1979; Bartkowiak 1979).

The significant level accepted in evaluation of the results was  $\alpha = 0.05$ .



## RESULTS

In five examined nuclei of the cat amygdaloid body no differences in the medium size of "close" synapses were found. Both the surface area (Fig. 1) and the circumference of these axon terminals (Fig. 2) did not distinguish the nuclei from one another. The Newman-Keuls test shows in these cases the homogeneity of the group of 5 nuclei.

The length of the adherence section of the axon terminals to the vessel was the next parameter examined (Fig. 3). The simultaneous comparison procedure applied did not reveal any statistically significant dif-

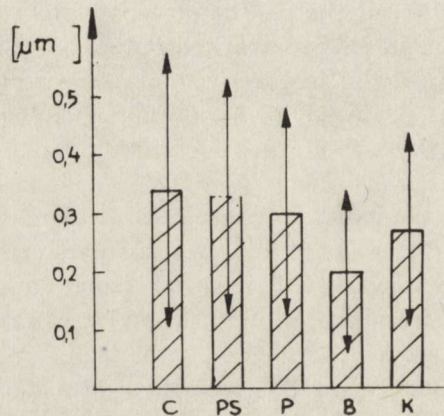


Fig. 1. Mean value of the surface area of axon terminals in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 1. Średnia wartość pola powierzchni kolbek w poszczególnych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe

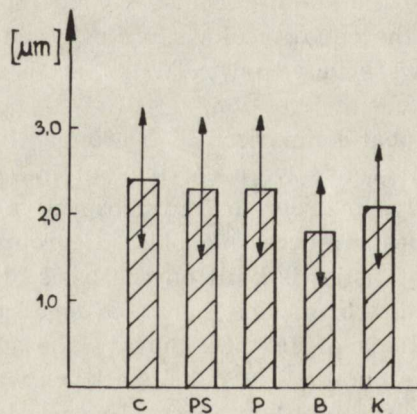


Fig. 2. Mean value of the circumference of axon terminals in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 2. Średnia wartość obwodu kolbek w poszczególnych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe



ferences among the examined nuclei. Synapses in 68% to 87% contained only spherical vesicles (Fig. 4). The remaining axon terminals contained mixed vesicles — spherical and flattened. Also in this case the New-  
man-Keuls test showed the homogeneity of the 5 examined nuclei.

Some of the examined synapses contained additionally singular granular vesicles. The number of synapses with granular vesicles oscillated in the particular nuclei from 10% to 29% (Fig. 5), showing homogeneity within the examined group of 5 nuclei.

A part of the "close" synapses formed contacts with other nerve pro-

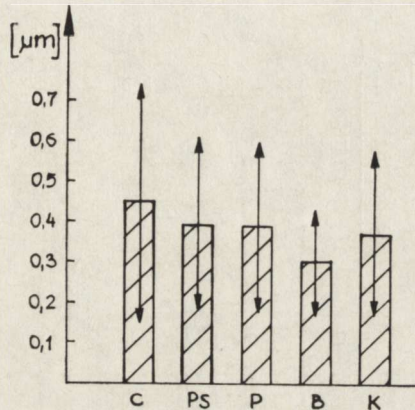


Fig. 3. Mean value of the length of the line of adherence of the synapse to the vessel in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 3. Średnia wartość długości linii przylegania kolbki do naczynia w badanych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe

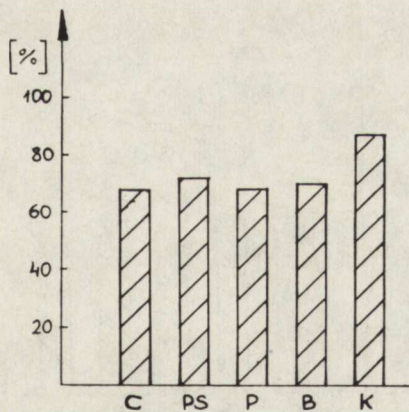


Fig. 4. Fraction of spherical synapses in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 4. Frakcja kolbek kulistych w poszczególnych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe



cesses. The number of these synapses in particular nuclei varied from 22 to 35% (Fig. 6) and did not differentiate the examined nuclei of the amygdaloid body.

The above parameters describing the axon terminals were all tested together by means of multivariate analysis of variance. The surface area of synapses was disregarded as too strongly correlated with their circumference. The multivariate analysis of variance, taking into account the remaining 5 synaptic features showed a lack of statistically significant differences among the examined nuclei (Fig. 7a).

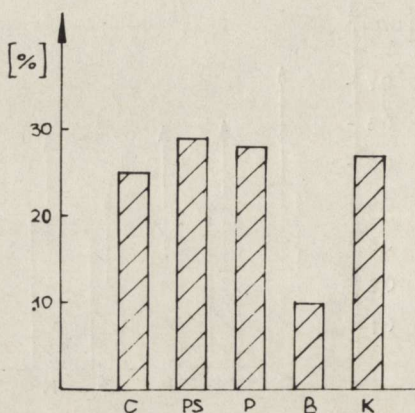


Fig. 5. Fraction of synapses with granular vesicles in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 5. Frakcja kolbek z pęcherzykami ziarnistymi w poszczególnych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe

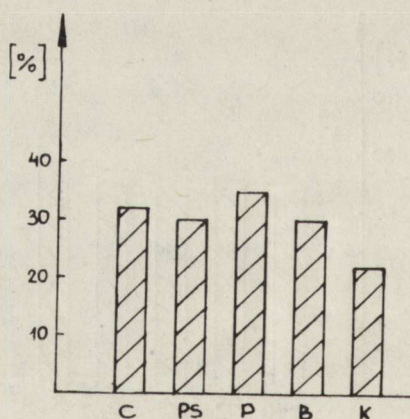


Fig. 6. Fraction of synapses forming the contact in particular nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical

Ryc. 6. Frakcja kolbek tworzących styk w poszczególnych jądrach: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe



Examination of the "close" synapses would not be complete if the terminal vessels, near which the terminals are found, were not considered. The Newman-Keuls test carried out on 10 examined vessel parameters showed, for each of them, homogeneity of groups of 5 nuclei (Łukaszuk 1985).

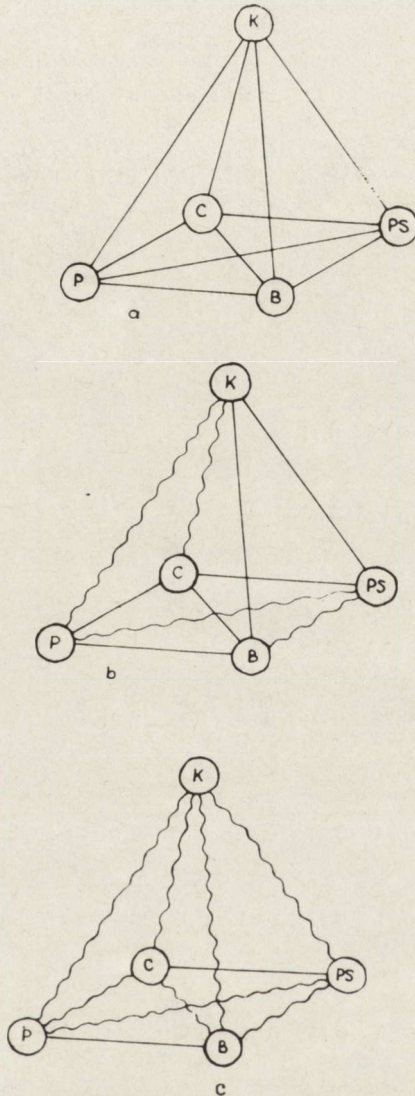


Fig. 7. Results of the multi-variate analysis of variance for the following features: a — synaptical, b — vascular, c — synaptical and vascular. Nuclei: C — central, PS — medial, P — basal, B — lateral, K — cortical, straight line — lack of differences, wavy line — existing difference

Ryc. 7. Wyniki wielowymiarowej analizy wariancji dla cech: a — kolbkowych, b — naczyniowych, c — kolbkowych i naczyniowych. Jądra: C — centralne, PS — przyśrodkowe, P — podstawne, B — boczne, K — korowe, linia prosta — brak różnic, linia falista — istnieje różnica



Multivariate analysis of variance of these parameters was preceded by examination of the coefficients of their mutual correlation (Tab. 1). After rejection of too strongly correlated parameters (correlation coefficient  $\geq 0.7$ ) the endothelium area, the pericyte area, the endothelium circumference, the length of the whole and "close" adherence of pericytes to the endothelium remained the subject of a further analysis. As a result of the statistical procedures applied a significant differences among the

Table 1. Coefficients of the mutual correlations of the examined vascular features

Tabela 1. Współczynniki wzajemnej korelacji badanych cech naczyńowych

Parameters Parametry	AVL PŚW	AE PŚR	AVW PŚC	AP PP	AWV PCN	CVL OŚW	CE OŚR	CWV OCN	LWAP LCPP	LCAP LBPP
*Area of the vessel lumen (AVL)										
*Pole światła naczynia (PŚW)										
Area of endothelium (AE)	0.30									
Pole śródbłonna (PŚR)										
*Area of the vessel wall (AVW)	0.23	0.71								
*Pole ściany naczynia (PŚC)										
Area of pericytes (AP)	0.33	0.06	0.51							
Pole pericytów (PP)										
*Area of the whole vessel (AWV)	0.71	0.55	0.60	0.49						
*Pole całego naczynia (PCN)										
*Circumference of the vessel lumen (CVL)	0.78	0.40	0.29	0.38	0.91					
*Obwód światła naczynia (OŚW)										
Circumference of endothe- lium (CE)	0.73	0.64	0.54	0.33	0.96	0.93				
Obwód śródbłonna (OŚR)										
*Circumference of the whole vessel (CWV)	0.71	0.53	0.63	0.55	0.97	0.89	0.94			
*Obwód całego naczynia (OCN)										
Line of the whole adherence of pericytes (LWAP)	0.30	0.13	0.01	0.53	0.14	0.19	0.10	0.17		
Linia całkowitego przyle- gania pericytów (LCPP)										
Line of the close adherence of pericytes (LCAP)	0.01	0.09	0.03	0.15	0.03	0.03	0.03	0.06	0.23	
Linia bezpośredniego przy- legania pericytów (LBPP)										

\* Rejected correlated parameters

\* Odrzucone skorelowane parametry



examined nuclei in respect to the joint participation of the 5 above mentioned vessel features was ascertained. The best (as regards discrimination force) one-, two- and three-element combinations were chosen out of the set of these features.

From particular features the circumference of the endothelium was found to have the greatest influence on the differentiation. The best 2-element combination is: the circumference of the endothelium and the length of the "close" adherence of pericytes to the endothelium. The best 3-element combination is: the circumference of the endothelium, the length of the "close" adherence of pericytes and the length of the complete adherence of pericytes to the endothelium.

After ascertaining the statistically significant differences between the 5 nuclei, multivariate analysis of variance was applied to compare each pair of nuclei separately. As a result of this comparison (considering the same 5 not correlated vessel features) the lack of the statistically significant differences only between: lateral and medial nuclei, cortical and central nuclei, medial and basal nuclei, basal and cortical nuclei was ascertained (Fig. 7b).

These results show that it is not possible to isolate homogeneous groups of nuclei of the amygdaloid body differing among themselves in respect to the examined vessel features. Inclusion in the multivariate analysis of variance of the, so far separately examined, not correlated, 5 synaptic and 5 vessel features was a further stage of statistical estimation of the results obtained. We analysed: the circumference of the synapse, the length of the line of adherence of the synapse to the vessel, the number of synapses containing spherical vesicles, the number of synapses containing granular vesicles, the number of synapses forming the contact, the endothelium area, the pericyte area, the circumference of the endothelium, the length of the line of whole and "close" adherence of pericytes to the endothelium.

Taking into account the joint influence of the 10 vascular and synaptic features, the statistically significant differences among the 5 examined nuclei was ascertained.

The results of discriminant analysis allowed to distinguish the combination of 1-, 2-, 3- and 4-element features of the greatest discrimination force. The circumference of the endothelium has the greatest influence (from all singular features) on the differences among the nuclei. The best 2-element combination is: the circumference of the endothelium and the length of the line of close adherence of pericytes to the endothelium, 3-element — the circumference of the endothelium, the length of the line of close adherence of pericytes and the length of the line of adherence of the synapse to the vessel, 4-element — the circumference of the endothelium, the length of the line of the close adherence of pericytes, the length of the line of adherence of the synapse and the exist-



tence or lack of granular vesicles in the synapses. Further analysis indicated that the isolated 4-element combination of features of the greatest discrimination force is sufficient to ascertain the existing differences among the 5 examined nuclei.

Comparison of the nuclei by pairs did not show statistically significant differences only between the lateral and basal nuclei and between central and medial nuclei (Fig. 7c).

It, thus, allows to distinguish three different groups of nuclei of the amygdaloid body, i.e. the basal-lateral group, the central-medial group and the cortical nucleus detached from them.

#### DISCUSSION

The division of the nuclei of the cat amygdaloid body into groups: basal-lateral, central-medial, and the detached from them cortical nucleus presented in this paper, confirms the results of our studies at the light microscope level (Kraszpulski et al. 1985) and the results of morphological, immunohistochemical and functional studies of other authors (Koiwegami 1963; Fonberg 1968; Narkiewicz et al. 1978; Femano et al. 1983; Hollendall et al. 1986). This division was based on the electron microscope evaluation of functionally conjugate units as which we adopted terminal vessels together with "close" synapses. The existence of neurocapillar complexes in other tissues has been suggested by different authors (Tice, Creveling 1975; Forbes et al. 1977).

The present results may indirectly confirm the existence of functionally conjugate units in the amygdaloid body by the differences among these nuclei only in the case of evaluation of synapses and vessel features together by means of multivariate analysis of variance (Fig. 7c). The statistical evaluation of either synaptic and vascular features only did not allow to distinguish any differing groups within the 5 examined nuclei (Fig. 7). The fact that the 4-element combination of features, differentiating the nuclei of the amygdaloid body, contains both vascular features (circumference of the endothelium, length of the line of close adherence of pericytes to the endothelium) and synaptic features (length of the line of adherence of the synapse to the vessel, existence or lack of granular vesicles in the synapse) does not seem to be accidental, either.

The results of numerous studies carried out at the level of the electron microscope suggest the existence of nerve terminals functionally connected with terminal vessels (Rennels, Nelson 1975; Reichle et al. 1975; Itakura et al. 1977; Swanson et al. 1977; Edvinsson et al. 1979; Madison et al. 1981; Betz, Goldstein 1984). Taking into consideration this suggestion we expected the ultrastructural features of the examined close synapses to distinguish the functionally opposite nuclei of the



amygdaloid body. The presented studies show that the presence or lack of granular vesicles in the synapses analysed and the length of the line of adherence of these synapses to vessels may be features belonging to the 4-element combination of features differentiating the nuclei.

The functional differentiation of the examined nuclei could also be related to prospective neurotransmission by the components of terminal vessels which, from the morphological point of view, is connected with the pericyte-endothelium relation. In our previous work (Łukaszyk the endothelium and pericyte and close contact between the cellular membranes of these two cells is the characteristic feature of terminal vessels forming the blood-brain barrier. As Reichle et al. (1975), Allsop, Gamble (1979), Betz, Goldstein (1984) suggest, the transmission of stimuli in terminal vessels of the central nervous system may run through these sites.

The question, whether the location of receptors for neurotransmitters (Cornford, Cornford 1986) is connected with these sites is not answered yet. Analysis of the presented studies of uncorrelated features of nerve terminals and terminal vessel walls in the amygdaloid body points to the length of the line of close adherence of pericytes to the endothelium and the circumference of the endothelium as the elements comprised in the 4-element combination of features differentiating the nuclei.

Without denying the correctness of Burnstock's statements (1975a, b) that transmission from the close axon terminals to the vessels cannot be revealed on the basis of morphological studies solely, it should be noted that, assuming the existence of neurotransmission, the 4 synaptic-vascular parameters discriminating functionally different nuclei of the amygdaloid body can be ordered in a certain logical sequence: synapses with granular vesicles — lines of adherence of the synapse to the terminal vessel — the pericyte — the line of close adherence of the pericyte to the endothelium — the endothelium. This suggestion requires naturally many further, thorough studies.

ZAKOŃCZENIA NERWOWE OKOŁONACZYNIOWE  
W RELACJACH ZE SKŁADOWYMI NACZYŃ TERMINALNYCH  
CIAŁA MIGDAŁOWATEGO KOTA

Streszczenie

W celu zbadania stosunków zachodzących pomiędzy zakończeniami nerwowymi okołonaczyniowymi a składowymi naczyniami terminalnymi oraz sprawdzenia, czy różnicują one badane jądra ciała migdałowego kota zbadano 16 podstawowych parametrów, charakteryzujących analizowane naczynia i kolbki synaptyczne. Przedmiotem badań były 332 przekroje naczyń terminalnych wraz z leżącymi przy nich 319 kolbkami synaptycznymi z 5 jąder ciała migdałowego: bocznego, podstawnego, centralnego, przyśrodkowego i korowego, od 8 dorosłych kotów.



Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ocena statystyczna cech tylko kolbkowych lub tylko naczyńowych nie pozwala na wyłonienie w obrębie badanych 5 jąder grup różniących się między sobą. Dopiero łączne oddziaływanie 10 nieskorelowanych cech kolbkowych i naczyńowych, uwzględnione w wielowymiarowej analizie wariancji, wyodrębniła wśród badanych jąder 3 grupy różniące się między sobą. Grupę pierwszą stanowią jądra boczne i podstawne, drugą — jądra centralne i przyśrodkowe, od obu tych grup zaś statystycznie istotnie różni się jądro korowe. Dalsza analiza wykazała, że przedstawione zróżnicowanie jąder można uzyskać przy liczbie cech zredukowanej do czteroelementowej kombinacji o największej sile dyskryminacyjnej. Należą do niej: obwód śródbłonka, długość linii bezpośredniego przylegania pericytów do śródbłonka, długość linii przylegania kolbki oraz obecność lub brak pęcherzyków ziarnistych, a więc zarówno cechy kolbkowe, jak i naczyńowe.

### ОКОЛОСОСУДИСТЫЕ НЕРВНЫЕ ОКОНЧАНИЯ В СООТНОШЕНИИ С КЛЕТОЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ТЕРМИНАЛЬНЫХ СОСУДОВ МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА КОШКИ

#### Резюме

Авторы исследовали 16 основных параметров связанных с сосудами и синаптическим колбочками, чтобы определить соотношения между околососудистыми нервными окончаниями и составными элементами терминальных сосудов, а также чтобы проверить, отличаются ли эти соотношения исследуемые ядра миндалевидного тела кошки.

Исследовались 332 поперечные сечения терминальных сосудов вместе с присутствующими вблизи 319 синаптическими колбочками у 8 взрослых кошек, в 5 ядрах миндалевидного тела: боковом, основном, центральном, парамедианном и корковом.

На основании полученных результатов выявлено, что статистическая оценка только колбочковых или только сосудистых свойств не позволяет выделить в исследуемых 5 ядрах отличающихся групп. Только совместное влияние 10 несокорелированных свойств колбочков и сосудов учтенное в многомерном дисперсионном анализе выделяет среди исследуемых ядер 3 отличающиеся группы. Первая группа — это ядра боковые и основные, вторая — центральные и парамедианные; статистически существенно отличается от этих групп корковое ядро.

Дополнительный анализ обнаружил, что отличие ядер удастся получить при редуцированном до четырех числе комбинации с самой большой силой дискриминации. К этой комбинации принадлежат: окружность эндотелия, длина линии непосредственноприлеаания перicytов к эндотелии, длина линии прилеаания синаптической колбочки и присутствие или отсутствие зернистых пузырьков, что означает свойства так колбочки как и сосуда.

#### REFERENCES

1. Ahrens H., Läuter J.: Wielowymiarowa analiza wariancji. PWN, Warszawa 1979.
2. Allsopp G., Gamble H. J.: An electron microscopic study of the pericytes of the developing capillaries in human fetal brain and muscle. *J. Anat.*, 1979, 128, 155—168.
3. Bär T., Wolff J. R.: Morphometry of interendothelial and glio-vascular contacts of rat brain capillaries during postnatal development. *Bibl. Anat.*, 1977, 15, 514—517.



4. Bartkowiak A.: Podstawowe algorytmy statystyki matematycznej. PWN, Warszawa 1979.
5. Bell M. A., Ball M. J.: Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1981, 53, 299—318.
6. Betz A. L., Goldstein G. W.: Brain capillaries. Structure and function. *Handbook Neurochem.*, 1984, 7, 465—484.
7. Burnstock G.: Innervation of vascular smooth muscle. In: *The Smooth Muscle of the Artery*. Eds. S. Wold and N. T. Werthessen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1975 a, 57, 20—34.
8. Burnstock G.: Innervation of vascular smooth muscle: histochemistry and electron microscopy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, Suppl. 2, 1975 b, 7—20.
9. Conradi N. G., Eins S., Wolff J. R.: Postnatal vascular growth in the cerebellar cortex of normal and protein-deprived rats. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1979, 47, 131—137.
10. Cornford E. M., Cornford M. E.: Nutrient transport and the blood-brain barrier in developing animals. *Fed. Proc.*, 1986, 45, 2065—2072.
11. Edvinsson L., Hakansson C. H., Hogestatt E., Larsson B., Skarby T., von Mecklenburg C.: Possible innervation of cerebral capillaries in the rat? In: *Circulation Cerebrale*. Bes and Geraud, Toulouse, 1979.
12. Femano P. A., Edinger H. M., Siegel A.: The effects of stimulation of substantia innominata and sensory receiving areas of the forebrain upon the activity of neurons within the amygdala of the anesthetized cat. *Brain Res.*, 1983, 269, 119—132.
13. Fonberg E.: The role of the amygdaloid nucleus in animal behaviour. In: *Brain reflexes*. Ed. E. A. Asratyan, Elsevier, Amsterdam, London, New York 1968, 273—281.
14. Forbes M. S., Rennels M. L., Nelson E.: Innervation of myocardial microcirculation: terminal autonomic axons associated with capillaries and post-capillary venules in mouse heart. *Am. J. Anat.*, 1977, 149, 71—92.
15. Hellendall R. P., Godfrey D. A., Ross C. D., Armstrong D. M., Price J. L.: The distribution of choline acetyltransferase in the rat amygdaloid complex and adjacent cortical areas, as determined by quantitative micro-assay and immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 1986, 249, 486—496.
16. Imdahl A., Hossmann K. A.: Morphometric evaluation of post-ischemic capillary perfusion in selectively vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1986, 69, 267—271.
17. Itakura T., Yamamoto K., Tohyama M., Shimizu N.: Central dual innervation of arterioles and capillaries in the brain. *Stroke*, 1977, 8, 360—365.
18. Johnson N. L., Leone F. C.: *Statistics and experimental design in engineering and the physical sciences*. J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1977.
19. Juraniec J., Wrzółkowska T., Narkiewicz O.: Synaptic organization of some nuclei in the amygdaloid complex. *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, 1974, 19, 115—116.
20. Kevetter G. A., Winans S. S.: Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "Vomer nasal amygdala". *J. Comp. Neurol.*, 1981 a, 197, 81—98.
21. Kevetter G. A., Winans S. S.: Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the "Olfactory amygdala". *J. Comp. Neurol.*, 1981 b, 197, 99—111.
22. Koikegami H.: Amygdala and other related limbic structures: experimental studies on the anatomy and function. *Acta Med. Biol.*, 1963, 10, 161—277.



23. Kraszpulski M., Wrzołkova T., Mierzewski P.: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body. Morphometric studies. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 255—263.
24. Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. III. Terminal vessel ultrastructure in the nuclei of the cat amygdaloid body. Morphometric studies. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 265—272.
25. Łukaszyk I., Wrzołkova T., Cofta T.: Capillary blood vessels of the brain. II. Axon terminals of capillary vessels in different parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 85—96.
26. Madison R., Crutcher K. A., Davis J. N.: Sympathohippocampal neurons are inside the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 1981, 231, 183—189.
27. Meier-Ruge W., Hunziker O., Schilz U., Tobler H. J., Schweizer A.: Stereological changes in the capillary network and nerve cells of the ageing human brain. *Mech. Ageing Dev.*, 1980, 14, 233—243.
28. Narkiewicz O., Juraniec J., Wrzołkova T.: The distribution of axon terminals with flattened vesicles in the nuclei of the amygdaloid body of the cat. *J. Hirnforsch.*, 1978, 19, 133—143.
29. Raichle M. E., Hartman B. D., Eichling J. O., Sharpe L. G.: Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 75, 3726—3730.
30. Rennels M. L., Nelson E.: Capillary innervation in the mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration. *Amer. J. Anat.*, 1975, 144, 233—241.
31. Swanson L. W., Connelly M. A., Hartman B. K.: Ultrastructural evidence for central monoaminergic innervation of blood vessels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.*, 1977, 136, 166—173.
32. Tice L. W., Creveling C. R.: Electron microscopic identification of adrenergic nerve endings on thyroid epithelial cells. *Endocrinology*, 1975, 97, 1123—1129.
33. Wrzołkova T., Cofta T., Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularization density in various parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77—83.

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, 1 Dębinki Str., 80-210 Gdańsk-Wrzeszcz.



ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

## MÓZGOWY PRZEPŁYW KRWI W DOŚWIADCZALNYM MODELU ŚMIERCI KLINICZNEJ U SZCZURÓW

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Doświadczalny model całkowitego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego u szczura opisany w 1982 r. przez Korpaczewa i wsp. wykazuje szereg udogodnień w porównaniu z dotychczas stosowanymi modelami (Hossmann, Zimmermann 1974; Kolata 1979, Pulsinelli, Brierley 1979; Pluta i wsp. 1980; Kapuściński, Mossakowski 1983 i in.). Należą do nich przede wszystkim dowolnie długa możliwość obserwacji zwierząt po okresie niedokrwienia mózgu, brak konieczności stosowania środków farmakologicznych, jak również stosunkowo nieskomplikowany zabieg bez wykonywania rozległej operacji chirurgicznej. Istota tego modelu polega na całkowitym zatrzymaniu krążenia u zwierząt, wywołowanym przez zaciśnięcie pęczka naczyniowego serca, przy użyciu urządzenia zbliżonego kształtem do haczyka, który wprowadza się drogą wkłucia do klatki piersiowej, bez wykonywania torakotomii i prowadzenia długotrwałej kontrolowanej wentylacji. Pęczek naczyniowy serca uciskany jest przez okres 3,5 min, a następnie po wyjęciu haczyka okres niedokrwienia może trwać nawet do 20 min, po którym zwierzęta są skutecznie reanimowane przez zastosowanie zewnętrznego masażu serca i okresowej kontrolowanej wentylacji płuc. Zatrzymaniu krążenia krwi w całym organizmie towarzyszy zatrzymanie czynności oddechowej, dlatego też model ten odpowiada stanowi śmierci klinicznej zwierząt z towarzyszącym jej całkowitym niedokrwieniem mózgu.

Patofizjologiczna charakterystyka modelu została szczegółowo opisana przez jego autorów (Korpaczew i wsp. 1982; Hamzina 1981, Łysenkow 1981) i uzupełniona badaniami Majkowskiej (1986). Wyniki badań morfologicznych z jego zastosowaniem opisali Mossakowski i wsp. (1986). Wprowadzenie modelu do badań niedokrwienia mózgu wiązało się z udokumentowaniem całkowitego zatrzymania krążenia w mózgu i pozostałych częściach organizmu. W tym celu Korpaczew i wsp. (1982) przeprowadzili badania reograficzne mózgu, ogona i tylnych kończyn zwierząt, które



wykazały całkowite zatrzymanie krążenia krwi od pierwszych sekund ucisku pęczka naczyniowego serca do początku okresu reanimacji. Ponadto wykonano serię doświadczeń z otwarciem tętnicy szyjnej i aorty brzusznej, które nie wykazały krwawienia podczas ucisku pęczka naczyniowego serca. Dodatkowo zastosowano izotopową metodę oceny ukrwienia narządów przez dożylnie wstrzyknięcie krwinek czerwonych znakowanych  $^{51}\text{Cr}$ , które nie pojawiły się w tętnicy szyjnej, aorcie i w tkance płucnej w okresie ischemicznym (Korpaczew i wsp. 1982). W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano natomiast oceny mózgowego przepływu krwi w tym modelu. Było to powodem do przeprowadzenia serii badań z zastosowaniem metody klirensu promieniotwórczego ksenonu.

Celem pracy była charakterystyka mózgowego przepływu krwi w okresie śmierci klinicznej zwierząt i po reanimacji, tym bardziej, że podczas okresu niedokrwienia u większości zwierząt nie wygasa bioelektryczna czynność serca, którą obserwuje się w zapisie elektrokardiograficznym (EKG). Szczegółowe zadania pracy dotyczyły udokumentowania całkowitego zatrzymania mózgowego przepływu krwi podczas ucisku pęczka naczyniowego serca, a szczególnie w dalszym okresie ischemii — po zaprzestaniu ucisku oraz charakterystyki mózgowego przepływu krwi w okresie poischemicznym.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 38 szczurach rasy Wistar, samicach o masie ciała około 180 g z hodowli losowej. W płytkiej narkozie eterowej wykonywano tracheostomię, umieszczano w tchawicy rurkę do kontrolnej wentylacji, a następnie cewnikowano prawą tętnicę udową celem pomiaru ciśnienia krwi i lewą tętnicę szyjną wewnętrzną do pomiaru mózgowego przepływu krwi. Dla ciągłego zapisu czynności bioelektrycznej mózgu, przez otwory wywiercone w lewej okolicy czołowej, ciemieniowej i potylicznej czaszki, umieszczano w styczności z oponą twardą trzy srebrne elektrody. EKG rejestrowano przy użyciu elektrod igłowych, wklutych do prawej przedniej i lewej tylnej kończyny, a trzecią elektrodę wkluwano w podbródek. Pomiar ciśnienia krwi prowadzono przy zastosowaniu przetwornika ciśnienia P23 Stadham i elektromanometru EK4 (Farum). Elektrokortykogram (ECoG), EKG i ciśnienie krwi rejestrowano w sposób ciągły za pomocą elektroencefalografu 8S firmy Medidor, przy czym komponentę prądu stałego poziomu ciśnienia krwi zapisywano w sposób pośredni łącząc elektromanometr z Recorderem 360, firmy Medipan. Dodatkowo rejestrowano czynność akustyczną serca przekazując sygnał kanału EKG z wyjścia monitorowego elektroencefalografu na głośnik.

Mózgowy przepływ krwi oceniano metodą Høedt-Rasmussena i wsp. (1966) przez wstrzyknięcie do lewej tętnicy szyjnej wewnętrznej około



30  $\mu\text{Ci}$   $^{133}\text{Xe}$  w roztworze fizjologicznym NaCl w objętości nie przekraczającej 0,3 ml. Prędkość klirensu ksenonu z lewej półkuli mózgu zapisywano graficznie z użyciem zestawu aparatów opisanego przez Kapuścińskiego (1974). Mózgowy przepływ krwi obliczano przenosząc dane ze skali liniowej na skalę logarytmiczno-liniową stosując metodę analizy dwukompartmentalnej, obliczając przepływ dla substancji szarej (Fg) i białej (Fw) (Waltz i wsp. 1972), jak również metodę początkowego nachylenia krzywej (CBF initial) podczas dwóch pierwszych minut zapisu krzywej (Olesen, Paulson 1973).

Badania przeprowadzono w 2 grupach doświadczalnych: 5 minut niedokrwienia (17 zwierząt) i 10 minut niedokrwienia (21 zwierząt). Przed wywołaniem śmierci klinicznej u każdego zwierzęcia wykonywano zapis badanych zmiennych z jednorazowym lub dwukrotnym wstrzyknięciem  $^{133}\text{Xe}$  celem oceny kontrolnego mózgowego przepływu krwi. Przed wprowadzeniem haczyka do klatki piersiowej ponownie wstrzykiwano  $^{133}\text{Xe}$  rejestrując początkowy odcinek krzywej klirensu ksenonu. Podczas zapisu mózgowego przepływu krwi uciskano pęczęk naczyniowy serca na okres 3,5 minut. Po upływie tego czasu wyjmowano haczyk z klatki piersiowej. Zapisując w sposób ciągły krzywą klirensu ksenonu rozpoczynano reanimację po 5 lub 10 minutach od początku ischemii stosując zewnętrzny masaż serca z prędkością 120 uderzeń na minutę i kontrolowaną wentylację płuc przy użyciu pompy oddechowej dla małych zwierząt, firmy Medipan. W okresie poischemicznym mózgowy przepływ krwi badano najwcześniej pomiędzy 10 i 15 minutą od końca niedokrwienia (ksenon wstrzykiwano natychmiast po osiągnięciu przez krzywą poziomu tła), a następnie w różnych przedziałach czasowych do 100 minuty w grupie zwierząt z 5 minutową i do 120 minuty w grupie zwierząt z 10 minutową śmiercią kliniczną.

Analizę wyników przeprowadzono na podstawie doświadczeń, w których reanimacja zwierząt była skuteczna, obserwowano u nich powrót czynności bioelektrycznej mózgu, a poziom ciśnienia krwi w późnym okresie poischemicznym zbliżony był do poziomu kontrolnego. Obejmowała ona 8 zwierząt w grupie z 5 minutową ischemią i 6 zwierząt w grupie z 10 minutowym niedokrwieniem. W równoległej serii doświadczeń przeprowadzonych w tych samych warunkach oceniono zmiany prężności gazów, pH i hematokrytu krwi tętniczej (Majkowska 1986).

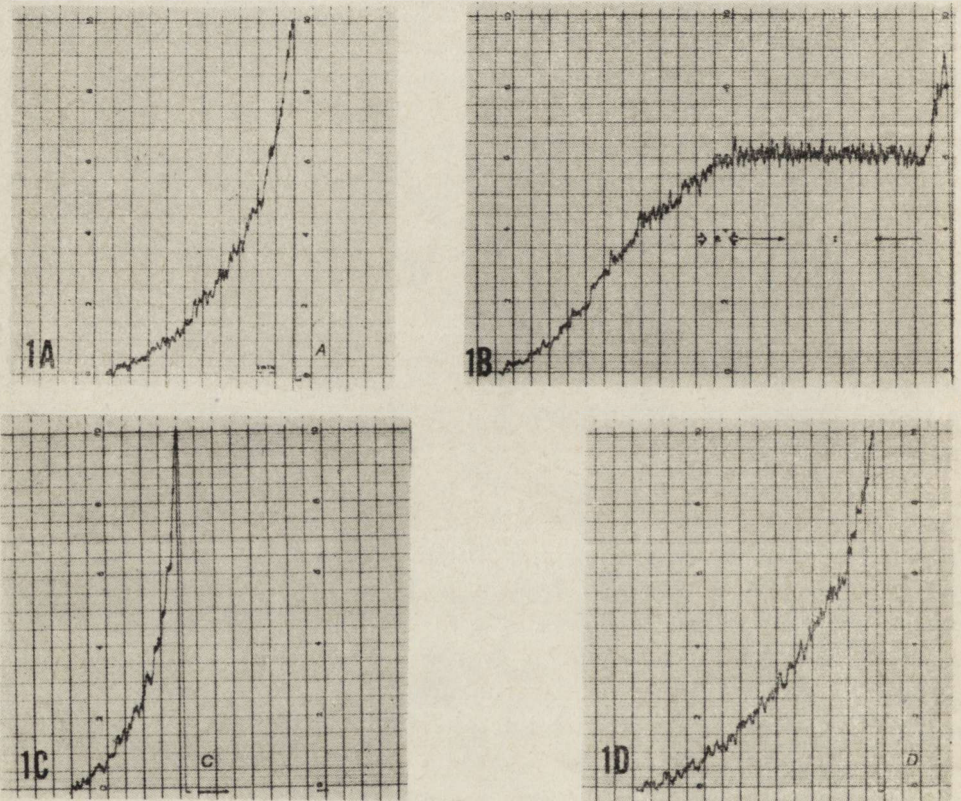
#### WYNIKI

Średnie ciśnienie tętnicze krwi w kontroli w grupie zwierząt z 5 minutową ischemią wynosiło  $101,9 \pm 12,5$  mm Hg ( $n = 8$ ), a w końcowym okresie poischemicznym  $98,7 \pm 11,1$  mm Hg ( $n = 8$ ), natomiast w grupie zwierząt z 10 minutowym niedokrwieniem odpowiednio  $110,8 \pm 6,7$  mm



Hg ( $n = 6$ ) i  $99,2 \pm 9,7$  mm Hg ( $n = 6$ ). Zwierzęta z ciśnieniem krwi poniżej 80 mm Hg w końcowym okresie poniedokrwiennym nie były uwzględnione w analizie wyników. U wszystkich zwierząt uwzględnionych w analizie wyników, po reanimacji powróciła spontaniczna czynność oddechowa i bioelektryczna mózgu, a czynność serca była miarowa z rytmem zatokowym.

Krzywe mózgowego przepływu krwi w przebiegu doświadczenia z 10 minutową śmiercią kliniczną szczura przedstawiono na rycinie 1. Średnie wartości kontrolne mózgowego przepływu krwi w substancji szarej (Fg) w grupie zwierząt z 5 minutową ischemią wynosiły  $41,4 \pm 4,9$  ml/100 g/min ( $n = 8$ ), a w grupie zwierząt z 10 minutową ischemią  $40,5 \pm 6,3$  ml/100 g/min ( $n = 6$ ). Średnie wartości kontrolne przepływu w substancji białej (Fw) w grupie zwierząt z 5 minutową ischemią wynosiły  $26,7 \pm 7,4$  ml/



Ryc. 1A—1D. Krzywe klirensu  $^{133}\text{Xe}$  z półkuli mózgu szczura. Rzędna — radioaktywność w imp/min, odcięta — czas. Ryc. 1A — kontrola. Ryc. 1B — 10 min śmierć kliniczna (I), reanimacja (R). Ryc. 1C — 40 min okresu poischemicznego — reaktywna hiperemia. Ryc. 1D — 120 min okresu poischemicznego

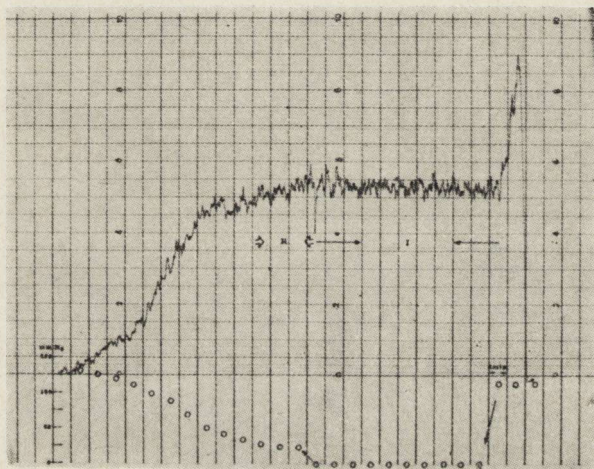
Figs 1A—1D.  $^{133}\text{Xe}$  clearance curves from the rat brain hemisphere. Ordinate — radioactivity counts/min. Abscissa — time. Fig. 1A — control. Fig. 1B — 10 min of clinical death (I), reanimation (R), Fig. 1C — 40 min of postischemic period — reactive hyperemia. Fig. 1D — 120 min of postischemic period



100 g/min ( $n = 7$ ), a w grupie zwierząt z 10 minutowym niedokrwieniem  $26,8 \pm 4,5$  ml/100 g/min ( $n = 5$ ).

W czasie całego okresu ischemicznego zarówno w trakcie ucisku pęczka naczyniowego serca, jak i po wyjęciu haczyka obserwowano płaską krzywą klirensu  $^{133}\text{Xe}$  świadcząca o całkowitym zatrzymaniu mózgowego przepływu krwi.

Podczas reanimacji trwającej najczęściej od 1,5 do 4 minut obserwowano powolny wzrost ciśnienia krwi, któremu towarzyszyło wyplukiwanie  $^{133}\text{Xe}$  zalegającego w mózgu świadczące o uruchomieniu krążenia mózgowego uwidaczniające się spadkiem krzywej klirensu ksenonu (ryc. 1B i 2). Wydajność zewnętrznego masażu serca można było ocenić na podstawie wzrostu ciśnienia krwi, które podczas masażu osiągało wartości około 20 mm Hg, nie przekraczało ono jednak nigdy wartości 30 mm Hg. Wzrost ciśnienia krwi powyżej 30 mm Hg świadczył o podjęciu hemodynamicznie wydajnej czynności serca.



Ryc. 2. Krzywa klirensu  $^{133}\text{Xe}$  z półkuli mózgu szczura podczas 10 min śmierci klinicznej (I) i reanimacji (R). Rzędna — radioaktywność w imp/min. Odcięta — czas. O — ciśnienie tętnicze krwi

Fig. 2.  $^{133}\text{Xe}$  clearance curve from the rat brain hemisphere during 10 min of clinical death (I) and reanimation (R). Ordinate — radioactivity counts/min. Abscissa — time. O — arterial blood pressure

Charakterystykę zmian mózgowego przepływu krwi w substancji szarej w okresie poischemicznym w dwóch grupach doświadczalnych ilustrują tabele 1 i 2 oraz ryciny 3 i 4.

Wzrost mózgowego przepływu krwi zarówno Fg, jak i Fw obserwowano w obu grupach doświadczalnych. W grupie zwierząt z 5 minutową ischemią osiągał on średnią wartość Fg  $191,7 \pm 77,7\%$  i występował w czasie  $23,1 \pm 9,7$  ( $n = 8$ ) minut od zakończenia ischemii. Wartości dla Fw w tej samej grupie doświadczalnej wynosiły odpowiednio  $158,6 \pm 35,1\%$  i  $26,4 \pm$



Tabela 1. Przepływ krwi w korze mózgu szczurów w okresie poischemicznym. Wartości w  $\text{ml} \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  i jako odsetek wartości kontrolnych. Czas śmierci klinicznej — 5 min

Table 1. Cortical cerebral blood flow in rats during postischemic period. Values in  $\text{ml} \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  and as a percentage of control values. Period of clinical death — 5 min

Lp.	Kontrola Control	Okres poischemiczny (min) Postischemic period (min)										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	33,0		27,7	40,8		38,5	33,0				30,4	
	100%		83,9	123,6		116,7	100,0				92,2	
2.	42,3		73,0	62,6		44,5		38,7				39,6
	100%		172,6	148,0		105,3		91,6				93,6
3.	49,5		33,0	63,0	49,5		47,6				45,2	
	100%		66,6	127,3	100,0		96,1				91,3	
4.	38,9		49,1	30,0			28,1					27,1
	100%		126,3	77,1			72,3					69,7
5.	46,2		69,3	86,6		53,3			43,5			42,8
	100%		150,0	187,4		115,4			94,2			92,7
6.	41,7		104,2	65,9		54,3	54,3		39,0			32,1
	100%		249,9	158,0		130,3	130,3		93,5			77,0
7.	36,5		99,0	43,3	26,6							22,3
	100%		368,7	118,6	72,9							61,1
8.	43,3		57,7	77,0		53,3	31,5					29,8
	100%		133,2	177,8		123,1	72,7					68,9

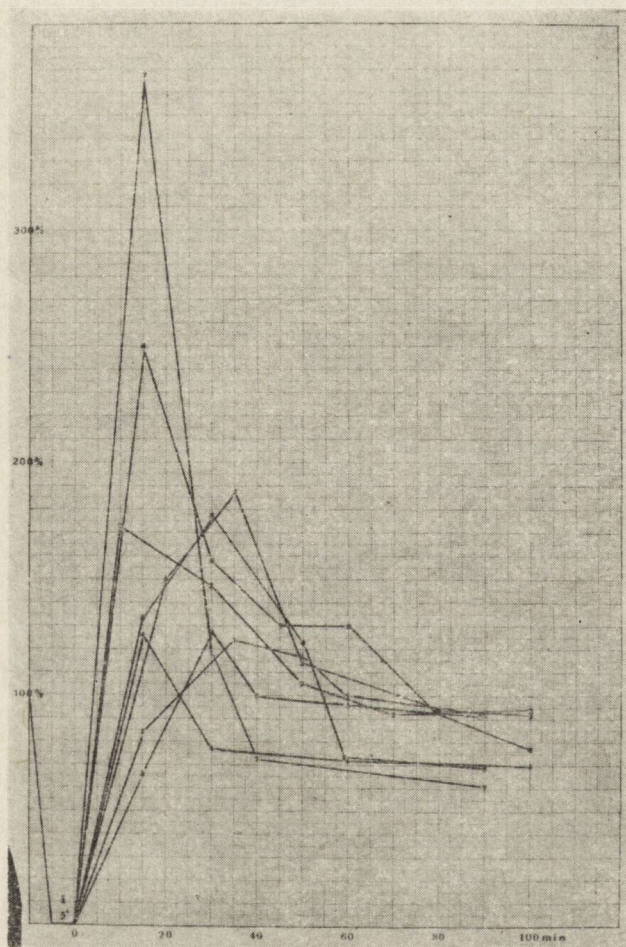
Tabela 2. Przepływ krwi w korze mózgu szczurów w okresie poischemicznym. Wartości w  $\text{ml} \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  i jako odsetek wartości kontrolnych. Czas śmierci klinicznej — 10 min

Table 2. Cortical cerebral blood flow in rats during postischemic period. Values in  $\text{ml} \times 100 \text{ g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  and as a percentage of control values. Period of clinical death — 10 min

Lp.	Kontrola Control	Okres poischemiczny (min) Postischemic period (min)												
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1.	33,0			40,8	38,5		28,9		26,8					24,5
	100%			124,0	117,0		87,6		81,2					74,3
2.	40,8		40,8	69,3	86,6		63,0	86,6		49,5	38,5			34,6
	100%		100,0	169,8	212,2		154,4	212,2		121,3	94,4			84,8
3.	38,5		43,3		63,0		40,8			38,5	38,5			36,7
	100%		112,5		163,6		106,1			100,0	100,0			95,3
4.	36,5		43,3		31,5	40,8		26,6		28,9	26,6			28,5
	100%		118,6		86,3	112,1		73,1		79,2	73,1			78,2
5.	53,3		53,3		74,2		62,8			46,2				53,3
	100%		100,0		139,2		117,8			86,7				100,0
6.	40,8				59,7	77,0	86,6			86,6	50,7			35,2
	100%				146,3	188,7	212,2			212,2	124,3			86,3



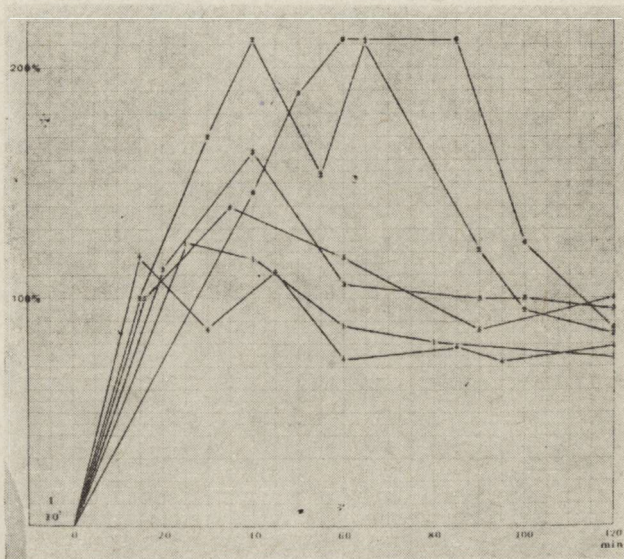
$\pm 7,4$  min ( $n = 7$ ). W grupie zwierząt z 10 minutowym niedokrwieniem wzrost Fg osiągał średnią wartość  $161,6 \pm 38,5\%$  i występował w czasie  $35,0 \pm 14,1$  min ( $n = 6$ ) od zakończenia ischemii. Wartości dla Fw w tej grupie doświadczalnej wynosiły odpowiednio  $175,4 \pm 72,8\%$  i  $36,0 \pm 18,8$  min ( $n = 5$ ). Porównanie wartości mózgowego przepływu krwi wewnątrz grup, jak i pomiędzy grupami doświadczalnymi nie wykazało wprawdzie istotnych różnic zarówno w odsetku zwiększenia przepływu, jak i w czasie jego występowania, obserwowano jednakże tendencję późniejszego występowania zwiększonego przepływu krwi w grupie zwierząt o dłuższym okresie niedokrwienia.



Ryc. 3. Zmiany przepływu krwi w korze mózgu szczurów w okresie poischemicznym wyrażone jako odsetek wartości kontrolnych. Czas śmierci klinicznej — 5 min  
 Fig. 3. Changes of cortical cerebral blood flow in rats during postischemic period as a percentage of control values. Period of clinical death — 5 min



W późniejszym okresie poischemicznym mózgowy przepływ krwi Fg w grupie zwierząt z 5 minutową ischemią osiągał średnią wartość  $80,8 \pm \pm 12,3\%$  ( $n = 8$ ) w 90 i 100 minucie i w grupie zwierząt z 10 minutową ischemią osiągał średnią wartość  $86,5 \pm 8,9\%$  ( $n = 6$ ) w 120 minucie od końca ischemii. U żadnego zwierzęcia nie obserwowano jednakże wartości poniżej  $60\%$  poziomu kontrolnego.



Ryc. 4. Zmiany przepływu krwi w korze mózgu szczurów w okresie poischemicznym wyrażone jako odsetek wartości kontrolnych. Czas śmierci klinicznej — 10 min  
 Fig. 4. Changes of cortical cerebral blood flow in rats during postischemic period as a percentage of control values. Period of clinical death — 10 min

#### OMÓWIENIE

Zastosowany model śmierci klinicznej u szczurów jest stosunkowo nietraumatyczny, jeżeli nie dołączą się do niego dodatkowe zjawiska patologiczne. Wykonanie tracheostomii, cewnikowanie tętnic, montowanie elektrod do pomiarów elektrofizjologicznych trwa około 1,5 godz., a zwierzęta pozostają w tym czasie w płytkiej narkozie eterowej. Następnie wykonuje się najczęściej 2 kontrolne badania mózgowego przepływu krwi, co wydłuża czas przed rozpoczęciem właściwego niedokrwienia do około 2 godz. Zabiegi te stanowią niewątpliwie dodatkowe obciążenie zwierząt, dlatego w przedstawionej serii doświadczalnej zrezygnowano z oceny prężności gazów i pH krwi tętniczej, ażeby przez pobieranie próbek nie zmniejszać objętości krwi.



W omawianym materiale reanimacja była nieskuteczna u 5 zwierząt (29<sup>0</sup>/o) w grupie 5 minutowej ischemii i u 8 zwierząt (38<sup>0</sup>/o) w grupie 10 minutowej ischemii. Korpaczew i wsp. (1982) dla tych przedziałów czasowych podają wartość odpowiednio 13 i 35<sup>0</sup>/o, a Majkowska (1986) 30 i 50<sup>0</sup>/o. Wyniki badań Mossakowskiego i wsp. (1986) z zastosowaniem tego modelu z 10 minutową ischemią wykazały 40<sup>0</sup>/o śmiertelność zwierząt w okresie zatrzymania czynności serca i oddechu.

Główną przyczyną nieskuteczności reanimacji było migotanie serca, którego nie udało się opanować zewnętrznym masażem. Warto podkreślić, że podczas reanimacji nie stosowano elektrycznej kardiowersji ani wstrzyknięć adrenaliny, które sugerują Korpaczew i wsp. (1982) przy dłuższych czasach ischemii. W grupie zwierząt nie uwzględnionych w analizie wyników znalazły się szczury, u których wystąpiły krwawienia do jamy opłucnej (2), niecałkowite niedokrwienie mózgu (1), obniżenie ciśnienia tętniczego krwi w okresie poischemicznym poniżej 80 mm Hg (6) lub inne nieprawidłowości techniczne doświadczenia (2).

U zwierząt z obniżonym poniżej przyjętej wartości krytycznej ciśnieniem krwi w okresie poischemicznym reanimacja trwała dłużej niż 4 minuty i jak się wydaje głównym powodem tego stanu były zaburzenia czynności serca, chociaż nie można całkowicie wykluczyć niedokrwienia uszkodzenia ośrodków naczyniowych pnia mózgu.

Płaski przebieg krzywej klirensu <sup>133</sup>Xe w okresie ischemicznym potwierdził całkowite zatrzymanie mózgowego przepływu krwi pomimo zachowanej bioelektrycznej czynności serca. Jest to zgodne z badaniami Korpaczewa i wsp. (1982), z zastosowaniem metody reograficznej i izotopowej przy użyciu <sup>51</sup>Cr. Ma to istotne znaczenie wobec znanego zróżnicowania skutków całkowitego bądź częściowego niedokrwienia mózgu. Według Hossmanna i Zimmermanna (1974) całkowite niedokrwienie mózgu jest mniej uszkodzające dla tkanki niż częściowe jego niedokrwienie, zwłaszcza z towarzyszącym zastojem krwi. Steen i wsp. (1979) prezentują odmienny pogląd stwierdzając, że utrzymanie mózgowego przepływu krwi podczas ischemii na poziomie minimalnym — niższym nawet niż 10<sup>0</sup>/o poziomu prawidłowego — umożliwi lepszy powrót funkcji mózgu w okresie poniedokrwieniowym.

Wyniki mózgowego przepływu krwi obliczono dla komponenty szybkiej, która reprezentuje przepływ w korze (Fg) i komponenty wolnej, która reprezentuje przepływ w istocie białej (Fw). Obliczono również wartości F' initial, jednakże nie uwzględniono ich w wynikach, ponieważ korelują dobrze z Fg i są jego przybliżeniem (Olesen, Paulson 1973).

Wzrost mózgowego przepływu krwi zarówno w korze, jak i istocie białej w okresie poniedokrwieniowym obserwowano w obu grupach doświadczalnych. Czas jego występowania nakładał się na znaczną kwasicę metaboliczną, w której według badań Łysenkowa (1981) i Majkowskiej (1986) z użyciem tego modelu pH osiągało wartości w granicach 6,8—7,0



w piątej i siódmej minucie od zakończenia niedokrwienia oraz nie wzrosło powyżej 7,2 podczas 60 minut okresu poischemicznego.

Wzrost przepływu krwi w okresie poniedokrwienym jest znanym zjawiskiem i wielokrotnie opisywanym (Sundt, Waltz 1971; Baldy-Moulinier, Humeau 1974; Hossmann, Zimmermann 1974; Kapuściński 1974 i inni). Mechanizm reaktywnej hyperemii nie jest wyjaśniony jednoznacznie, wiąże się ją między innymi ze znacznym poischemicznym zakwaszeniem środowiska. Według Hossmanna i Zimmermanna (1974) bez wzrostu mózgowego przepływu krwi w okresie poniedokrwienym nie obserwuje się dobrego powrotu czynności bioelektrycznej mózgu i funkcji neurologicznych. Z drugiej jednak strony badania własne wskazują, że przy dłuższych czasach niedokrwienia wzrost ciśnienia krwi i reaktywna hyperemia nasilają rozwój obrzęku mózgu (Kapuściński i wsp. 1975). Klatzo (1975) uważa, iż ostra hyperemia poniedokrwienna stanowi istotny czynnik uszkodzenia bariery krew—mózg.

Średni czas wzrostu mózgowego przepływu krwi w obu grupach doświadczalnych jest zgodny ze średnim czasem powrotu ciągłej aktywności EEG w badaniach Majkowskiej (1986), który wynosił  $21,5 \pm 3,8$  min w grupie z 5 minutowym niedokrwieniem i  $39,0 \pm 5,0$  min w grupie z 10 minutową ischemią. Potwierdza to fakt powrotu czynności bioelektrycznej mózgu w okresie poischemicznym w okresie reaktywnej hyperemii. Po okresie reaktywnej hyperemii, mózgowy przepływ krwi obniżał się do wartości około 80% pomiędzy 90 i 120 minutą w obu grupach doświadczalnych, nie był on jednak nigdy niższy od 60% poziomu kontrolnego.

#### WNIOSKI

1. W modelu śmierci klinicznej u szczurów występuje całkowite zatrzymanie mózgowego przepływu krwi zarówno podczas ucisku pęczka naczyniowego serca, jak i po zaprzestaniu ucisku.

2. Po zaprzestaniu ucisku pęczka naczyniowego serca zachowana jest czynność bioelektryczna serca, jednakże jest ona hemodynamicznie nieskuteczna, a ciśnienie krwi w tym okresie równa się 0 mm Hg.

3. Podczas zewnętrznego masażu serca w zastosowanym modelu doświadczalnym występuje wzrost ciśnienia tętniczego krwi do 30 mm Hg; wzrost ciśnienia powyżej tej wartości świadczy o podjęciu hemodynamicznie wydajnej czynności serca.

4. W okresie poischemicznym występuje przejściowy wzrost mózgowego przepływu krwi średnio do wartości 192% w istocie szarej i 159% w istocie białej po 5 minutowej ischemii i odpowiednio do 162 i 175% po 10 minutowej ischemii. Kolejnym zjawiskiem jest spadek mózgowego przepływu krwi, nie przekraczający z zasady 60% średnich wartości kontrolnych.



CEREBRAL BLOOD FLOW IN THE EXPERIMENTAL MODEL  
OF CLINICAL DEATH IN RATS

Summary

Cerebral blood flow was evaluated by means of  $^{133}\text{Xe}$  clearance method in rats during 5 and 10 min of clinical death and in the postischemic period up to 120 min. Reanimation was induced using external cardiac massage. Cerebral bioelectric activity, heart action and blood pressure were continuously recorded.

During the whole ischemic period cerebral blood flow was stopped despite preserved bioelectric cardiac action. In the postischemic period temporary increase of cerebral blood flow was observed with the mean value of 192% in the grey matter and 159% in the white matter after 5 min of ischemia, and respectively 162% and 175% after 10 min of ischemia.

МОЗГОВОЙ КРОВТОК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛЕ  
КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ КРЫС

Резюме

Мозговой кровоток исследовался методом клиренса  $^{133}\text{Xe}$  во время 5 и 10-минутной клинической смерти крыс и в постшемическом периоде, до 120 минут. Реанимация проводилась с употреблением внешнего массажа сердца. Постоянно регистрировалась биоэлектрическая активность мозга, сердца и давление крови. Во время всего ишемического периода была обнаружена приостановка мозгового кровотока, несмотря на сохранение биоэлектрической деятельности сердца.

В постшемическом периоде появлялось временное увеличение мозгового кровотока после 5-минутной ишемии в среднем до 192% в сером веществе и 159% в белом веществе, а после 10-минутной ишемии — соответственно до 162% и 175%.

PIŚMIENICTWO

1. Baldy-Moulinier M., Humeau Cl.: Electron microscopic study of ischemic and histotoxic hypoxia. Correlation of ultrastructural changes and cerebral blood flow. W: Pathology of cerebral microcirculation. Red. J. Cervós-Navarro. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1975, 307—314.
2. Hamzina N. K.: Wlijanie izmienenii pH na stiepień owodnienia mozga w post-reanimacjonnom periodie u krysz. W: Naruszenia gomeostaza pri ekstriemalnych i terminalnych sostożaniach. Nowosibirskij Gosudarstwienyj Medicinskij Institut, Nowosibirsk, 1981, 40—42.
3. Hossmann K. A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. Brain Res., 1974, 81, 59—74.
4. Høedt-Rasmussen K., Sveinsdottir R., Lassen N. A.: Regional cerebral blood flow in man determined by intra-arterial injection of radioactive gas. Circulat. Res., 1966, 237—247.
5. Korpaczew W. G., Łysenkow S. P., Tiel Ł. Z.: Modielirovanije kliniczskoj smierti i postreanimacionnoj bolezni u krysz. Pat. Fizjol. i Eksp. Tierapia, 1982, 3, 78—80.
6. Kolata R. J.: Survival of rabbits after prolonged cerebral ischemia. Stroke, 1979, 10, 272—277.



7. Kapuściński A.: Cerebral blood flow under conditions of circulatory hypoxia with particular reference to the retransfusion period. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 563—572.
8. Kapuściński A., Mchedlishvili G. I., Nikolaishvili L. S.: Development of post-ischemic brain edema and its relation to circulatory disorders. W: *Blood Flow and Metabolism in the Brain*. Red. A. M. Harper, W. B. Jennett, J. D. Miller, J. O. Rovin, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1975, 10, 21—25.
9. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observation after 30 min bilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. W: *Stroke: Animal Models. Advances in Biosciences*. Vol. 43. Red. K. Stefanović Pergamon Press, Oxford, New York, 1983, 63—82.
10. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The Nervous System*. Vol. 1. *The Basic Neurosciences*. Red. D. B. Tower. Raven Press, New York, 1975, 313—322.
11. Łysenkow S. P.: Kislotno-szczelocnoje rawnowiesie i gazowyj sostaw krwi w ranniem i pozdnim postreanimacjonnych pieriodach. W: *Naruszenia gomeostaza pri ekstrimalnych i terminalnych sostojaniach*. Nowosibirskij Gosudarstwiennyj Medicinskij Institut, Nowosibirsk, 1981, 31—37.
12. Majkowska J.: Pathophysiological characteristics of clinical death model in rats. *Acta Neurol. Scand.*, 1987-submitted.
13. Mossakowski J. M., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471—489.
14. Olesen J., Paulson O. B.: Regional cerebral blood flow in man. Theory and methods. W: *Proc. of the IIInd Intern. Symp. on Nuclear Medicine*, Karlove Vary, 1971. Universita Karlova, Praha, 1973, 215—221.
15. Pluta R., Tołowa S. W., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgowia u królika w wyniku ostrego nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 365—384.
16. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10, 267—272.
17. Steen P. A., Michenfelder J. D., Milde J. H.: Incomplete versus complete cerebral ischemia: improved outcome with a minimal blood flow. *Ann. Neurol.*, 1979, 6, 389—398.
18. Sundt T. M., Waltz A. G.: Cerebral ischemia and reactive hyperemia. Studies of cortical blood flow and microcirculation before, during and after temporary occlusion of middle cerebral artery of squirrel monkeys. *Circulation Res.*, 1971, 28, 426—433.
19. Waltz A. G., Wanek A. R., Anderson E. E.: Comparison of analytic methods for calculation of cerebral blood flow after intracarotid injection of <sup>133</sup>Xe. *J. Nucl. Med.* 1972, 1, 66—72.

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



MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK, TERESA E. BUGERA-PIECUCH, BARBARA KOSICKA

EFFECT OF ASCORBIC ACID ON DOPAMINE LEVEL  
IN THE MOUSE BRAIN AFTER INTOXICATION WITH  
1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE (MPTP)

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

It has been noted, that MPTP is responsible for the parkinsonian syndrome in humans (Ballard et al. 1985) as well in monkeys and mice and the experimental extrapyramidal syndrome is accompanied by damage to the dopaminergic nigrostriatal neurons (Hallman et al. 1984; Chuieh et al. 1985).

The toxicity of MPTP has been attributed to the N-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP<sup>+</sup>), the product of reaction of monoamine oxidase B (MAO B) with MPTP, a terminal metabolite, which accumulates selectively in dopaminergic synapses (Chiba et al. 1984). MPP<sup>+</sup> is able to produce free radicals, which undergo redox cycling and generate reactive oxygen molecules O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and OH: It has been postulated, that the neurotoxic effect of the free radicals on cellular metabolism may then damage membranes of the perikarya of dopaminergic neurons located in the substantia nigra (Sinha et al. 1986).

Sershen et al. (1985) observed the protective effect of some antioxidants from the accumulated free radicals generated from MPTP on dopamine (DA). It also seems possible, that a low glutathione (GSH) content in the substantia nigra in brains of patients with Parkinson's disease may have been due to excessive consumption of GSH in the detoxication process (Perry et al. 1982). Experimental studies on the effect of MPTP on the GSH level in the mouse striatum demonstrated that other antioxidants as alpha-tocopherol and beta-carotene protect from decrease of GSH (Young et al. 1986). Treatment with ascorbic acid has a beneficial effect and inhibits the binding of tritiated dopamine to striatal membranes following intoxication with MPTP (Heikkila et al. 1983) and attenuated <sup>3</sup>H-mazindol binding indicates on a loss of dopaminergic nerve terminals (Javitch et al. 1984). Sershen et al. (1985) suggest, that both



ascorbic acid and other antioxidants could have a beneficial effect in treatment in early stages of Parkinson's disease.

The aim of the work was to evaluate the effect of ascorbic acid on the dopamine level in the striatum and in the midbrain following intoxication with MPTP in mouse.

#### MATERIAL AND METHODS

C 57 black mice, 32 males (20–25 g) were used for the experiment. The animals were divided into 4 equal groups: 1 — norm; 2 — two i.p. injections of 100 mg/kg of ascorbic acid at 40 min intervals for 4 days; 3 — i.p. injection of 40 mg/kg of MPTP daily for 4 days; 4 — i.p. injection of 40 mg/kg of MPTP and 20 minutes before and 20 minutes after the intoxication with MPTP, injections of 100 mg/kg of ascorbic acid (single dose) for 4 days.

The mice were decapitated 24 hrs after the last injection. The striatum and the midbrain were rapidly dissected and stored at  $-17^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Dopamine was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with an electrochemical detector (Melamed et al. 1983). Statistical significance of differences of dopamine concentration ( $\mu\text{moles/g}$  wet tissue) was calculated according to Student's *t* test.

Table 1. Dopamine level after intoxication with MPTP and after treatment with ascorbic acid in mouse brain

Tabela 1. Poziom dopaminy w mózgu myszy po zatruciu MPTP i podaniu kwasu askorbinowego

Experimental group Grupa doświadczalna	Number of animals Liczba zwierząt	Dopamine (nmoles/g wet tissue) Dopamina (nmole/g św. tkanki)			
		striatum prążkowie $\bar{x} \pm \text{SEM}$ %		midbrain śródmózgowie $\bar{x} \pm \text{SEM}$ %	
Norm Norma	8	91.42±6.42	100	6.02±0.65	100
Ascorbic acid (2×100 mg/kg) Kwas askorbinowy (2×100 mg/kg)	8	90.85±5.37	94	6.25±0.51	103.8
MPTP (4×40 mg/kg)	8	10.27±1.05	11.2*	3.42±0.24	56.8*
MPTP (4×40 mg/kg) + ascorbic acid (4 days, 2×100 mg/kg)	8	27.82±1.85	30.4* <sup>o</sup>	3.85±0.32	63.9*
MPTP (4×40 mg/kg) + kwas askorbinowy (4 dni, 2×100 mg/kg)					

$\bar{x} \pm \text{SEM}$  — arithmetic means  $\pm$  standard error of the mean; średnia arytmetyczna  $\pm$  średni błąd średniej; \* — probability  $p \leq 0.05$  calculated to the norm by Student's *t* test; znamienność statystyczna  $p \leq 0,05$  obliczone wg testu *t* Studenta w stosunku do normy; <sup>o</sup> — probability  $p \leq 0.05$  calculated to the experimental group with MPTP by Student's *t* test; znamienność statystyczna  $p \leq 0,05$  obliczone wg testu *t* Studenta w stosunku do grupy z MPTP



## RESULTS

Table 1 illustrates dopamine concentration in the striatum and in the midbrain after MPTP intoxication and after treatment with ascorbic acid.

The dopamine level was about 15 times higher in the striatum of intoxicated animals than in the midbrain in the control ones (norm). No significant difference was noted after injection of ascorbic acid only. Four old i.p. administration of MPTP decreased significantly dopamine concentration in the striatum to 11.2% and in the midbrain to 56.8% of the control values. In the experimental group of animals intoxicated with MPTP and treated with ascorbic acid, the dopamine level dropped to 30.4% in the striatum and to 63.9% in the midbrain as compared with the norm. As the result of treatment with ascorbic acid a 19.2% increase of dopamine in the striatum was confirmed and only an insignificant 7.1% one was noted in the midbrain.

## DISCUSSION

Our results showed a high decrease of dopamine level in the striatum (88.8%) and in the midbrain (43.2%) after intoxication with MPTP for 4 days. Corsini et al. (1985) observed a 70% drop of dopamine level 7 days after 2 doses of 30 mg/kg of MPTP — injected at 12-hrs interval. Our data presented in this paper seem to be almost similar to the results obtained by Jonsson et al. (1985). These authors observed a 92% depletion of dopamine in the mouse striatum and 45% in the midbrain. The different percentage of dopamine decrease between different structures of the nigrostriatal pathway may depend on the selective sensitivity to MPTP or another phenomenon can be taken under discussion (Hallman et al. 1984; Heikkila et al. 1984). In the humans intoxicated with MPTP destruction of the neurons connected with the A 9 tract is very common. Selective binding of  $MPP^+$  by dopaminergic synapses, which are very numerous, especially in the putamen, and metabolic changes after the poisoning may play an important role in the different decrease of the dopamine level in the striatum and in the midbrain (Javitch et al. 1984). The above mentioned hypothesis of selective binding of  $MPP^+$  seems to be confirmed by the finding of very rapid decrease of dopamine directly after intoxication and step-wise return to the norm with concomitant diminished deposition of  $MPP^+$  in dopaminergic synapses (Jonsson et al. 1985). It has been postulated, that differences of dopamine concentration in the striatum and in substantia nigra can be explained by a different toxic effect of MPTP on tyrosine hydroxylase, the enzyme synthesizing dopamine in different structures of the brain (Schneider, Markham 1986). Experimental studies on the toxic effect of MPTP on the respiratory



activity of isolated neurons demonstrated higher sensitivity of the neurons in the striatum than in the zona compacta of substantia nigra (Śmiałek et al. 1987). In earlier experimental work Ramsey et al. (1986) suggested that metabolic disturbances in the respiratory chain can be mainly dependent on formation of free radicals by MPP<sup>+</sup>.

In our experiment a beneficial effect of ascorbic acid and a 19.2% increase of dopamine concentration were noted in the striatum as compared with the group of animals intoxicated with MPTP only. The antioxidant — ascorbic acid — can give appreciable protection by inhibition of MPP<sup>+</sup> formation and its uptake into dopaminergic nerve terminals. Sershen et al. (1985) noted, that two injections of MPTP produced a reduction by 50% in <sup>3</sup>H-mazindol binding, and treatment with ascorbic acid attenuated the effect of MPTP appreciably to only 30%. The authors suggested, that treatment of individuals in early stages of the parkinsonian syndrome with ascorbic acid could have a beneficial effect. However, in parkinsonians a permanent progress of neurological symptoms was observed without treatment, and after intoxication with MPTP the extrapyramidal signs diminished very slowly, the protective effect of ascorbic acid on dopaminergic sites in the cell membranes and the observed increase of dopamine level in the striatum seem to favour the introduction of antioxidants on treatment of parkinsonism at the beginning of the disease.

#### CONCLUSIONS

1. A different effect of ascorbic acid on the dopamine level was observed in different structures of the nigrostriatal pathway in the mouse after intoxication with MPTP.

2. Ascorbic acid attenuated the effect of MPTP on the dopamine pool in the mouse striatum.

#### WPLYW KWASU ASKORBINOWEGO NA POZIOM DOPAMINY W MÓZGOWIU MYSZY W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA 1-METYLO-4-FENYLO-1, 2,3,6-CZTEROHYDROPIRYDYNA (MPTP)

#### Streszczenie

U myszy CB-57 po podaniu MPTP w dawce 40 mg/kg przez cztery kolejne dni obserwowano spadek poziomu dopaminy w prążkowie około 88,8%, a w śródmózgowiu o 43,2%. Dodatkowe dwukrotne podanie kwasu askorbinowego po 100 mg/kg 20 minut przed i 20 minut po iniekcji MPTP w ciągu 4 dni wykazało w prążkowie przyrost stężenia dopaminy do 69,6% wartości kontrolnej. Przyrost dopaminy w śródmózgowiu w tych warunkach był statystycznie nieznamienisty. Przedyskutowano wpływ antyoksydacyjnego działania kwasu askorbinowego w przemianach MPTP.



ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА  
В МОЗГУ МЫШЕЙ, ОТРАВЛИВАЕМЫХ  
1-МЕТИЛО-4-ФЕНИЛО-1,2,3,6-ЧЕТЫРЕГИДРОПИРИДИНОЙ  
(МРТР)

Резюме

У мышей СВ-57 после подачи в течение 4 очередных дней 40 mg/kg МРТР наблюдалось понижение уровня дофамина в полосатом теле о приблизительно 88,8%, а в среднем мозгу о 43,2%. Добавочная двухкратная подача 100 mg/kg аскорбиновой кислоты в 20 минут перед и в 20 минут после инъекции МРТР повторяемой в течение 4 дней, показала увеличение концентрации дофамина в полосатом теле до 69,6% контрольной величины. Нарастание дофамина в среднем мозгу было в этих условиях статистически несущественно. Обсуждается влияние антиоксидативного действия аскорбиновой кислоты в метаболизме МРТР.

REFERENCES

1. Ballard P. A., Tetrad J. W., Langston J. W.: Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, 1985, 35, 949—956.
2. Chiba K., Trevor A., Castagnoli N. Jr.: Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1984, 120, 574—578.
3. Chuieh C. C., Burns R. S., Markey S. P., Jacobovitz D. M., Kopin I. J.: Primate model of parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in Rhesus monkeys. *Life Sci.*, 1985, 36, 213—218.
4. Corsini G. U., Pintus S., Chiueh Ch. C., Weiss I. F., Kopin I. J.: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethyldithiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.*, 1985, 119, 127—128.
5. Hallman H., Olson L., Jonsson G.: Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 1984, 224, 1451—1453.
6. Heikkila R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 1984, 311, 467—469.
7. Heikkila R. E., Manzino L., Cabbot F. S., Hanley J. G.: Ascorbic acid neuropathology and the binding of DA agonists to neostriatal protection. *Neuropharmacol.*, 1983, 22, 135—137.
8. Javitch M. A., Blaustein K. O., Snyder S. H.: H-mazindol binding associated with neuronal dopamine and norepinephrine uptake sites. *Mol. Pharmacol.*, 1984, 26, 35—44.
9. Jonsson G., Sundstrom E., Mefford I., Olson L., Johnson S., Freedman R., Hoffer B.: Electrophysiological and neurochemical correlates of the neurotoxic effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. *Naunyn, Schmiedelberg's Arch. Pharmacol.*, 1985, 331, 1—6.
10. Melamed E., Durst R., Frucht Y., Globus M.: Differential effect of acute and chronic haloperidol administration on dopamine: turnover in rat nigrostriatal and retinal dopaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 1983, 89, 279—289.
11. Perry T. L., Godin D. V., Hansen S.: Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.*, 1982, 33, 305—310.



12. Ramsey R. R., Salach J. I., Singer T. P.: Uptake of neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD<sup>+</sup>-linked substrates by MPP<sup>+</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1986, 134, 743—748.
13. Schneider J. S., Markham C. H.: Neurotoxic effect of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the cat. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res.*, 1986, 373, 258—267.
14. Sershen H., Reith M. E. A., Hasim A., Lajtha A.: Protection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity by the antioxidant ascorbic acid. *Neuropharmacology*, 1985, 24, 1257—1259.
15. Sinha B. K., Singh Y., Krishna G.: Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion MPP<sup>+</sup>. Reductive activation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1986, 135, 583—588.
16. Smialek M., Kosicka B., Bugera-Piecuch T. E.: Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the respiratory activity of dopaminergic neurons in the mouse brain, *Neuropat. Pol.*, 1987 (in press).
17. Yong V. W., Perry T. L., Krisman A. A.: Depletion of glutathione in brain stem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is prevented by antioxidant pretreatment. *Neurosci. Lett.*, 1986, 63, 56—60.

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



MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK, BARBARA KOSICKA, TERESA E. BUGERA-PIECUCH

EFFECT OF 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE  
(MPTP) ON THE RESPIRATORY ACTIVITY OF DOPAMINERGIC  
NEURONS IN THE MOUSE BRAIN

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

It has recently been reported, that MPTP, a substance with hallucinogenic properties produces a Parkinson-like syndrome (Ballard et al. 1985; Schneider et al. 1986). After intoxication with MPTP specific destruction was observed of some dopamine-containing neurons in the nigrostriatal pathway in primates (Burns et al. 1983), and in mice (Hallman et al. 1984; Heikkila et al. 1984), and according to dose MPTP caused the parkinsonian syndrome in humans (Davis et al. 1979; Langston et al. 1984). In experimental studies on the neurotoxicity of MPTP and its analogues a high reduction of neuronal cells in the region of the pars compacta of the substantia nigra was found, similar to the neuropathological findings in Parkinson's disease (Heikkila et al. 1984; Wilkening et al. 1986; Youngster et al. 1986). A marked decrease of the dopamine level was noted too in the striatum and in the substantia nigra in the mouse (Johnsson et al. 1985) and depletion in  $^3\text{H}$ -dopamine binding in some regions of the mouse brain (Sershen et al. 1984). After intoxication with MPTP the caudate nucleus and the substantia nigra showed a greater depletion of tyrosine hydroxylase (TH) than the nucleus accumbens (Schneider, Markham 1986).

The pathomechanism of MPTP-induced neurotoxicity has been explained by formation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridine (MPDP) and ultimately the pyridinium cation ( $\text{MPP}^+$ ) in the reaction catalysed by monoamine oxidase B (MAO B) under aerobic conditions (Chiba et al. 1984). Sinha et al. (1986) suggested, that the toxic effect of MPTP depended mainly on transport, binding and accumulation of pyridinium ions in the synaptic endings as well as production of free radical intermediates —  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\cdot\text{OH}$ . Experimental studies showed too, that  $\text{MPP}^+$  caused a decrease of respiratory activity of isolated mitochondria in the



reaction: pyruvate-NADH and glutamate-NADH (Nicklas et al. 1985). Furthermore, after intoxication with MPTP differences were noted in oxygen uptake in different structures of the CNS. On the basis of the foregoing observations it is postulated, that injury of the dopaminergic centers in the brain depends in its major part on the MPTP effect on aerobic metabolism of the respiratory chain (Schwartzman, Alexander 1985).

The aim of this work was to reveal the effect of intoxication with MPTP on the respiratory activity in isolated neurons from the striatum, substantia nigra and nucleus accumbens in the ascorbate-cytochrome c system in the mouse.

#### MATERIAL AND METHODS

Thirty six C-57 black mice 20—25 g were used for the experiment. The animals were divided into 3 groups: a) norm (6 animals), b) control (15 animals), intraperitoneal injection of 0.2 ml 0.9% NaCl for successive 4 days, and c) experimental group (15 animals), intraperitoneal injection of MPTP, 40 mg/kg in 0.2 ml of 0.9% NaCl. The animals were decapitated 1, 7, and 30 days after last MPTP dose and immediately sections were stained with 2 mM methylene blue in 0.25 M sucrose and single neurons were isolated from the pars compacta of the substantia nigra, striatum and nucleus accumbens.

Oxygen uptake in the exogenic ascorbate-cytochrome c system was determined in a Cartesian ampulla microdiver apparatus (Hydén, Pigoñ 1960). The results were expressed as  $O_2/\mu\text{l}/\text{h}/\text{neuron}$ . For statistical analysis Student's t test was applied.

#### RESULTS

The biochemical data for respiratory activity of the isolated neurons after intoxication with MPTP and in the controls are presented in Table 1.

The neurons from the pars compacta of the substantia nigra in the norm used  $12.48 \pm 1.32 \mu\text{l } O_2/\text{h}/\text{neuron}$ . In the control animals subjected to 4-fold injection with 0.9% NaCl no significant changes in oxygen uptake were noted in the neurons, both one day and 30 days after the intoxications.

MPTP intoxication evoked a 16.9% decrease of oxygen uptake in ascorbate-cytochrome c system in the neurons isolated from the pars compacta of the substantia nigra after one day and a significant drop of respiratory activity after 7 days (45.4%), and 50.2% after 30 days. The results of oxygen uptake by neurons isolated from the striatum of the control animals subjected to injection with 0.9% NaCl were found to approach the values of the norm. After administration of MPTP a significant decrease of respiratory activity was noted, 49% one day, 50.6%



7 days and 45.6% 30 days after the last injection. Almost similar results were obtained in the norm and in the control group with 0.9% NaCl in oxygen uptake by the neurons from the nucleus accumbens. All bio-  
bens. All biochemical results after intoxication with MPTP both one day (8.9%), 7 days (23.1%) and 30 days (19%) were insignificant.

Table 1. Oxygen uptake by isolated dopaminergic neurons in the ascorbate-cytochrome c system after MPTP intoxication in the mouse

Tabela 1. Zużycie tlenu przez izolowane neurony dopaminergiczne w obecności askorbinianu i cytochromu C po zatruciu myszy przez MPTP

Brain structure Struktura mózgu	Exp. group Grupa dośw.	Time after intoxication (days) Czas po zatruciu (dni)	nn	Oxygen uptake Zużycie tlenu $\mu\text{l O}_2 \times 10^3/\text{h}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$	% of control activity %aktywności kontroli
Substantia nigra — zona compacta	Norm Norma		10	12.48 ± 1.32	
	0.9% NaCl	1	10	13.11 ± 1.38	105.0
		7	10	11.85 ± 1.42	95.0
		30	9	12.02 ± 1.35	96.3
	MPTP	1	10	10.37 ± 1.42	83.1
		7	11	6.81 ± 0.75*	54.6
		30	8	6.22 ± 0.96*	49.8
Striatum	Norm Norma		10	18.05 ± 2.01	
	0.9% NaCl	1	9	18.25 ± 1.97	101.1
		7	11	17.92 ± 1.65	99.3
		30	10	18.24 ± 2.00	101.1
	MPTP	1	10	9.21 ± 1.10*	51.0
		7	8	8.92 ± 1.12*	49.4
		30	9	9.82 ± 1.21*	54.4
Nucleus accumbens	Norm Norma		10	20.15 ± 2.31	
	0.9% NaCl	1	8	20.85 ± 2.35	103.5
		7	8	19.98 ± 2.15	99.2
		30	9	20.32 ± 2.41	100.8
	MPTP	1	9	18.35 ± 2.10	91.1
		7	10	15.46 ± 1.87	76.9
		30	8	16.33 ± 1.94	81.0

$\bar{x} \pm \text{SEM}$  — arithmetic mean ± standard error of the mean — średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej n — number of neurons — liczba neuronów

\*  $p \leq 0.05$

#### DISCUSSION

On the basis of the present experimental study of the neurotoxic effect of MPTP, disturbances of electron transport by the respiratory chain appeared in some dopaminergic neurons. The results suggested a selective vulnerability of neurons from the pars compacta of the sub-



stantia nigra and from the striatum (nigrostriatal pathway) by MPTP as compared with mild changes in the neurons of the nucleus accumbens (mesolimbic pathway).

It has been postulated, that the neurotoxic effect of MPTP could be dependent on differences in  $MPP^+$  accumulation into the synaptic dopaminergic endings in different structures of the CNS. Javitch et al. (1984) demonstrated quantitative differences in the number of  $^3H$ -MPTP binding centers: the highest one in the caudate nucleus, lower in the substantia nigra and the lowest in the nucleus accumbens. The formation of  $MPP^+$  caused accumulation of NADH and lactates and then evoked acidosis and produced degeneration or destruction of the neurons (Vyas et al. 1986). In experimental work on MPTP neurotoxicity (20 mg/kg) reduction was shown in cell bodies in the region of the pars compacta of the substantia nigra approximately by 95% (Wilkening et al. 1986). Some authors tried to explain the injury of the neurons by pyridinium cations  $MPP^+$  and then by hydrogen peroxide and other free radicals formation, which inhibited oxygen utilization by the respiratory chain (Poirier, Barbeau 1985; Yong et al. 1986). Further experiment showed, that reduced glutathione (GSH) detoxified these metabolites in the substantia nigra and could be used in prevention and treatment of the Parkinson-like syndromes after intoxication with MPTP. It was demonstrated, that in Parkinson's disease in humans the GSH level was decreased (Perry et al. 1982). Another antioxidant — ascorbic acid attenuated in about 19.21% the toxic effect of MPTP on dopaminergic synaptic endings in the striatum in mice (Sershen et al. 1985). It has been suggested, that antioxidants can inhibit both oxidation of MPTP and  $MPP^+$  axonal transport and binding in dopaminergic synapses. The present studies indicated different dynamics of the toxic effect following MPTP administration in different structures of nigrostriatal pathway, e.g. approximately a 50% decrease of oxygen uptake was noted on the first day after poisoning in the striatum and only after 7 days an almost similar effect was observed in neurons from the pars compacta of the substantia nigra. It seems that different phenomena could be taken into account in connection with the toxicity of MPTP, e.g., quantitative changes in MPTP binding, differences in axonal transport as well differences in glucose consumption by the neurons from the pars compacta of the substantia nigra and from the striatum in normal conditions. The data presented in Table 1 indicate lower oxygen uptake by the neurons isolated from the substantia nigra than from the striatum. It has been postulated, that neurons with lower oxygen metabolism are less sensitive to a decrease of the respiratory chain activity and sometimes can show a hypercompensative increase of oxygen uptake in hypoxia (Smialek 1979). This opinion seems to be confirmed by observation of Schwartzman and Alexander (1985), who observed a decrease of tritiated glucose in the striatum and its increase in the substantia nigra after 4-fold administration of 0.5 mg/kg MPTP. The



above results are different from our data shown in the present paper. Oxygen uptake decreased after intoxication with MPTP both in the neurons from the striatum and from the substantia nigra. Only a retardation of the above reaction was noted in neurons isolated from the pars compacta of the substantia nigra. The differences may have depended on species differences, on doses, and on selective vulnerability of different neurons to MPTP (Chiueh et al. 1985).

### CONCLUSIONS

1. MPTP inhibits respiratory activity in dopaminergic nigrostriatal neurons in the ascorbate-cytochrome c system.
2. A different dynamics of MPTP toxicity to the ascorbate-cytochrome c system appears in the neurons from the striatum and from the pars compacta of the substantia nigra.

### OCENA DZIAŁANIA 1-METYLO-4-FENYLO-1,2,3,6-CZTEROHYDROPIRYDINY (MPTP) NA AKTYWNOŚĆ ODDECHOWĄ NEURONÓW DOPAMINERGICZNYCH W MÓZGOWIU MYSZY

#### Streszczenie

Do doświadczenia użyto myszy CB 57, samce. Zwierzętom podawano dootrzewnowo przez cztery kolejne dni MPTP w dawce 40 mg/kg masy ciała. Po 1, 7 i 30 dniach po podaniu ostatniej dawki MPTP myszy dekapitowano i izolowano pojedyncze neurony z warstwy zbitej istoty czarnej, prążkowiec i jądra półleżącego przegrody przezroczystej mózgu. Badanie aktywności końcowego etapu łańcucha oddechowego w układzie zawierającym egzogeny askorbinian i cytochrom c przeprowadzono w aparacie z ampułkowym mikronurkiem Kartezjusza. Zaobserwowano znamienne statystycznie spadki zużycia tlenu przez neurony izolowane z prążkowiec między 1 a 30 dniem po ostatniej iniekcji MPTP, a neuronów warstwy zbitej — siódmego i trzydziestego dnia. Nie stwierdzono istotnych zmian w neuronach z jądra półleżącego przegrody przezroczystej.

Uzyskane wyniki wskazują na wybiórcze hamowanie aktywności oddechowej izolowanych neuronów szlaku nigrostriatalnego w układzie askorbinian-cytochrom c.

### ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 1-МЕТИЛО-4-ФЕНИЛО-1,2,3,6-ЧЕТЫРЕГИДРОПИРИДИНЫ (МРТР) НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДОФАМИНЕРЧЕСКИХ НЕВРОНОВ В МОЗГУ МЫШЕЙ

#### Резюме

В эксперименте были употреблены мыши СВ 57, самцы. В течение 4 очередных дней животным подавался интраперитонеально МРТР в дозе 40 мг/кг, массы тела. После 1, 7 и 30 дней после последней дозы МРТР производилась декапитация и из мозга были изолированы отдельные нейроны из компактного слоя черного вещества, полосатого тела и *n. accumbens*. Исследование активности конечного этапа дыхательной цепи в системе, содержащей экзогенный аскорбинан и цитохром с было проведено в аппарате с ампуловым микронурком Картезия. Употребление кислорода нейронами изолированными из полоса-



того тела между 1 а 30 днем после последнего введения МРTP, было статистически существенно пониженное по сравнению с нейронами компактного слоя черного вещества, изолированными в 7 и 30 дне. В нейронах *n. accumbens* не обнаружено существенных изменений.

Обнаружено селективное торможение дыхательной активности изолированных нейронов nigrostriальной системы в среде, содержащей аскорбиниян-цитохром с.

## REFERENCES

1. Ballard P. A., Tetrad J. W., Langston J. W.: Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, 1985, 35, 949—956.
2. Burns R. C., Chiueh C. C., Markey S., Ebert M. H., Jacobovitz D. M., Kopin I. J.: A primate model of Parkinson's disease: Selective destruction of substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 4546—4550.
3. Chiba K., Trevor A., Castagnoli N. Jr.: Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 120, 574—578.
4. Chiueh C. C., Burns R. S., Markey S. P., Jacobovitz D. M., Kopin I. J.: Primate model of Parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in Rhesus monkeys. *Life Sci.* 1985, 36, 213—216.
5. Davis G. C., Williams A. C., Markey S. P., Ebert M. H., Caine E. D., Reichart C. M., Kopin I. J.: Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat. Res.*, 1979, 1, 249—254.
6. Hallman H., Olson L., Johnsson G.: Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 1984, 224, 1451—1453.
7. Heikkila R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 1984, 311, 467—469.
8. Hyden H., Pigon A.: A cytophysiological study of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cells of Deiter's nucleus. *J. Neurochem.*, 1960, 6, 57—72.
9. Javitch J. A., Uhl G. R., Snyder S. H.: Parkinsonism-inducing neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Characterization and localization of receptor binding sites in rat and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1984, 81, 4591—4595.
10. Johnsson G., Sundstrom E., Mefford I., Olson J., Johnsson S., Freedman R., Hoffer B.: Electrophysiological and neurochemical correlations of the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1985, 331, 1—6.
11. Langston J. W., Irwin I., Langston E. B., Forno L. S.: 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett.*, 1984, 48, 87—92.
12. Nicklas W., Vyas I., Heikkila R. E.: Metabolite of dopaminergic neurotoxin inhibits NADH-linked mitochondrial oxidation. *Fed. Proc.*, 1985, 44, 1250—1256.
13. Perry T. L., Godin D. V., Hansen S.: Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency. *Neurosci Lett.*, 1982, 33, 305—310.
14. Poirier J., Barbeau A.: A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 3, 1284—1289.



15. Schneider J. S., Markham C. H.: Neurotoxic effect of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the cat. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res.*, 1986, 373, 257—267.
16. Schneider J. S., Yuwiler A., Markham C. H.: Production of a Parkinson-like syndrome in the cat with N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Behaviour, histology, and biochemistry. *Exp. Neurol.*, 1986, 91, 293—307.
17. Schwartzman R. J., Alexander G. M.: Changes in the local cerebral metabolite rate for glucose in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), primate model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 1985, 358, 137—143.
18. Sershen H., Reith M. E. A., Hasim A., Lajtha A.: Reduction of dopamine uptake and cocaine binding in mouse striatum by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Eur. J. Pharmacol.*, 1984, 102, 175—178.
19. Sershen H., Reith M. E. A., Hasim A., Lajtha A.: Protection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity by the antioxidant ascorbic acid. *Neuropharmacology*, 1985, 24, 1257—1259.
20. Sinha B. K., Singh Y., Krishna G.: Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>). Reductive oxidation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Res. Commun.*, 1986, 135, 583—588.
21. Smiałek M.: Aktywność oddechowa izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego w następstwie zatrucia tlenkiem węgla, oceniana przy zastosowaniu metody ampułkowego mikronurka Kartzjusza. *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 611—622.
22. Vyas I., Heikkila R. E., Nicklas W. J.: Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.*, 1986, 46, 1501—1507.
23. Wilkening D., Vernier V. G., Arthaud L. E., Treacy G., Kenney J., Nickolson V. J., Clarck R., Smith D. H., Smith C., Boswell G.: A Parkinson-like neurologic deficit in primates is caused a novel 4-substituted piperidine. *Brain Res.*, 1986, 368, 239—246.
24. Yong V. W., Perry T. L., Krisman A. A.: Depletion of glutathione in brain stem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is prevented by antioxidant pretreatment. *Neurosci Lett.*, 1986, 63, 56—60.
25. Youngster S. K., Duvoisin R. C., Hess A., Sonsalla P. K., Kindt M. V., Heikkila R. E.: 1-methyl-4-(2-methylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'-CH<sub>3</sub>-MPTP) is a more potent dopaminergic neurotoxin than MPTP in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 1986, 122, 283—287.

Authors' address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, 3 Dworkowa Str., Warszawa.



JANUSZ SZYMAŚ, WIESŁAWA BICZYSKO, PRZEMYSŁAW GABRYEL

OBECNOŚĆ KWAŚNEGO WŁÓKNIENKOWEGO BIAŁKA GLEJOWEGO  
(GFAP) JAKO WYKŁADNIK RÓŻNICOWANIA KOMÓREK  
RDZENIAKA \*

Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej, Poznań

Ostatnie 20 lat badań rdzeniaka nie doprowadziło do ustalenia jednolitej opinii o składzie jego populacji komórkowej. Ranga tego zagadnienia wzrosła w ostatnich latach ze względu na wdrożenie w leczeniu pooperacyjnym tego nowotworu celowanej chemioterapii (Ward 1978; Cangir i wsp. 1984; Crafts i wsp. 1978; Bloom, Glees 1985). Określenie kierunku i stopnia różnicowania komórek nowotworowych jest również istotne w rokowaniu (Koppelson i wsp. 1983).

Coraz mniej autorów wyraża pogląd o mezodermalnym pochodzeniu rdzeniaka (Nishii 1929; Gullotta 1967; Kersting 1967). Również mięsak pajęczynówki (*sarcoma arachnoideale*), (Foerster, Gagel 1939) został przeklasyfikowany jako desmoplastyczna postać rdzeniaka (Soejima, Fukui 1973; Zülch 1979). Większość współczesnych badaczy opowiada się za neuroektodermalnym pochodzeniem rdzeniaka. Twórcami tej teorii są Bailey i Cushing (1925), a popierały ją badania Stevensona i Eschlina (1934), Kadina i wsp. (1970), Rubinsteina (1972, 1975), Rubinsteina i wsp. (1974). Wymienieni autorzy uważają, że nowotwór wywodzi się z komórek płodowej zewnętrznej warstwy ziarnistej mózdzku. Inni autorzy twierdzą, iż punktem wyjścia rdzeniaka są komórki *velum medullare posterius* (Raaf, Kernohan 1944) oraz komórki zwojowe wewnętrznej warstwy ziarnistej mózdzku (Zimmerman 1967). Istnieją też prace wskazujące na znaczne morfologiczne podobieństwo zewnętrznej warstwy ziarnistej mózgu szczura i rdzeniaka (Del Cerro, Snyder 1972).

Potwierdzenie, postulowanej od dawna (Bailey 1933), koncepcji dotyczącej kierunku różnicowania się komórek nowotworowych w rdzeniaku uzyskano dopiero na podstawie badań elektronowo-mikroskopowych. Początkowo znaczna część autorów wypowiada się jednoznacznie, iż rdzeniak zbudowany jest z prymitywnych komórek, bez cech różnicowania (Ishida

---

\* Praca wykonana w ramach Programu Rządowego PR-06.



i wsp. 1964; Zülch, Wechsler 1968; Matakas i wsp. 1970; Lyser 1975). O różnicowaniu się komórek nowotworowych w kierunku nerwowym donosili Escourolle i Poitier (1967), Rubinstein i wsp. (1974), Müller i Schaefer (1974), Ermer i Brucher (1974), Toga (1976), Camins i wsp. (1980), Moss (1983), a w kierunku glejowym Rubinstein i wsp. (1974), Müller i Schaefer (1974), Camins i wsp. (1980). Wprowadzenie techniki immunohistochemicznej (Sternberger i wsp. 1970) pozwoliło wykazać w rdzeniakach obecność białek swoistych dla ośrodkowego układu nerwowego. W ten sposób wielu autorów potwierdziło glejowe (Deck i wsp. 1978; Eng, Rubinstein 1978; Barnard, Pambakian 1980; Palmer i wsp. 1981; Pasquier i wsp. 1983; Mannoji i wsp. 1981, Roessmann i wsp. 1983; Kumanishi i wsp. 1985) i nerwowe (Roessmann i wsp. 1983) różnicowanie się komórek rdzeniaka. Z przytoczonych danych wynika, że coraz więcej autorów przychyliła się do koncepcji dwukierunkowego różnicowania się komórek w obrębie tego samego guza. Jednakże część autorów interpretuje dodatni wynik reakcji immunohistochemicznej z użyciem surowicy anti-GFAP wyłącznie jako wykazanie obecności odczynowych astrocytów wśród nacieku nowotworowego (Coffin i wsp. 1983; Goebel i wsp. 1983; Schindler, Gullotta 1983).

Celem przedstawionych w niniejszej pracy badań było określenie na dużej liczbie przypadków kierunku i częstości różnicowania się komórek rdzeniaka przy użyciu metody elektronowo-mikroskopowej i immunohistochemicznej.

#### MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem opracowania były rdzeniaki leczone operacyjnie u 84 pacjentów w Klinice Neurochirurgii Akademii Medycznej w Poznaniu w okresie od 1956 do 1980 r.

W mikroskopie świetlnym zbadano skrawki parafinowe z wszystkich 84 przypadków rdzeniaka barwione hematoksyliną i eozyną, kwaśną hematoksyliną fosforanowo-wolframową (PTAH), impregnowane metodą złotowo-sublimatową według Cajala w modyfikacji dla materiału zata pianego w parafinie oraz impregnowane według metody Gomoriego. Na seryjnych skrawkach wykonano odczyny immunohistochemiczne z użyciem kompleksu peroksydaza-antyperoksydaza (Sternberger i wsp. 1970) i surowicy przeciw kwaśnemu włókienkowemu białku glejowemu (GFAP), uzyskanej według metody opisanej uprzednio (Szymaś, Morkowski 1984).

W mikroskopie elektronowym zbadano 12 przypadków z tej grupy. Materiał tkankowy do badania elektronowo-mikroskopowego pobierano z kilku miejsc guza natychmiast po wyjęciu nowotworu z jamy czaszki w czasie zabiegu operacyjnego i utrwalano w roztworze Karnowskiego, niezależnie od reszty materiału operacyjnego. Pozostałą część przeznaczoną do badań w mikroskopie świetlnym utrwalano w 4% zbuforowanej formalinie.

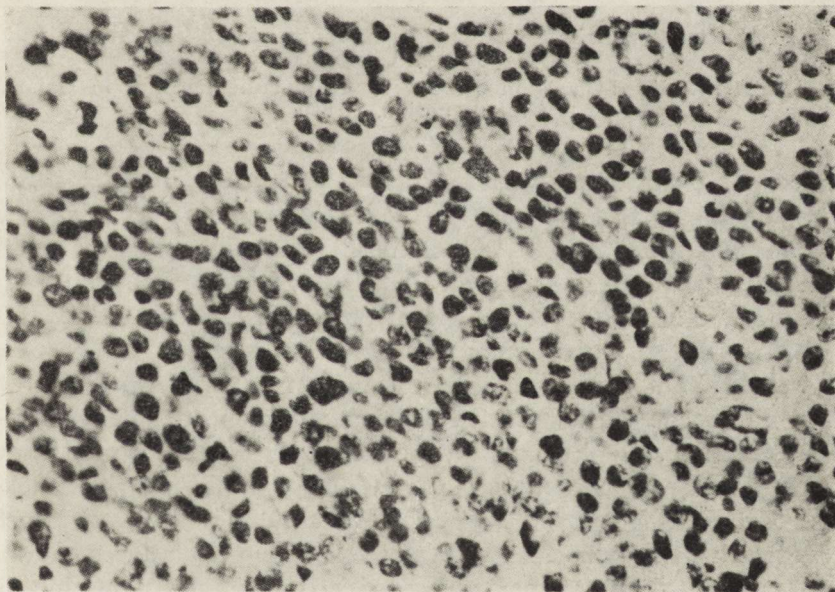


Materiał do badania elektronowo-mikroskopowego utrwalano dodatkowo w  $\text{OsO}_4$ , odwadniano i zatapiano w Eponie 812. Półcienkie i ultracienkie skrawki krojono na ultramikrotomie OmU<sub>3</sub>. Półcienkie skrawki barwiono błękitem toluidyny. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia elektronowo-mikroskopowe wykonano w mikroskopie JEM 7A i Opton 10A.

#### WYNIKI

W skrawkach barwionych hematoksyliną i eozyną stwierdzono rozległe obszary monotonnej populacji drobnych, anaplastycznych komórek, o okrągłym lub wydłużonym kształcie, nadbarwliwych jądrach i skąpym obrąbku cytoplazmy (ryc. 1). W części przypadków obecne były rozety Homera-Wrighta i układy rzekomorozetowe. Układy palisadowe stwierdzono tylko w 2 przypadkach. Komórki o owalnym i wydłużonym kształcie tworzyły widoczne zawirowania. W tych przypadkach w barwieniu PTAH stwierdzono obecność delikatnego, włóknkowego materiału trudnego do interpretacji (jednobiegunowa wypustka czy zrąb). W materiale barwionym tym sposobem stwierdzano ponadto liczne granatowe włókienka występujące w dużych komórkach o obfitej cytoplazmie i wydłużonych, wielokierunkowo przebiegających wypustkach.

W 10 przypadkach stwierdzono znaczny rozplem tkanki łącznej, manifestujący się obecnością ciasno upakowanych wrzecionowatych komórek

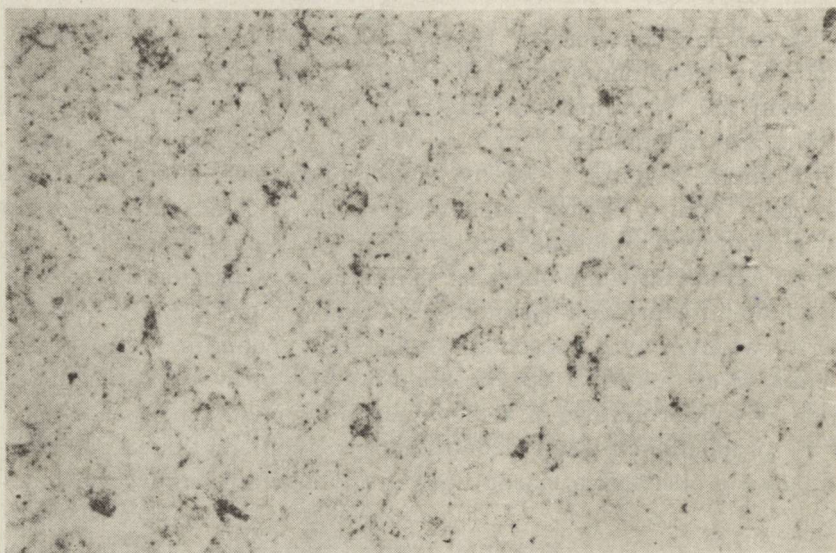


Ryc. 1. Monotonne utkanie rdzeniaka złożone z populacji drobnych, nieodróżnionych komórek. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 1. Homogeneous cellular pattern of medulloblastoma, composed of small and undifferentiated cells. H—E. × 400



i licznych włókien siateczki. W obszarach o takim utkaniu obecne były również wyspy mniej licznych komórek, pomiędzy którymi nie stwierdzono obecności włókien srebrochłonnych. Barwienie PTAH z reguły podkreślało rysunek tych wysp poprzez obecność pomiędzy nimi granatowo barwiących się włókien w cytoplazmie perykarionów i wypustek komórek o cechach odczynowych astrocytów. Tylko nieliczne komórki tego typu stwierdzano w obrębie samych wysp.



Ryc. 2. Skąpe strąty metaliczne w pojedynczych komórkach rdzeniaka w impregnacji sposobem Cajala. 600 ×

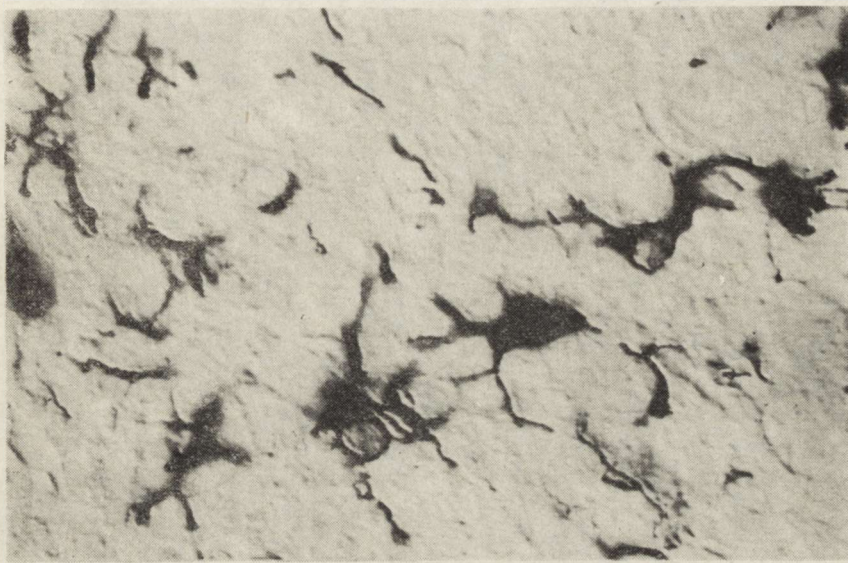
Fig. 2. Scarce metallic deposits in some cells of medulloblastoma in Cajal's gold impregnation. × 600

Impregnacja skrawków według metody Cajala uwidoczniła obfitą cytoplazmę i dobrze wykształcone liczne i długie wypustki odczynowych astrocytów. Drobne, anaplastyczne komórki rdzeniaka w zasadniczej masie nie impregnowały się. Tylko niekiedy spostrzegano pojedyncze drobne bezwypustkowe komórki o nieco liczniejszych ziarnistościach, odcinające się od homogennego tła (ryc. 2).

Reakcja immunohistochemiczna z użyciem surowicy przeciw GFAP uwidoczniła obecne we wszystkich badanych guzach duże komórki z licznymi wypustkami. Złogi produktów reakcji były obfite i skoncentrowane w części cytoplazmy, zasadniczo odpowiadając przebiegowi włókienek glejowych. Komórki tego typu występowały obficie w przylegających do guza częściach mózgowia oraz w brzeżnych obszarach utkania nowotworowego. Odpowiadały one odczynowym astrocytom (ryc. 3). Ich liczne wypustki zbiegały się wokół włosowatych naczyń krwionośnych. Takie astrocyty były mniej liczne w centralnych obszarach guza, obficie wy-



stępowały w otoczeniu wysp komórek rdzeniaka o wydatnej desmoplazji. W obszarach litych stwierdzano również złogi reakcji immunohistochemicznej. Zlokalizowane były one w obrębie wąskiego pasma cytoplazmy nielicznych komórek nowotworu, nie różniących się wielkością i kształtem od pozostałych (ryc. 4a, b). Komórki tego rodzaju były rozsiane w jed-



Ryc. 3. Reaktywne astrocycy w utkaniu rdzeniaka. Odczyn z surowicą anti-GFAP. Mikroskop polaryzacyjno-interferencyjny. Pow. 600 ×

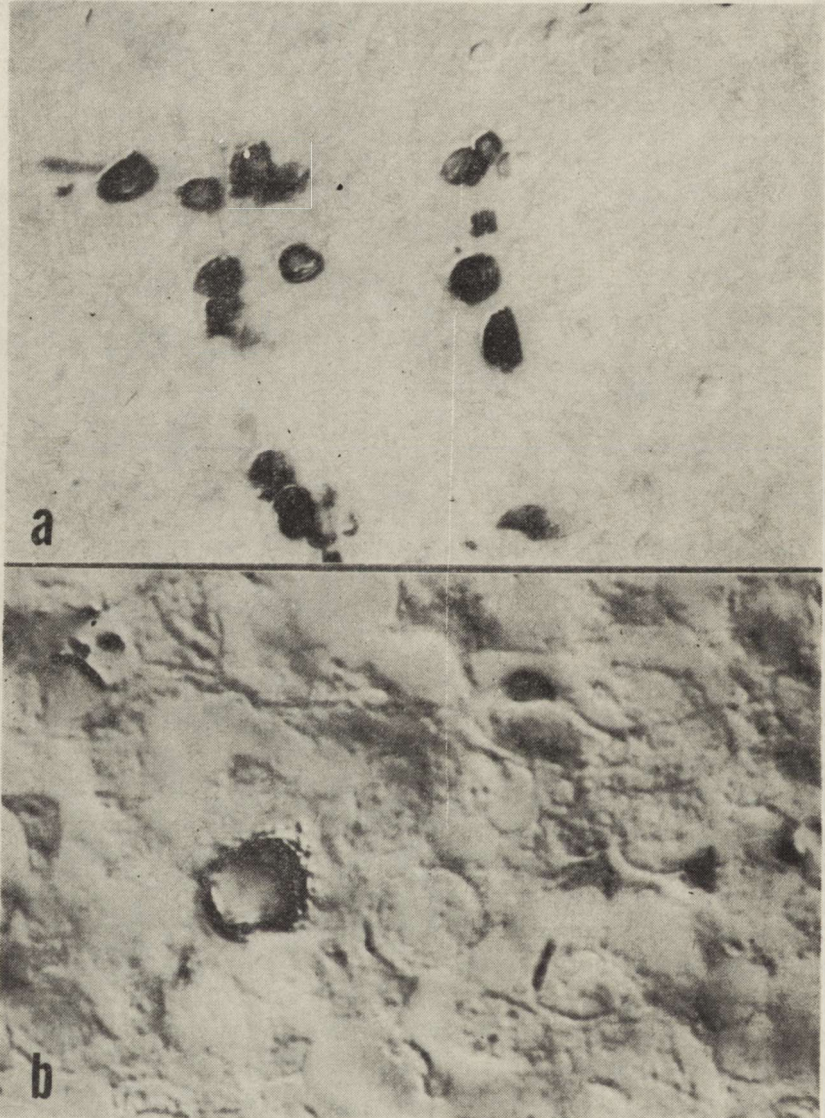
Fig. 3. Reactive astrocytes within medulloblastoma. Anti-GFAP reaction. Polarized-interphase microscopy. × 600

nakowym stopniu w całym guzie bez wyraźnego związku z przebiegiem naczyń. Brak też było różnic w ich występowaniu w centralnych i obwodowych częściach guza. Obrazy o takim typie odczynu z surowicą przeciw GFAP stwierdzono w 21 badanych guzach (25%). Częściej, bo w siedmiu na dziesięć badanych przypadków widywano GFAP-dodatnie komórki nowotworowe w desmoplastycznej postaci rdzeniaka.

W badaniu elektronowo-mikroskopowym rdzeniaków stwierdzono niejednorodny charakter komórek. Największą liczbowo populację stanowiły niskozróżnicowane komórki kształtu wydłużonego, z dużym jądrem i wąskim pasmem cytoplazmy (ryc. 5). Ich jądra różniły się zawartością heterochromatyny. Wszystkie wykazywały nieregularne zarysy, wrębiastą otoczkę wytwarzającą liczne wpuklenia i długie wypustki z przewężeniami i z mnogimi, nieregularnie rozmieszczonymi porami. Część jąder charakteryzowała się obecnością wąskiego pasa heterochromatyny, skupionej przy otoczce jądrowej i dużego jąderka. W drugim typie jąder stwierdzano znacznie większą zawartość heterochromatyny, rozproszonej po całym obszarze karioplazmy, bądź też skupiającej się pod otoczką.



Jądra te również zawierały duże jąderka. W obu typach jąder obserwowano różnego stopnia poszerzenia przestrzeni między blaszkami otoczki jądrowej. W niektórych komórkach z błon otoczki jądrowej formowały się figury mielinowe. Część komórek ulegała nieprawidłowemu podziałowi mitotycznemu. Wyrażało się to między innymi obecnością struktur cytoplazmy (kanały siateczki, mitochondria, lizosomy, figury mielinowe)

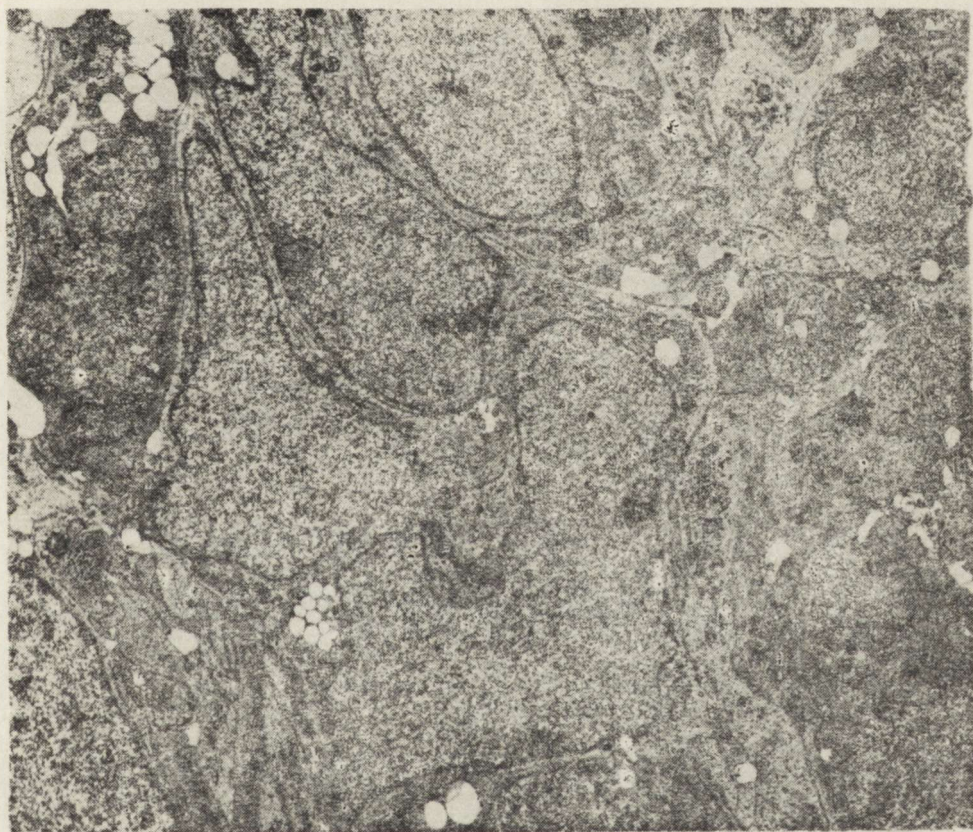


Ryc. 4. Komórki rdzeniaka zawierające złoże produktu reakcji immunohistochemicznej w obrębie wąskiego rąbka cytoplazmy. Odczyn z surowicą anti-GFAP. a. Pow. 600  $\times$ , b. Pow. 1000  $\times$

Fig. 4. Medulloblastoma cells containing deposits of the product of immunohistochemical reaction with anti-GFAP serum. a.  $\times 600$ , b.  $\times 1000$



w obszarze karioplazmy przy zrekonstruowanej częściowo otoczce jądrowej. Cytoplazma w obu rodzajach komórek stanowiła wąskie pasmo zawierające liczne polirybosomy, pojedyncze kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i mitochondria, aparat Golgiego, centriole i krople lipidów. Część komórek posiadała krótkie wypustki. W cytoplazmie wypustek znajdowały się polirybosomy i mitochondria. W niektórych komórkach krople lipidowe zajmowały znaczną część cytoplazmy. Mitochondria miały zagęszczoną macierz, długie grzebienie i wąską przestrzeń międzygrzebieniową. Część niskozróżnicowanych komórek wykazywała cechy zwyrodnienia; wyrażało się to spęcznieniem mitochondriów, poszerzeniem kanałów siateczki, pojawieniem się figur mielinowych uformowanych z błon siateczki śródplazmatycznej i kondensacją chromatyny jąder. W końcowej fazie dochodziło do rozpadu komórek.



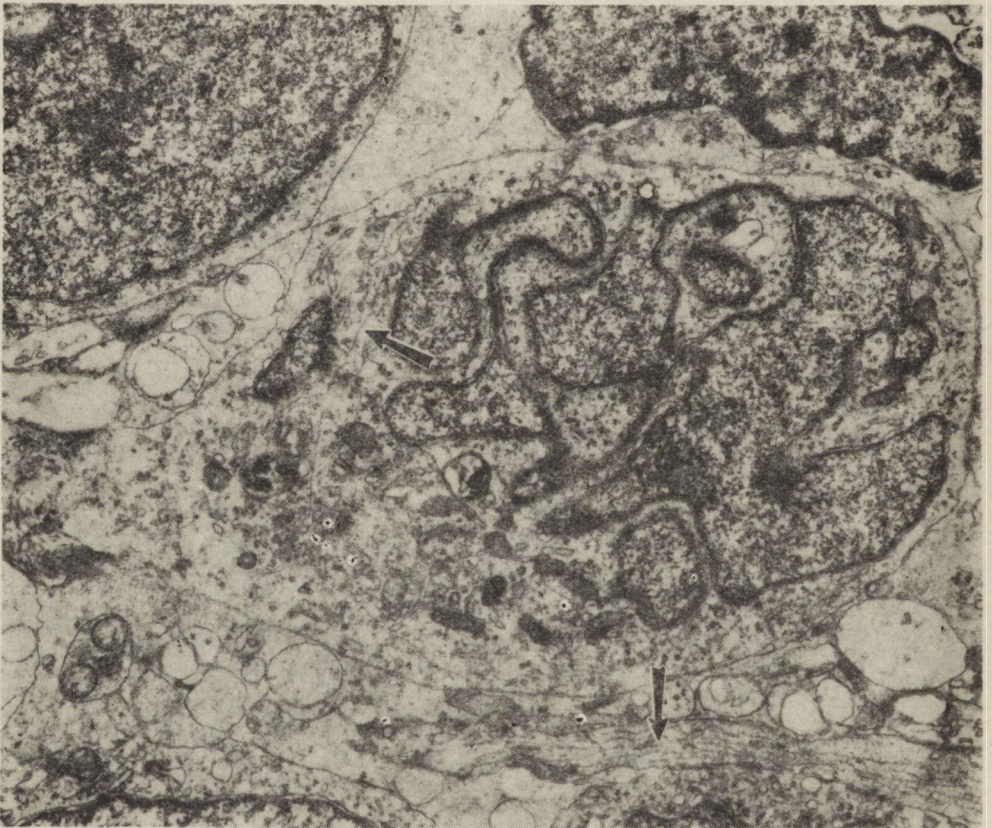
Ryc. 5. Fragment rdzeniaka zbudowanego z nie zróżnicowanych komórek. Wąskie rąbek cytoplazmy zawiera liczne polirybosomy, skąpo rozbudowany aparat Golgiego oraz nieliczne mitochondria. ME. Pow. 4.800  $\times$

Fig. 5. Fragment of medulloblastoma consisting of undifferentiated cells. Narrow rim of cytoplasm contains numerous polyribosomes, scarce Golgi complex and non numerous mitochondria. EM.  $\times$  4800



W utkaniu nowotworów znajdowano ponadto pola komórek o cechach różnicowania się zarówno w kierunku spongioblastów, jak i neuroblastów. W polach komórek o zróżnicowaniu neuroblastycznym nierzadko występowały układy rozetowe, w których ciała komórek leżały obwodowo, a ich wypustki zajmowały położenie centralne. W cytoplazmie i w wypustkach tych komórek widoczne były liczne neurotubule. Przy ich dużym nagromadzeniu wypustki komórkowe upodabniały się do dendrytów (ryc. 6). Dalszym wykładnikiem różnicowania się komórek w kierunku neuroblastów były pęcherzyki o średnicy 80—100 nm z elektronooptycznie gęstą zawartością, odpowiadające obrazowi pęcherzyków synaptycznych (ryc. 7) oraz formowanie kolbkowatych zakończeń przypominających połączenia synaptyczne.

W cytoplazmie okołojądrowej komórek różnicujących się w kierunku spongioblastycznym obecne były liczne kanały ziarnistej siateczki śród-



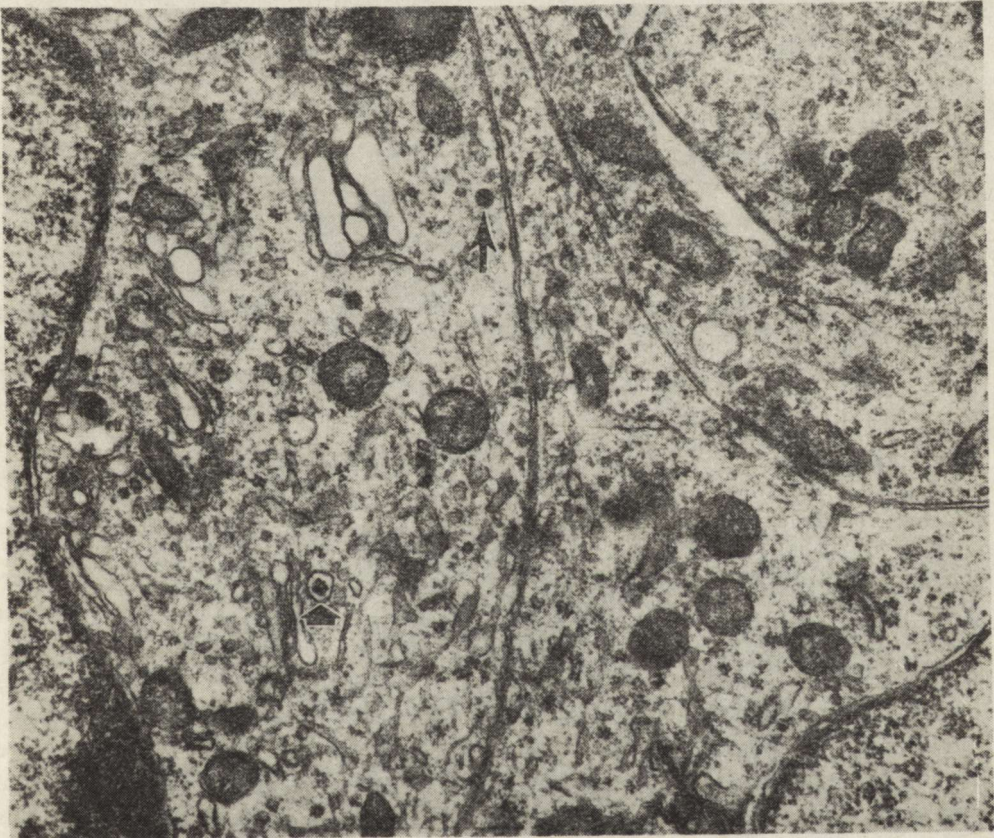
Ryc. 6. Fragment rdzeniaka z komórkami zróżnicowanymi w kierunku neuroblastycznym. Komórka z jednobiegunową wypustką z obecnością neurotubul zarówno w cytoplazmie perykarionalnej i wypustkowej (strzałki). ME. Pow. 12.800 ×

Fig. 6. Fragment of medulloblastoma with cells differentiating into neuroblastic direction. A cell with unipolar process, containing neurotubules in both perikaryal and process cytoplasm (arrows). EM. × 12 800



plazmatycznej, mitochondria, aparat Golgiego, a przede wszystkim delikatne filamenty o średnicy 10 nm (ryc. 8). Tego typu filamenty oraz ziarnistości glikogenowe stwierdzono również w wypustkach komórek różnicujących się w kierunku spongioblastów. W nielicznych komórkach tej linii obecny był intensywnie osmofilny materiał powstający z kondensacji filamentów. Wypustki komórek różnicujących się w kierunku spongioblastów występowały w tych samych polach, w których nagromadzone były wypustki zawierające neurotubule.

W obu rodzajach utkania znajdowano złącza międzykomórkowe typu *zonulae adherentes*. Przestrzenie międzykomórkowe były przeważnie szerokie, w niektórych okolicach komórki ściśle przylegały do siebie. W obszarach okołonaczyniowych i w naciekach guza w obrębie opon, były obecne również włókna kolagenowe, proteoglikany podścieliska, fibroblasty, a bezpośrednio w sąsiedztwie naczyń włosowatych wyciągnięte



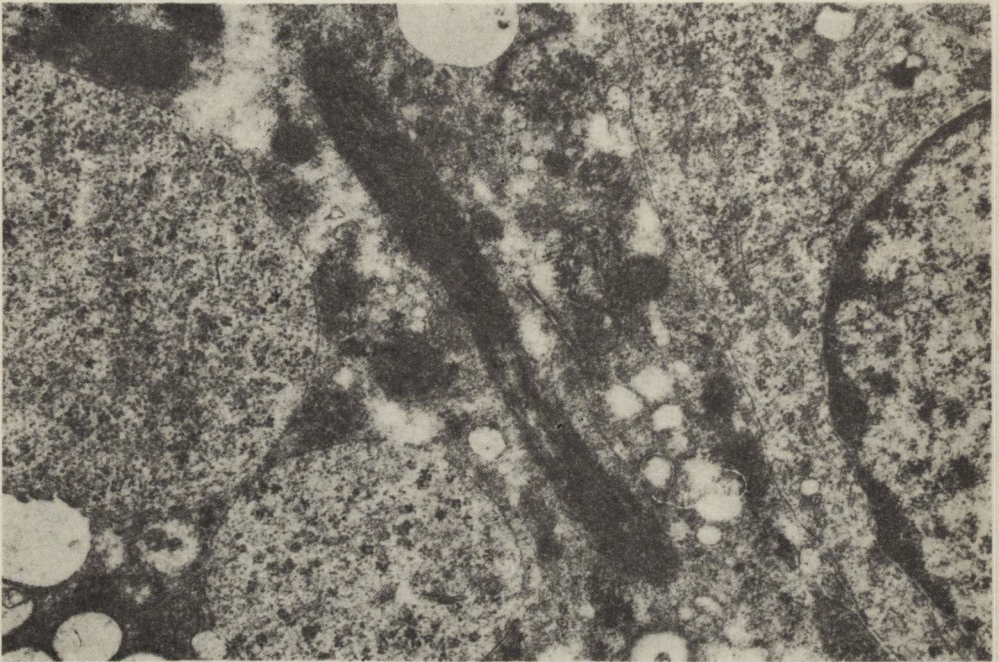
Ryc. 7. Fragment rdzeniaka o zróżnicowaniu neuroblastycznym. Cytoplazma przyległych do siebie komórek zawiera pęcherzyki synaptyczne oraz neurotubule (strzałki). ME. Pow. 36.000 ×

Fig. 7. Fragment of medulloblastoma with neuroblastic differentiation. Cytoplasm of cells containing synaptic vesicles (arrows) and neurotubules (arrows). EM. × 36 000



krwinki i włókniak. Obszary takie były szczególnie rozległe w utkaniu desmoplastycznych rdzeniaków.

Pola komórek o cechach różnicowania się zarówno w kierunku spongioblastów jak i neuroblastów występowały w 5 przypadkach. W 2 przypadkach stwierdzono jedynie wykładniki różnicowania w kierunku neuroblastycznym. W 5 guzach obecne były tylko prymitywne komórki.



*Ryc. 8.* Fragment rdzeniaka o zróżnicowaniu glejowym. Jądra komórek o nieregularnych obrysach. Cytoplazma okołojądrowa zawiera liczne pęczki filamentów o średnicy 10 nm, liczne kanały ergastoplazmy i liczne mitochondria. Pow. 28.000 ×

*Fig. 8.* Fragment of medulloblastoma with glial differentiation. Irregularly outlined nuclei. Perinuclear cytoplasm containing numerous bundles of 10 nm filaments, numerous channels of endoplasmic reticulum and numerous mitochondria. × 28 000

#### OMÓWIENIE

Bailey i Cushing (1925) przy użyciu złotowo-sublimatowej impregnacji według Cajala uwidocznili w utkaniu rdzeniaka typowe astrocyty. Charakter tych komórek (astrocyty nowotworowe czy odczynowe) nie został jednak wyjaśniony, z braku odpowiednich metod pozwalających na ich różnicowanie. Również barwienie PTAH uwidaczniające materiał włókienkowy w obszarach o glejowym zróżnicowaniu (Rubinstein 1972) nie daje podstaw do takiego rozróżniania tych astrocytów.

Wprowadzenie metod immunohistochemicznych z użyciem surowicy anti-GFAP do badań guzów mózgu pozwoliło oczekiwać interesujących wyników. Jednak już w pierwszych pracach zaznaczyła się rozbieżność wyników uzyskanych przez poszczególnych autorów (Van der Meulen



i wsp. 1978; Delphe i wsp. 1978; Eng, Rubinstein 1978; Velasco i wsp. 1980). Dopiero prace oparte na reprezentatywnej liczbie przypadków dowiodły, że 25 do 60% komórek rdzeniaka wykazuje dodatnią reakcję immunohistochemiczną z surowicą przeciw GFAP (Palmer i wsp. 1981; Mannoji i wsp. 1981; Merkel i wsp. 1982; Roessmann i wsp. 1983; Kumanishi i wsp. 1985).

Uzyskane przez nas wyniki wykazujące 25% GFAP-dodatnich rdzeniaków potwierdzają te dane. Istotne wydaje się przy tym spostrzeżenie, że GFAP-dodatnie komórki były równomiernie rozproszone w całym guzie. Podobne obserwacje poczynili Mannoji i wsp. (1981). Fakt ten wydaje się o tyle ważny, ponieważ wskazuje, iż drobny fragment rdzeniaka może być pod tym względem reprezentatywny dla całości guza. Spostrzeżenie to jest zasadnicze również dla odróżnienia GFAP-dodatnich komórek rdzeniaka od odczynowych astrocytów. Te ostatnie dawały się z reguły łatwo identyfikować na podstawie cech morfologicznych, uchwytanych już zresztą w seryjnych skrawkach barwionych metodą PTAH i impregnowanych według Cajala.

W badaniu mikroskopowo-elektronowym najliczniejsze były prymitywne komórki bez morfologicznych cech zróżnicowania. Jednak w znacznej części guzów uzyskano obrazy świadczące o różnicowaniu się komórek nowotworowych w kierunku bądź spongioblasta bądź też neuroblasta. Wykładnikami świadczącymi o różnicowaniu się komórek w kierunku neuroblastycznym były: występowanie w cytoplazmie i wypustkach neurotubul i pęcherzyków synaptycznych, formowanie pojedynczych kolbkowatych zakończeń przypominających połączenia synaptyczne, rozetkowy układ komórek z centralnym umiejscowieniem ich wypustek zawierających neurotubule. Komórki te przypominające morfologicznie płodowe neurony, opisali w rdzeniakach uprzednio inni autorzy (Soejima 1970; Roy 1977; Moss 1983).

Cechami pozwalającymi na ustalenie różnicowania komórek nowotworowych w kierunku spongioblastycznym były: odmienny wygląd jądra oraz obecność w cytoplazmie i wypustkach licznych pęczków włókienek pośrednich. Obrazy te odpowiadają typowi drugiemu komórek rdzeniaka opisanych przez Moss (1983). Występowanie wypustek w komórkach rdzeniaka jest dobrze udokumentowane (Soejima 1970; Roy 1977; Camins i wsp. 1980). Wypustki te wykazują wyraźnie dwojaki charakter. Wiele wypustek zawierających obfity materiał włókienkowy wykazywało łączność z komórkami o zróżnicowaniu spongioblastycznym. Przemawiało to również za ich nowotworowym, a nie odczynowym pochodzeniem.

Wykładniki różnicowania się komórek rdzeniaka spostrzegano w badaniach immunohistochemicznych i elektronowo-mikroskopowych również w obrębie mas guza naciekających przestrzeń podpajęczynówkową. Wyklucza to obecność domieszki wysokozróżnicowanych struktur neuroektodermalnych mózgu, przetrwałych w obrębie nacieku nowotworowego.



Tak więc dwukierunkowe różnicowanie się komórek rdzeniaka jest bezsporne. Należy jednak pamiętać o ograniczeniu każdej ze stosowanych metod. Do badania elektronowo-mikroskopowego można pobrać tylko niewielki fragment tkanki, nie zawsze reprezentatywny, w którym mogą być nieobecne rozproszone formy komórek bardziej zróżnicowanych. Metoda immunohistochemiczna oparta na badaniu skrawków utrwalonych w formalinie bez wątplenia obarczona jest błędem fałszywie ujemnych wyników. W porównawczych badaniach materiału mrożeniowego i parafinowego mózgu myszy wykazano bowiem (Szymaś 1986), iż formalina powoduje destrukcję antygenowości GFAP.

Nie bez znaczenia pozostaje też wiele szczegółów związanych z utrwalaniem i przeprowadzaniem materiału tkankowego. Może to też tłumaczyć, dlaczego niektórym autorom (Goebel i wsp. 1983; Coffin i wsp. 1983; Schindler, Gullotta 1983) nie udało się uzyskać dodatniego odczynu z surowicą anti-GFAP w obrębie komórek rdzeniaka.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się niezbędne zastosowanie dla diagnostyki rdzeniaka, w miarę możliwości, wszystkich dostępnych technik badawczych materiału tkankowego. Mogą one też stanowić przesłankę do wnioskowania o cytogenezie i biologii rdzeniaka. Dane te nakazują też indywidualne rozważenie wskazań i ocenę wyników następnego, względem zabiegu operacyjnego, leczenia.

#### THE PRESENCE OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP) AS AN EXPONENT OF DIFFERENTIATION OF MEDULLOBLASTOMA CELLS

##### Summary

Eighty four cases of medulloblastoma were examined immunohistochemically with anti-GFAP serum, twelve cases were examined with electron microscope to determine the differentiation of tumor cells. Glial differentiation of medulloblastoma cells was found in 21 cases, as determined by immunohistochemistry. In electron microscope glial differentiation was manifested by presence of filaments of 10 nm diameter in the cytoplasm of few tumor cells. Neuronal differentiation was manifested by presence of neurotubules, synaptic vesicles, forming of bulb-like endings and processes similar to dendrites.

Our study has shown, that in diagnosis of medulloblastoma it is useful to perform parallelly immunohistochemical and ultrastructural studies, which allow more precise determination of direction and degree of differentiation of the tumor cells than routine histology.

#### ПРИСУТСТВИЕ КИСЛОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО ГЛИОЗНОГО БЕЛКА (GFAP) КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ

##### Резюме

В 84 случаях медуллобластомы была проведена иммуногистохимическая реакция, обнаруживающая присутствие кислого фибриллярного глиозного белка (GFAP). 12 случаев из этой группы были исследованы электронно-микроскопически, чтобы определить дифференцировку клеток опухоли.



Глиозная дифференцировка клеток медуллобластомы была найдена в 21 случаях, на основании положительной иммуногистохимической реакции. В электронно-микроскопическом исследовании дифференцировка глиозных клеток проявлялась присутствием фибрилл с диаметром 10 nm в цитоплазме немногочисленных клеток опухоли. Нервная дифференцировка опухолевых клеток проявлялась присутствием невротубулл, синаптических пузырьков, формированием колбочковидных окончаний и удвоенным дендритом отростком. Проведенные исследования показали, что в диагнозе медуллобластомы целесообразно параллельное применение иммуногистохимического и ультраструктурного исследований, позволяющих точнее, чем рутинные гистологические методы, обнаружить разницу в направлении и степени дифференцировки клеток этой опухоли.

## PIŚMIENICTWO

1. Bailey P.: Intracranial tumours. Ch. Thomas. Springfield, Baltimore, 1933, p. 233.
2. Bailey P., Cushing H.: Medulloblastoma cerebelli. A common type of midcerebellar glioma of childhood. Arch. Neurol. Psychiat., 1925, 14, 192—224.
3. Barnard R. O., Pambakian H.: Astrocytic differentiation in medulloblastoma. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1980, 43, 1041—1044.
4. Bloom H. J. G., Glees J. P.: Chemotherapy of gliomas in adults and of medulloblastoma in children. W: Chemotherapy of gliomas. Basic research, Experiences and results. Red. D. Voth, P. Krauseneck. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1985, 331—339.
5. Camins M. B., Cravioto H. M., Epstein F., Ransohoff J.: Medulloblastoma: an ultrastructural study. Evidence for astrocytic and neuronal differentiation. Neurosurgery, 1980, 6, 398—411.
6. Cangir A., Ragab A. H., Steuber P., Land V. T., Berry D. H., Krischer J. P.: Combination chemotherapy with vincristine (NC-67574), procarbazine (NSC-762) (MOPP vs OPP) in children with recurrent brain tumors. Med. Pediat. Oncol., 1984, 12, 1—3.
7. Coffin C. M., Mukai K., Dehner L. P.: Glial differentiation in medulloblastomas. Am. J. Surg. Pathol., 1983, 7, 555—564.
8. Crafts D. C., Levin V. A., Edwards M. S., Pischer T. L., Wilson C. B.: Chemotherapy of recurrent medulloblastoma with combined procarbazine, CCNU, and vincristine. J. Neurosurg., 1978, 49, 589—592.
9. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbee J., Woodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. Acta Neuropath. (Berl.), 1978, 42, 183—190.
10. Del Cerro M. P., Snyder R. S.: Studies on the developing cerebellum. II. The ultrastructure of the external granular layer. J. Comp. Neurol., 1972, 144, 131—163.
11. Delpech B., Delpech A., Vidard M. N., Girard N., Tayot J., Clement J. C., Creissard P.: Glial fibrillary acidic protein in tumors of the nervous system. Brit. J. Cancer, 1978, 37, 33—40.
12. Eng L. F., Rubinstein L. J.: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. J. Histochem. Cytochem., 1978, 26, 513—522.
13. Ermel A. E., Brucher J. M.: Arguments ultrastructuraux en l'appartenance du medulloblastome a la lignee neuronale. Acta Neurol. Belg., 1974, 74, 208—220.
14. Escourolle R., Poitier J.: L'ultrastructure du medulloblastome cerebelleux. Ann. Anat. Pathol., 1967, 12, 121—136.
15. Foerster A., Gagel O.: Das umschriebene arachnoideal Sarkom des Kleinhirns. Z. Neur. 1939, 164, 565—580.



16. Goebel H. H., Rama B., Schlie M.: Immunohistopathology in diagnostic neuropathology. W: Acute non-traumatic intracranial bleedings. Posterior fossa tumor in infancy. *Advances in Neurosurgery*, vol. 11. Red. H. P. Jensen, M. Brock, M. Klinger, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983, 195—202.
17. Gullotta F.: Betrachtungen zur Genese des sogenannten Medulloblastoms. *Acta Neurol. (Napoli)*, 1967, 22, 206—209.
18. Ishida Y., Kawai S., Sato K., Nibbe H.: Electron microscopy of medulloblastoma. *Gunma J. Med. Sci.*, 1964, 13, 71—78.
19. Kadim M. E., Rubinstein L. J., Nelson J. S.: Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1970, 29, 583—600.
20. Kersting G.: Die Gewebezüchtung der Medulloblastome. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1967, 8, 100—103.
21. Kopelson G., Lingood R. M., Kleinman G. M.: Medulloblastoma. The identification of prognostic subgroups and implication for multimodality management. *Cancer*, 1983, 51, 312—319.
22. Kumanishi T., Washiyama K., Watabe K., Sekiguchi K.: Glial fibrillary acidic protein in medulloblastomas. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1985, 67, 1—5.
23. Lyser K. M.: Human nervous system tumors. Observation by high voltage electron microscopy. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1975, 32, 313—324.
24. Mannoji H., Takeshita I., Fukui M., Ohta M., Kitamura K.: Glial fibrillary acidic protein in medulloblastoma. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1983, 55, 63—69.
25. Matakas F., Cervós-Navarro J., Gullotta F.: The ultrastructure of medulloblastomas. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1970, 16, 271—284.
26. Merkel K. H. H., Zimmer M., Wahlen W., Schwarz E.: The usefulness of immunocytological demonstration of glial fibrillary acidic protein for diagnostic problems of cerebral tumours. W: Tumours of the central nervous system in infancy and childhood. Red. D. Voth, P. Gutjahr, C. Langmaid. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, 58—61.
27. Moss T. H.: Evidence for differentiation in medulloblastomas appearing primitive on light microscopy: an ultrastructural study. *Histopathology*, 1983, 919—930.
28. Müller W., Schaefer H. E.: Beitrag zur morphologischen Onkotypie des Medulloblastomas. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1974, 30, 51—61.
29. Nishii R.: Zur Kenntnis der diffusen Sarcomatose des Nervensystems (Medullo-Blastom). *Arch. Neurol. Inst. Univ. Wien*, 1929, 31, 116—128.
30. Palmer J. O., Kasselberg A. G., Netsky M. G.: Differentiation of medulloblastoma. *J. Neurosurg.*, 1984, 55, 161—169.
31. Pasquier B., Lachard A., Pasquier D., Couderc P., Delpech B., Courel M. N.: Protéine gliofibrillaire acide (GFA) et tumeur nerveuses centrales. Etude immunohistochemique d'une série de 207 cas. IIe partie: medulloblastomes, hemangioblastomes, autres tumeurs. *Ann. Pathol.*, 1983, 3, 203—211.
32. Raat J., Kernohan J.: Relation of abnormal collections of cells in posterior medullary velum of cerebellum to origin of medulloblastoma. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1944, 52, 163—169.
33. Roessmann U., Velasco M. E., Gambetti P., Autilio-Gambetti L.: Neuronal and astrocytic differentiation in human neuroepithelial neoplasms. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1983, 42, 113—121.
34. Roy S.: An ultrastructural study of medulloblastoma. *Neurology (India)*, 1977, 25, 226—229.
35. Rubinstein L. J.: Tumors of the central nervous system. Atlas of tumor pathology. Fascicle 6 (Armed Forces Institute of Pathology) Washington, 1972, 55—85.



36. Rubinstein L. J.: The cerebellar medulloblastoma: its origin differentiation, morphological variants and biological behavior. W: Handbook of Clinical Neurology. Tumours of the brain and skull. 1975, III, 167—193.
37. Rubinstein L. J., Herman M. M., Hanbery J. W.: The relationship between differentiating medulloblastoma and differentiating diffuse cerebellar astrocytoma. Light, electron microscopic, tissue and organ culture observation. *Cancer*, 1974, 3, 675—690.
38. Schindler E., Gullotta F.: Glial fibrillary acidic protein in medulloblastomas. W: Acute non-traumatic intracranial bleedings. Posterior fossa tumor in infancy. Red. H.-P. Jensen, M. Brock, M. Klinger. *Advances in Neurosurgery*, vol. 11. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983, 203—204.
39. Soejima T.: Fine structure of medulloblastoma. *Gann.*, 1970, 61, 17—36.
40. Soejima T., Fukui M.: So-called arachnoid sarcoma of the cerebellum. Its histogenesis and clinical comparison with classical medulloblastoma. *Brain and Nerve (Jap.)*, 1972, 25, 1275—1283.
41. Sternberger L. A., Hardy P. H., Cuculis J. J., Mayer H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 315—333.
42. Stevenson L., Eschlin P.: Nature and origin of some tumors of the cerebellum. Medulloblastoma. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)*, 1934, 31, 93—109.
43. Szymaś J.: Das saure Gliafaserprotein. Ein wertvolles Hilfsmittel in der neuropathologischen Diagnostik. Eine Einführung., *Zentralbl. Allg. Pathol. Anat.*, 1986, 131, 3—19.
44. Szymaś J., Morkowski S.: Antiserum glial fibrillary acidic protein. Production and specificity control. *Immunol. Pol.*, 1984, 9, 135—144.
45. Toga M.: *Tumeurs du systeme nerveux ultrastructure. Diffusion Generale de Libraire.* Marseille, 1976.
46. Van der Meulen J. D. M., Houthoff H. J., Ebels E. J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1978, 4, 177—190.
47. Velasco M. E., Dahl D., Roessmann U., Gambetti P.: Immunohistochemical localisation of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*, 1980, 45, 484—494.
48. Ward H. W. C.: Central nervous system tumor of childhood treated with CCNU vincristine, and radiation. *Med. Pediat. Oncol.*, 1978, 4, 315—320.
49. Zimmerman H. M.: The histopathology of experimental medulloblastoma. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1967, 8, 69—75.
50. Zülch K. J.: *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System.* World Health Organization. Geneva, 1979.
51. Zülch K. J., Wechsler W.: Pathology and classification of gliomas. *Prog. Neurol. Surg.*, 1968, 2, 1—84.

Adres autorów: Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej AM, ul. Przyby-  
szewskiego 49, 60-355 Poznań.



HALINA KROH, SŁAWOMIR WALENCIK, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI,  
HALINA WEINRAUDER

SPONTANEOUS ASTROCYTOMA IN THE MONGOLIAN GERBIL  
(*MERIONES UNGUICULATUS*)

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

Spontaneous neoplasms of the central nervous system in gerbils are unknown. After introduction of a Mongolian gerbil into laboratory use (Schwentker 1963) it was suggested that these rodents do not develop spontaneous tumors (Handler, Pav 1964; Handler et al. 1966). Soon both in the Mongolian gerbil and in some few species of wild and laboratory-bred *Gerbillinae* neoplasms of the skin and internal organs were noted (Benitz, Kramer 1965; Ringler et al. 1972; Rowe et al. 1974; Vincent, Ash 1978). The tumors were observed in 8.4—24% of autopsied animals (Vincent et al. 1979) particularly in ageing, more than 2-year-old animals (Rowe et al. 1974; Vincent et al. 1975).

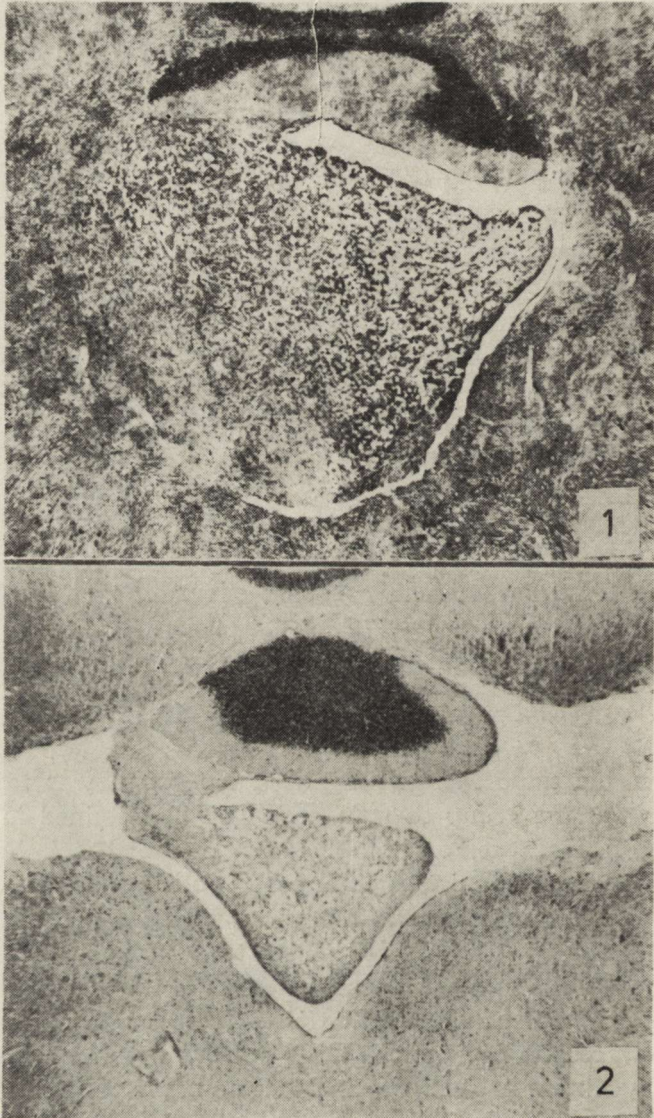
This paper concerns a primary spontaneous glioma of the medulla oblongata, the first noted case of a neoplasm of the central nervous system in the Mongolian gerbil.

CASE HISTORY

An 8-week-old male Mongolian gerbil, No. 47/80 was raised in our own colony from the group of Mongolian gerbils obtained in 1974 from Albert Einstein Institute, originating from Tumblebrook Farm, Brant Lake, N. Y. The animal, together with other 22 gerbils in this series was used for experimental brain ischemia by one of the authors (M. J. M.) and included into the published study (Kapuściński, Mossakowski 1983). The gerbil had been anesthetized with ether and both common carotid arteries were occluded with Heifetz clip for 30 min. On account of the shallow respiratory action, the respiratory pump was introduced since the 15th minute of the experiment. The survival time after release of the carotid clamping was 2 hr. The animal was perfused successively with physiological saline and with 10% formalin solution. At necropsy the condition of internal organs was good. The brain was cut frontally at the level of basal ganglia, Ammon horns and cerebellum. The ventricular system was dilated. Cerebral cuts were fixed in 10% formalin and



embedded in paraffin. Tissue sections 10  $\mu\text{m}$  thick were stained with hematoxylin and eosin and by the methods of Klüver-Barrera, Holzer, Bielschowsky, Gridley, PAS. Additionally, immunoperoxidase method with rabbit anti-GFAP serum (Decopatts, Denmark) in dilutions 1 : 500, 1 : 200, 1 : 100 and goat anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase (Behringwerke, FRG) was applied to paraffin sections.



*Fig. 1.* Subependymal localization of the tumor in the floor of the IVth ventricle. H—E.  $\times 25$

*Ryc. 1.* Guz podwyściółkowy w dnie IV komory. H—E. Pow.  $25 \times$

*Fig. 2.* Tumor in the lumen of the IVth ventricle. H—E.  $\times 25$

*Ryc. 2.* Guz w świetle IV komory. H—E. Pow.  $25 \times$



## CASE DESCRIPTION

In the cerebral hemisphere vacuolization of neuropil of anterior parts of *thalamus opticus*, particularly enhanced in the posterior parts. Hippocampal gyri exhibit marked rarefaction of neuropil and numerous eosinophilic cells between sector  $H_2$  and  $H_3$ .

Cerebellar sections reveal a neoplasm localized at the floor of the IVth ventricle in midline opposite to the nodulus (Fig. 1). In the medulla oblongata it occupies both *fasciculi longitudinales mediales* reaching laterally *nucleus vestibularis* neurons which extend to the periphery of the tumor. Small fields of neoplastic tissue infiltrate bilaterally *pedunculi cerebellares inferiores*. Some sections show the tumor invading the ventricle subependymally, other — inside the ventricle (Fig. 2).

The main mass of the tumor is well delimited from the nervous tissue despite of infiltrative type of growth (Fig. 3). There are two basic types of cells, i.e. small and large ones with moderate chromatic, medium size nuclei and abundant cytoplasm (Fig. 4). The nuclei with clear-cut nucleoli are placed excentrically. Bi- and trinuclear cells with distinct, granular chromatin are present. The cytoplasm of large cells is markedly eosinophilic with vacuoles and sometimes with round inclusions staining pale blue with cresyl violet, negative with PAS. The outline of the cells is irregular with short processes (Fig. 5). Some cells are triangular with one broad process. There are also some large dispersed cells with content washed out (Fig. 6). Small cells with hyperchromatic nuclei and scarce cytoplasm are spread among the large cells. Mitotic figures are absent.

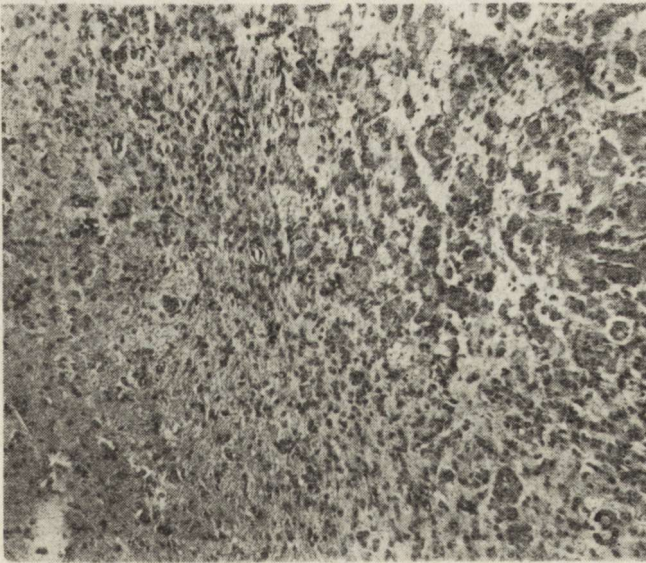
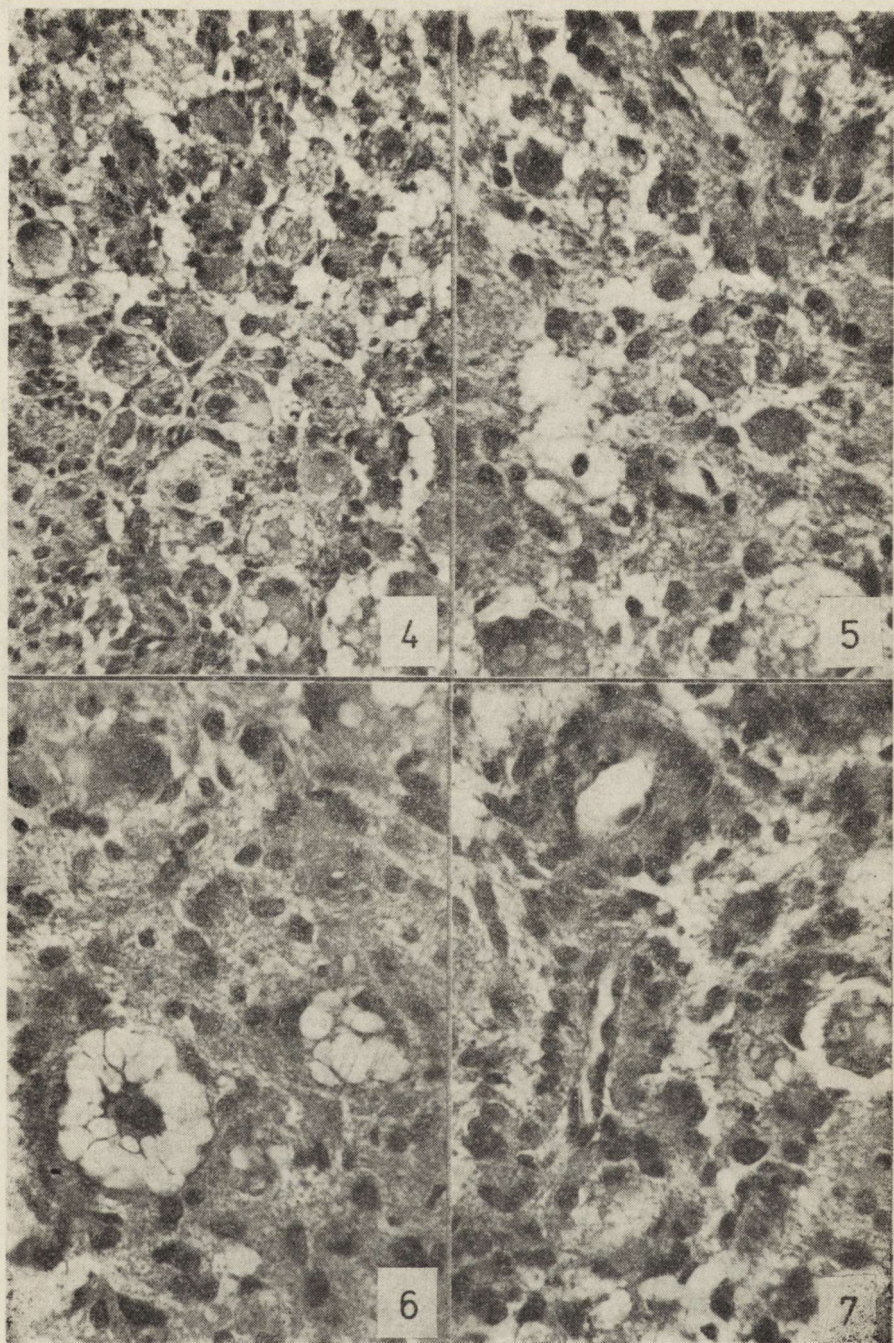


Fig. 3. Periphery of the tumor and delineation from nerve tissue. H—E.  $\times 60$

Ryc. 3. Pogranicze nowotworu i tkanki nerwowej. H—E. Pow.  $60 \times$





*Fig. 4.* Large neoplastic cells with excentric nuclei. H—E.  $\times 100$

*Ryc. 4.* Duże komórki nowotworowe o jądrach ułożonych na obwodzie. H—E. Pow. 100  $\times$

*Fig. 5.* Vacuolization of large neoplastic cells. H—E.  $\times 250$

*Ryc. 5.* Wakuolizacja dużych komórek nowotworowych. H—E. Pow. 250  $\times$

*Fig. 6.* Degeneration of neoplastic cells. Note the binuclear, polymorphic cell. H—E.  $\times 400$

*Ryc. 6.* Zwyródnienie komórek nowotworowych i komórka dwujądrowa, wielokształtna. H—E. Pow. 400  $\times$

*Fig. 7.* Perivascular arrangement of small neoplastic cells. H—E.  $\times 400$

*Ryc. 7.* Okołonaczyniowy układ małych komórek nowotworowych. H—E. Pow. 400  $\times$



There are traces of gial fibrils. Tumoral vessels are few, thinwalled and of small diameter with tendency to be surrounded by small neoplastic cells (Fig. 7). Reticulin fibres are not present either in the vascular walls or neoplastic stroma. There were neither necrotic nor hemorrhagic foci. The majority of neoplastic cells had their cytoplasm immunostained with anti-GFAP serum diluted 1 : 100; in higher dilutions stained only a few large cells (Fig. 8). The diagnosis was additionally supported by the reprint from the personal computer "JJJ" in the Institute of Neuro-pathology, Free University, West Berlin programmed for diagnostics of human brain tumors (Iglesias et al. 1983, 1986). Assuming that the large cells of the tumor originate from astrocytes, the probability of diagnosis of astrocytoma is 98.87%. If the large cells are of neuronal origin the probability of the diagnosis of astrocytoma is 66.05%, oligodendroglioma 31.33%, ependymoma 1.47%, unclassified tumor 1.10%.

#### DISCUSSION

Comparison of this unique case with other similar cases of spontaneous gliomas cannot be done. Intracerebral inoculation of 1-day aged Mongolian gerbils with Avian sarcoma virus (ASV) caused intracerebral gliomas, fatal in  $38.4 \pm 10.9$  days in 100% of animals. The tumors were invasive, hemorrhagic, composed of oligodendroglia, gemistocytic and protoplasmatic astrocytes (Serano, Bigner 1979). One of the most popular carcinogens for the nervous system, ethylnitrosourea, administered subcutaneously to neonatal Mongolian gerbils caused after a year in 31%

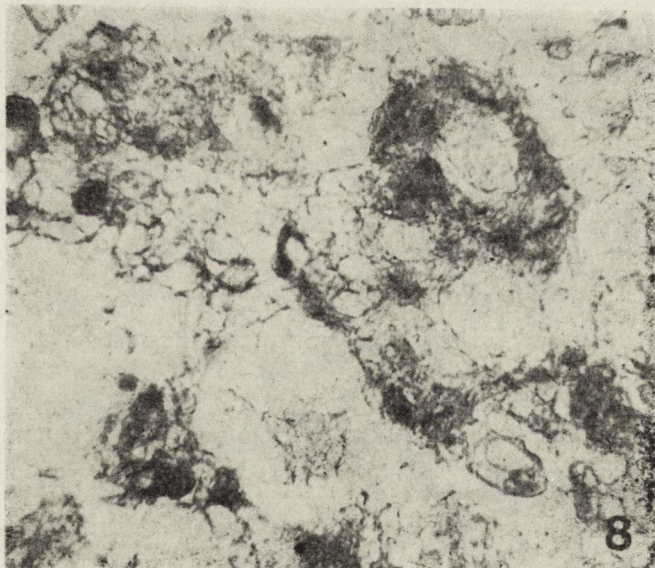


Fig. 8. Distribution of GFAP in neoplastic cells. Rabbit anti-GFAP serum, 1 : 100 dilution.  $\times 400$

Ryc. 8. Zawartość GFAP w komórkach nowotworu. Surowica królicza anty-GFAP w rozcieńczeniu 1 : 100. Pow. 400  $\times$



of animals the oligodendrogliomas of the brain and spinal cord and one meningeal tumor with addition of cutaneous melanomas, kidney hemangiomas and ameloblastomas of the lower jaw. (Naito et al. 1985) or only melanomas of the skin (Kleihues, et al. 1978), whereas methylnitrosourea induced adenomas and carcinomas of the midventral sebaceous gland (Haas et al. 1975a). Diethylnitrosamine provoked in gerbils exclusively carcinomas of the liver and respiratory system (Haas et al. 1975b). None of the mentioned carcinogens produce in gerbils tumors of the peripheral nervous system, popular in other species, though there is a published case of a gerbil (*Meriones Shawi*), less than 46 months old which developed within one year a neurilemmoma of the brachial plexus (Ringler et al. 1972).

The animal presented by us seems to be the youngest tumor-bearing gerbil. Only twice were noted tumors of internal organs in gerbils younger than 2 years: a 5-month-old gerbil with ovarian teratoma (Meckley, Zwicker 1979) and 1.5-year-old one with thyroid adenoma (Shumaker et al. 1974).

Spontaneous cerebral and cerebellar gliomas in laboratory animals, dogs excepted (Dahme, Schiefer 1960), are rather rare. Singular astrocytomas developed in cats (Luginbühl et al. 1968). Among rare spontaneous intracerebral tumors in rats, astrocytomas are most frequent, including multifocal ones (Fitzgerald et al. 1974). Only one case of cerebral unclassified glioma was observed in the golden hamster (Luginbühl 1964) whereas spontaneous brain tumors in guinea pigs and in ferrets are unknown (Jänisch, Schreiber 1969).

As neither histological classification of brain tumors in gerbils, nor the computer programme for animal tumors are established, classification of the astrocytoma in question was difficult. Relatively sharp delineation of the growth and its localization in the medulla oblongata are atypical. The sparse amount of tissue did not allow to perform impregnation on frozen sections. The histological features of the large neoplastic cells require differentiation from those of neuronal origin; the diagnosis of ganglioglioma has been excluded by the personal computer.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors express their thanks to Prof. Dr. J. Cervos-Navarro and Doz. Dr. J. Iglesias from the Institute of Neuropathology, Free University, West Berlin for discussion of the case and help in computer diagnosis.

#### SAMOISTNY GWIAŹDZIAK U CHOMIKA MONGOLSKIEGO

##### Streszczenie

Przypadek dotyczy 8-tygodniowego chomika mongolskiego, u którego stwierdzono gwiaździak rdzenia przedłużonego w pobliżu IV komory. Nowotwór ten jest pierwszym samoistnym gwiaździakiem napotkanym w OUN chomika mongolskiego. Rozpoznanie histologiczne opiera się dodatkowo na wydruku z komputera programowanego dla ludzkich nowotworów mózgu.



## СПОНТАННАЯ АСТРОЦИТОМА У МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА

## Резюме

У 8-недельного монгольского хомяка обнаружено астроцитому продолговатого мозга вблизи IV желудочка. Эта опухоль является первой спонтанной астроцитомой, встреченной в центральной нервной системе монгольского хомяка. Гистологический диагноз основан добавочно на результатах компьютера, программированного для неоплазм мозга человека.

## REFERENCES

1. Benitz R. C., Kramer A. W. Jr.: Spontaneous tumors in the Mongolian gerbil. *Lab. Anim.*, 1965, 15, 281—284.
2. Dahme E., Schiefer B.: Intrakranielle Geschwülste bei Tieren. *Zbl. Veterinärmedizin*, 1960, 7, 341—363.
3. Fitzgerald J. E., Schardein J. L., Kurtz S. M.: Spontaneous tumors of the nervous system in albino rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974, 52, 265—273.
4. Haas H., Hilfrich J., Kmoch N., Mohr V.: Specific carcinogenic effect of N-methyl-N-nitrosourea on the midventral sebaceous gland of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975 a, 55, 637—640.
5. Haas H., Kmoch N., Mohr V., Cardesa A.: Susceptibility of gerbils (*Meriones unguiculatus*) to weekly subcutaneous and single intravenous injections of N-Diethyl-nitrosoamine. *Z. Krebsforsch.*, 1975 b, 83, 233—238.
6. Handler A. H., Magalini S. I., Pav D.: Oncogenic studies on the Mongolian gerbil. *Cancer Res.*, 1966, 26, 844—847.
7. Handler A. H., Pav D.: Use of the Mongolian gerbil in cancer research. *Cancer Res.*, 1964, 4, 25.
8. Iglesias J. R., Sanchez M. J., Sendra A., Mohnhaupt A.: Computer model of archive and diagnosis of brain tumors based on WHO classification. *EDV Med. Biol.*, 1983, 14, 40—44.
9. Iglesias J. R., Pfannkuch F., Arufto C., Kazner E., Cervos-Navarro J.: Histo-pathological diagnosis of brain tumors with the help of a computer: mathematical fundamentals and practical application. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1986, 71, 130—135.
10. Jänisch W., Schreiber D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems. VEB G. Fischer Verlag, Jena 1969.
11. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morfological observation after 30 min. bilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. *Advances in the Biosciences Stroke: Animal Models*. Ed.: V. Stefanovich. Pergamon Press 1983, 43, 63—82.
12. Kleihues P., Buecheler J., Riede U. N.: Selective induction of melanomas in gerbils (*Meriones unguiculatus*) following postnatal administration of N-ethyl-n-nitrosourea. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1978, 61, 859—863.
13. Luginbühl H.: A comparative study of neoplasm in the central nervous system in animals. *Acta Neuroch., Suppl.*, 1964, X, 30—45.
14. Luginbühl H., Fankhauser R., McGrath J. T.: Spontaneous neoplasms in the nervous system in animals. *Progress in Neurological Surgery*. Karger, Basel, 1968, 2, pp 86—156.
15. Meckley P. E., Zwicker G. M.: Naturally-occurring neoplasms in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Lab. Anim.*, 1979, 13, 203—205.
16. Naito M., Aoyama H., Fujioka Y., Ito A.: Induction of gliomas in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) following neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1985, 75, 581—587.



17. Ringler D. H., Lay D. M., Abrams G. D.: Spontaneous neoplasms in aging gerbillinae. *Lab. Anim., Sci.* 1972, 22, 407—414.
18. Rowe S. E., Simmons J. L., Ringler D. H., Lay D. M.: Spontaneous neoplasms in aging gerbilliane. *Vet. Path.*, 1974, 11, 38—51.
19. Schwentker V.: The gerbil, the new laboratory animal. III. *Vet.*, 1963, 6, 5—9.
20. Serano R. D., Bigner D. D.: Virally induced autochthonous astrocytomas in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a system for intracarotid (ic) chemotherapy. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1979, 38, 340.
21. Shumaker R. C., Paik S. K., Houser W. D.: Tumors in gerbillinae: a literature review and report of a case. *Lab. Anim. Sci.*, 1974, 24, 688—690.
22. Vincent A. L., Ash L. R.: Further observations on spontaneous neoplasms in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Lab. Anim. Sci.*, 1978, 28, 297—300.
23. Vincent A. L., Porter D. D., Ash L. R.: Spontaneous lesions and parasites of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Lab. Anim. Sci.*, 1975, 25, 711—722.
24. Vincent A. L., Rodrick G. E., Sodeman W. A. Jr.: The pathology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). A review. *Lab. Anim. Sci.*, 1979, 29, 645—651.

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



FELIX CRUZ-SANCHEZ\*, JOSE-V. LAFUENTE\*, HANS VOGEL\*\*  
GEORG GOSZTONYI\*

## MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SKELETAL MUSCLES IN A CASE OF KEARNS-SAYRE SYNDROME

\*Institute of Neuropathology, Klinikum Steglitz, FU Berlin,

\*\*Department of Neurology, Klinikum Steglitz, FU Berlin

Various mitochondrial changes have been described in muscles of patients suffering from different myopathies. Attempts to classify these mitochondrial myopathies by clinical and morphological parameters have not been successful to date. Furthermore, the different processes do not seem definable by biochemical characteristics (Kamieniecka, Schmalbruch 1980; Brucher 1982; Walter 1983).

The present report deals with the ultrastructural findings in a case of ocular myopathy.

### CASE REPORT

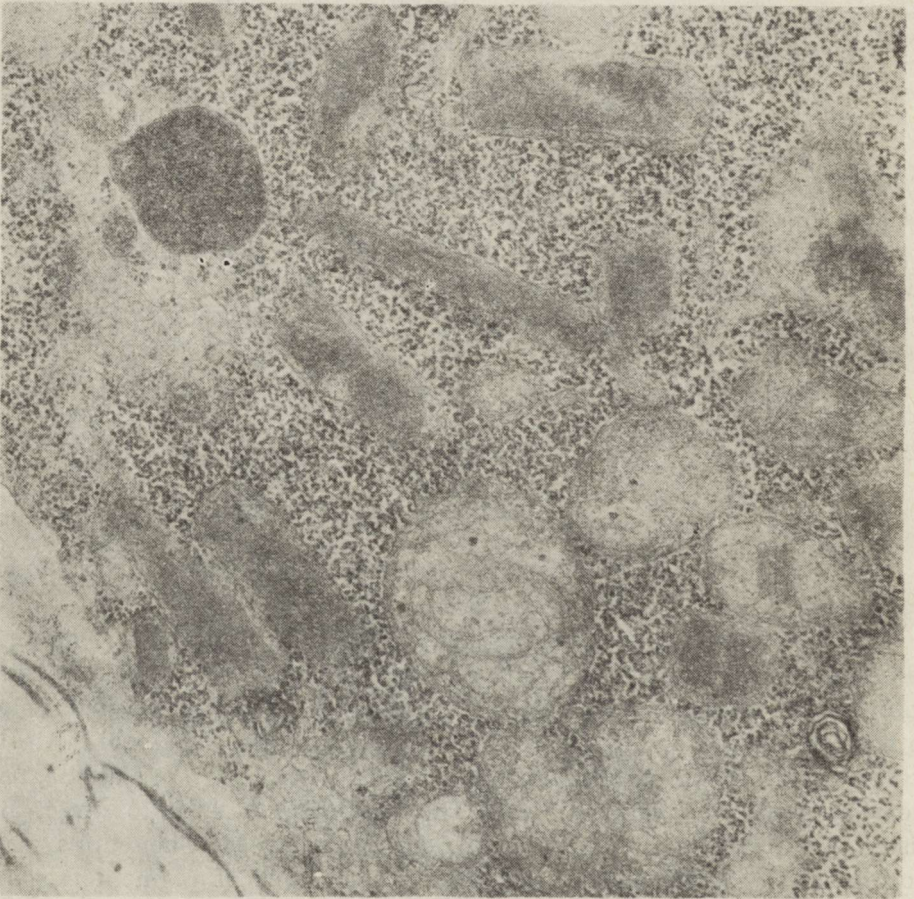
A 44 year-old man with no relevant previous diseases or family history was admitted to the hospital for study in 1985.

Twenty-eight years earlier he had developed symptoms of bilateral palpebral ptosis. In 1976, weakening of the scapular belt muscles, cardiac palpitations, reduction in vision, and lumbago first set in. On admission to hospital, the following disorders were noted: bilateral palpebral ptosis, atrophy of the proximal muscles of the extremities, cerebellar ataxia, and weakening of the anal sphincter. The patient's inability to direct his vision and loss of facial muscle tone were also noted. The pupils were isocoric and reactive. The eyeground showed signs of pigment degeneration in the retina with a distinct outline of the optic papilla.

No myotonic reactions were in evidence, nor were there any sensory disturbances. These were no signs of pyramidal involvement and osteo-tendon reflexes were present. Changes in coordination with pronounced difficulties in bringing finger to nose and heel to knee tests, as well as de-ranked lateral balancing in the Romberg test were noted. Complementary



tests: routine blood and urine tests as well as functional tests for anterior pituitary, thyroid and steroid hormones were within normal limits. The plasma creatine-kinase levels were normal, in contrast to the muscular ischemic test with lower than normal figures for lactate and ammonia. Total proteins in the CSF were slightly above normal levels. EMG showed a process of chronic myopathy with clear predominance in the ocular and facial muscles. The EEG was normal. ECG showed sinus rhythm; erratic conduction and excitation reading were present with complete block of the right ventricle and anterior hemiblock of the left ventricle being, therefore, evident. The patient showed no signs of cardiac dilata-



*Fig. 1.* Electron micrograph from the right quadriceps muscle showing proliferation of the internal mitochondrial membrane forming parallel touching packets or concentric formations and an increase of intermyofibrillar glycogen.  $\times 40\ 000$

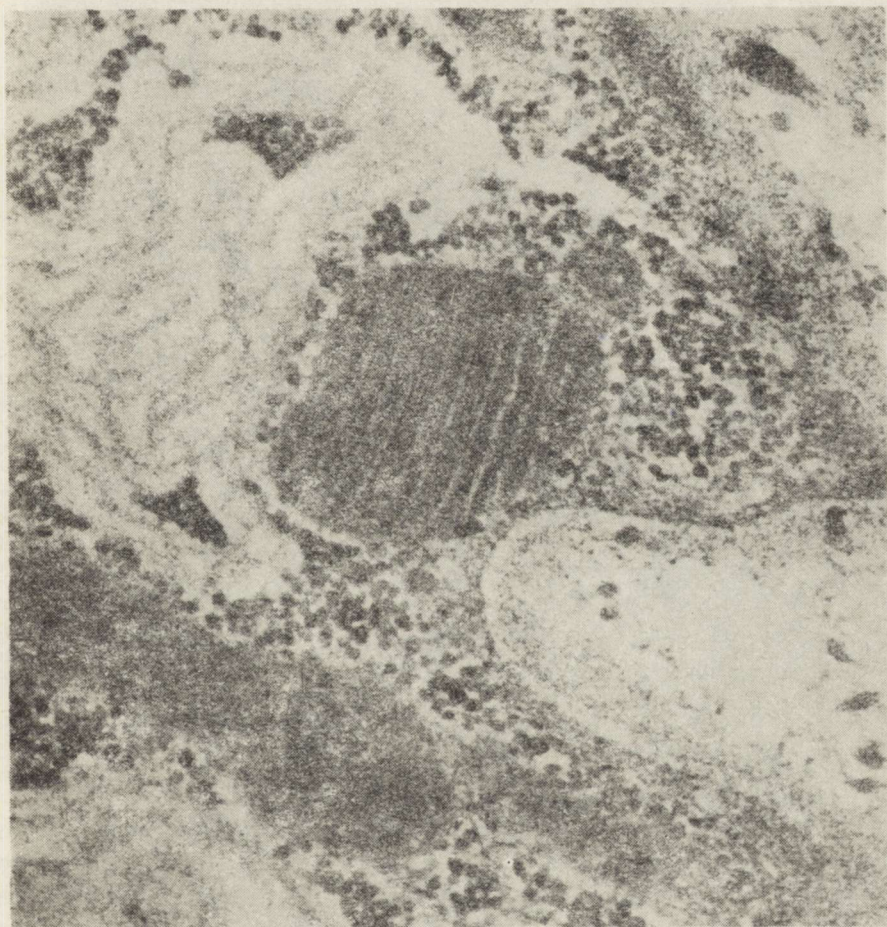
*Ryc. 1.* Elektronogram z prawego mięśnia czworogłowego z widocznym przerostem wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzącej równoległe lub koncentryczne układy. Ponadto widoczne zagęszczenie glikogenu między włóknkami mięśniowymi. Pow.  $40.000 \times$



tion. Computerized tomography demonstrated moderate diffuse cortical atrophy with dilatation of the sulci and cisterns.

Light microscopic examination of the right quadriceps stained with H—E, periodic acid Schiff (PAS). Gomori trichrome, elastica van Gieson revealed atrophy of a small number of fibers. The Gomori trichrome-method showed narrow homogeneous subsarcolemmal bands and thick granular intermyofibrillar material which stained red. Similar bands were noticed in the histo-enzymatic reaction of NADH/TR. ATP-ase staining at pH 9.4; 4.6 and 4.3 showed an increased number of type II fibers.

Ultrastructurally a marked increase in the number and size of subsarcolemmal mitochondria was noted. Proliferation of the internal mitochondrial membrane forming parallel stacks or concentric formations (Fig. 1) as well as an increase in the density of the mitochondrial matrix



*Fig. 2.* High-magnification view of paracrystalline structures in a mitochondrion to illustrate their intricate confirmation.  $\times 100,000$

*Ryc. 2.* Większe powiększenie struktur parakrystalicznych w mitochondrium. Pow.  $100,000 \times$



were also found. Furthermore, some mitochondria contained paracrystalline structures (Fig. 2), osmophilic inclusions as well as particles of glycogen and droplets of fat (Fig. 3). The level of intermyofibrillar glycogen was considerably increased.



*Fig. 3.* Muscle mitochondrion presenting an osmophilic inclusion body (arrow).  
 $\times 100.000$

*Ryc. 3.* Mitochondrium mięśniowe zawierające osmofilne ciało wtrętowe (strzałka).  
 Pow. 100.000  $\times$

#### DISCUSSION

Incomplete cases of Kearns-Sayre syndrome, of ophthalmoplegia-plus, and oculo-cranial somatic disease, as defined by Olson et al. (1972) pose great difficulties as regards to their correct identification. A slow rate of growth, poor development of secondary sexual characteristics, weakness of proximal extremity muscles, and cerebellar ataxia may all be associated with the Kearns-Sayre syndrome. Heart block may not appear until many years after the initial symptoms. In cases of incomplete Kearns-



-Sayre syndrome one may initially expect to find opthalmoplegia, retinopathy, ptosis or increased proteins in the CSF. It is important to identify these incomplete cases in order to predict the development of changes in cardiac function which can bring about rapid death (Tome, Fardeau 1985).

The ultrastructural mitochondrial changes as well as changes in the liver, endocrine glands. Purkinje cells and the granular cells of the cerebellum have been noted by several researchers and indicate a widespread mitochondrial abnormality (Okamoto et al. 1981; Morgan-Hughes 1982).

Tassin and Brucher (1982) has shown that in sporadic and familial cases, mitochondrial morphological anomalies are correlated with clinical findings and especially muscle deficiencies.

In our case, several morphological changes in the mitochondria were present, and their significance is equivocal.

Studies concerning the causes of these illnesses have resulted in numerous explanations ranging from genetic (Schnitzler, Robertson 1979), either dominant or recessive, to viral, or autoimmune defects (Berenberg et al. 1977).

#### ZMIANY MORFOLOGICZNE W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH W PRZYPADKU ZESPOŁU KEARNS-SAYRE'A

##### Streszczenie

Przedstawiono przypadek 44-letniego chorego z zespołem chorobowym, na który składały się obustronne opadnięcie powiek, niedowład zewnętrznych mięśni oka, osłabienie siły mięśni ramiennie-łopatkowych, połączone z zanikami, barwnikowe zwyrodnienie siatkówki, niezborność i nieznacznego stopnia zaniki korowe.

Większość włókien mięśniowych miała prawidłowe rozmiary i wieloboczne kontury, tylko niewielka część spośród nich wykazywała cechy zaniku. Widoczne były wąskie podsarkolemalne rąbki, wybarwiające się czerwono w technice trójbarwnej Gomoriego i czarno w odczynie NADH.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym stwierdzono wzrost liczby i wielkości mitochondriów. Macierz mitochondrialna wykazywała zwiększoną gęstość. Obecny był rozplam wewnątrznej błony mitochondrialnej, występowały struktury parakrytaliczne i ciemne mitochondrialne ciała wtrętowe. Zawartość glikogenu pomiędzy miofibrilami była zwiększona.

Na podstawie obrazu mikroskopowo-elektronowego można było wysunąć koncepcję, że nieprawidłowości ultrastrukturalne prowadziły do zaburzenia tkankowego metabolizmu mitochondriów, co z kolei stanowiło podłoże dysfunkcji mięśni.

#### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ В СЛУЧАЕ СИНДРОМА KEARNS – SAYRE'A

##### Резюме

Представлен случай 44-летнего больного с синдромом, в котором наблюдался двусторонний птоз, парез внешних мышц глаза, плечелопаточный парез с атрофией мышц, пигментная дегенерация сетины, атаксия и небольшая атрофия коры мозга.



Большинство мышечных волокон было нормальной величины и с полигональными контурами, только небольшая их часть проявляла атрофические изменения. Под сарколемой наблюдались узкие гомогенные рубчики, красно окрашенные в трехцветном методе Гомори и черные в реакции NADH.

Электронно-микроскопическое исследование обнаружило увеличение количества и величины митохондрии. Митохондриальное матрикс проявляло увеличенную плотность. Внутренняя митохондриальная мембрана пролиферировала, наблюдались паракристаллические структуры и темные внутримитохондриальные включения. Содержание гликогена между миофибриллами было увеличено.

Микроскопическая картина позволила сугерировать, что ультраструктуральные изменения вели к нарушениям кислородного метаболизма митохондрии, а это было основой нарушения мышечной функции.

#### REFERENCES

1. Berenberg R. A., Pellock J. M., Di Mauro S., Schotland D. L., Bonilla E., Eastwood A., Hays A., Vicalè C. T., Behrens M., Chutorian A., Rowland L. P.: Lumping or Splitting? Ophthalmoplegia-Plus or Kearns-Sayre Syndrome? *Ann. Neurol.*, 1977, 1, 37—54.
2. Kamieniecka Z., Schmalbruch H.: Neuromuscular disorders with abnormal muscle mitochondria. *Int. Rev. Cyt.*, 1980, 65, 321—357.
3. Morgan-Hughes J. A.: Defects of the energy pathways of skeletal muscle. *Recent Advances in Clinical Neurology*, 1982, 3, 1—47.
4. Okamoto T., Mizuno K., Lida M., Sobue I., Mukoyama M.: Ophthalmoplegia-plus. *Arch. Neurol.*, 1981, 38, 423—426.
5. Olson W., Engel W. K., Walsh G. O., Einaugler R.: Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibers. Histochemical and ultrastructural changes in limb muscles of a group of patients with idiopathic progressive external ophthalmoplegia. *Arch. Neurol.*, 1972, 26, 193—211.
6. Schnitzler E. R., Robertson W. C.: Familial Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 1979, 29, 1172—1174.
7. Tassin S., Brucher J. M.: The mitochondrial disorders: pathogenesis and aetiological classification. *Neuropath. and App. Neurobiol.*, 1982, 8, 251—263.
8. Tome F., Fardeau M.: Ocular Miopathies. *Path. Res. Pract.*, 1985, 180, 19—27.
9. Walter G. F.: Myoencephalopathies with abnormal mitochondria: a review. *Clin. Neuropath.*, 1983, 3, 101—113.

Address for correspondence: J.V. Lafuente, Institute of Neuropathology. Free University Berlin, Hindenburgdamm 30, 1000 Berlin 45, FRG.



HALINA WEINRAUDER, IRINA W. GANNUSZKINA

## ODDZIAŁYWANIE SUROWIC CHORYCH NA STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE NA ORGANOTYPOWĄ HODOWLĘ MÓZDŻKU

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, Instytut Neurologii ANM ZSRR, Moskwa

Patogeneza i etiologia stwardnienia zanikowego bocznego (SLA), w którym procesem zwyrodnieniowym dotknięte są neurony ruchowe, nie jest wyjaśniona i brak jest hipotezy, która uwzględniałaby różnorodne znane fakty dotyczące m.in. selektywnej wrażliwości jednych, a odporności innych populacji neuronów. Wśród różnych hipotez dotyczących etiologii procesu chorobowego znana jest również hipoteza sugerująca reakcję autoimmunologiczną skierowaną przeciwko neuronom ruchowym lub przeciwko komórkom podtrzymującym funkcje i przeżycie neuronów (Bartfeld i wsp. 1982). Dane dotyczące występowania czynników lub przeciwciał neurotoksycznych w surowicach chorych są sprzeczne, a pytanie czy istnieje swoista odporność skierowana przeciwko antygenom układu nerwowego i czy swoista odpowiedź immunologiczna na te antygeny może wpływać na przebieg choroby pozostaje nadal bez odpowiedzi.

W obszarach objętych zmianami obserwowano glejozę i rozrzedzenie neuropilu (Iwata, Hirano 1979), a Brock i McIlwain (1984) stwierdzili zmiany w składzie kwaśnych białek reagujących z surowicą przeciwko białku włókienek glejowych (GFAP) w grzbietowych i brzusznych korzeniach rdzeniowych u ludzi zmarłych na stwardnienie zanikowe boczne. Brown i wsp. (1984) wykazali, że surowice chorych rozpoznają antygeny o ciężarze 50 i 70 kd, występujące w rdzeniu kręgowym, mózdzku i wątrobie dojrziałych myszy. Kletti i wsp. (1984) dokonali obserwacji, że gammaglobuliny z surowic SLA częściej niż kontrolne, rozpoznają białko o ciężarze 140 kd z bydłych neuronów ruchowych i z komórek nerwowych zwojów międzykręgowych człowieka.

Przytoczone powyżej dane skłoniły nas do podjęcia doświadczeń mających na celu określenie wpływu surowic od chorych na stwardnienie zanikowe boczne na tkankę nerwową hodowaną *in vitro* i stwierdzenie



ewentualnego wiązania się hipotetycznych przeciwciał mózgowych na elementach komórkowych tej hodowli. Przedstawione przez nas wyniki dotyczą tylko 2 surowic, a zatem mogą mieć jedynie charakter doniesienia wstępnego.

#### MATERIAŁ I METODY

Hodowle tkankowe. Badania przeprowadzono na organotypowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych. Hodowle prowadzono metodą rutynową, stosowaną w naszym laboratorium, z dodatkiem do środowiska odżywczego 30% surowicy cielęcej. Do części hodowli po 16 dniach wzrostu *in vitro* dodawano 20% surowicy chorego i inkubowano je przez 4 dni. Do wykonania odczynu immunofluorescencji pośredniej z surowicą chorych jako pierwszą warstwą oraz do wszystkich odczynów kontrolnych, służyły hodowle po 20 dniach wzrostu *in vitro*.

Surowice od chorych. Surowice pochodziły od chorych leczonych w Instytucie Neurologii ANM w Moskwie: Chory Ł. C. (sur. nr 1) 46 lat, długość trwania choroby 14 miesięcy, rozpoznanie: zanik mięśni grzbietu, chory G. N. (sur. nr 2), 33 lata, długość trwania choroby 17 miesięcy, rozpoznanie: stwardnienie zanikowe boczne, postać szyjno-piersiowa. Sterylnie pobrane surowice przechowywano w +4°C i dodawano do hodowli bez inaktywacji.

Odczyn immunofluorescencji (IF). Odczyn wykonywano na hodowlach przemywanych 3 razy PBS i utrwalanych w zimnym (-20°C) acetonie. Hodowle doświadczalne (inkubowane 4 dni z surowicami chorych) inkubowano z surowicą króliczą anty GFAP, rozcieńczoną 1 : 20, przez 30 min w temperaturze pokojowej, przemywano 3 × PBS i inkubowano z odczynnikiem fluorescencyjnym rozcieńczonym 1 : 20 (kozie IgG przeciwko IgG króliczym) także 30 min w temperaturze pokojowej. Hodowle z grupy kontrolnej po utrwaleniu inkubowano 30 min z nierozcieńczonymi surowicami chorych, przemywano jak wyżej i inkubowano 30 min z surowicą przeciwko IgG ludzkim koniugowaną z fluoresceiną, rozcieńczoną 1 : 10.

Odczyny kontrolne wykonywano zastępując surowicę odpornościową anty GFAP i surowice chorych płynem PBS lub normalną surowicą ludzką oraz stosując jako drugą warstwę kontrolny odczynnik fluorescencyjny.

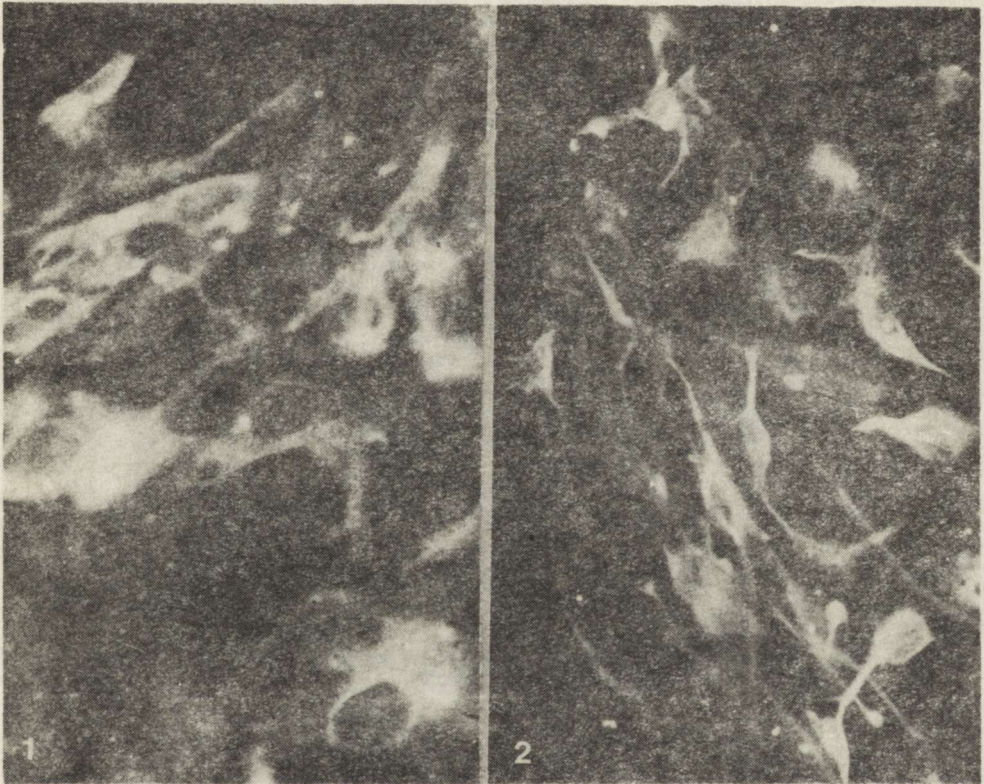
Odczynniki: 1. Królicza surowica przeciwko bydlęcemu kwaśnemu białku włókienek glejowych (GFAP firmy Dakopatts, Kopenhaga, Dania). 2. Surowica kozia przeciwko IgG króliczym koniugowana z fluoresceiną, fragment F (ab)<sub>2</sub>. 3. Surowica kozia przeciwko IgG ludzkim (łańcuchy H + L) koniugowana z fluoresceiną. 4. Królicze IgG, fragment F (ab)<sub>2</sub> koniugowane z fluoresceiną (fluorescencyjny odczynnik kontrolny) — wszystkie odczynniki fluorescencyjne firmy Behringwerke, Marburg, RFN.



## WYNIKI I OMÓWIENIE

W 16-dniowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych inkubowanych przez 4 dni w medium z dodatkiem 20% nieaktywowanej surowicy chorych na stwardnienie zanikowe boczne nie stwierdzono efektu cytotoksycznego.

W odczynie immunofluorescencyjnym z surowicą anty GFAP obserwowano we wszystkich hodowlach dobrze zachowane różnopościowe astrocyty. W strefie wzrostu spotykano pola astrocytów jedno- i dwubiegunowych z silną fluorescencją (ryc. 1, 2), często leżących na warstwie



*Ryc. 1.* Hodowla inkubowana z surowicą chorego nr 1. Odczyn IF z surowicą przeciwno GFAP. Widoczne pole prawidłowych astrocytów z silną fluorescencją leżących w strefie wzrostu. Pow. 250 ×

*Fig. 1.* Rat cerebellum culture incubated with ALS patient serum no 1 and stained by indirect immunofluorescence with anti-GFAP serum. Normal astrocytes in the growth zone with strong fluorescence. × 250

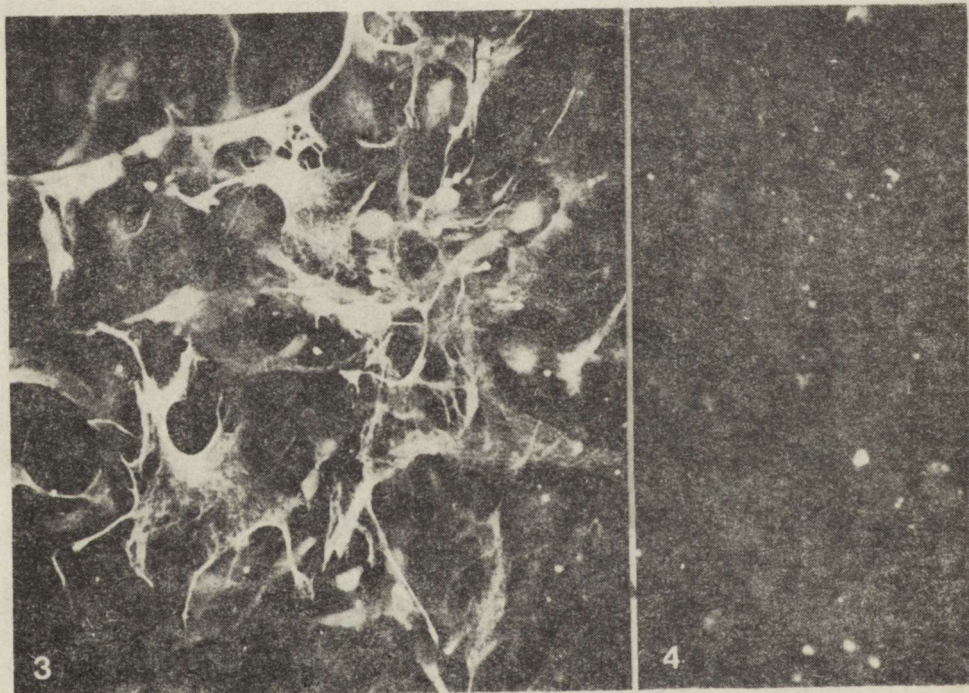
*Ryc. 2.* Hodowla inkubowana z surowicą chorego nr 2. Odczyn IF z surowicą przeciwno GFAP. Młode, często jedno- i dwubiegunowe astrocyty strefy wzrostu bez oznak uszkodzenia. Silna fluorescencja okołojądrowa i w wypustkach. Pow. 250 ×

*Fig. 2.* Rat cerebellum culture incubated with ALS patient serum no 2 and stained by indirect immunofluorescence with anti-GFAP serum. Young mono- and bipolar astrocytes lying in the growth zone without features of damage. Strong fluorescence in perinuclear region and in the cell processes. × 250



komórek o ujemnym odczynie. Spotykano również stosunkowo duże komórki z żółtą nieswoistą fluorescencją (prawdopodobnie neurony zawierające lipofuscyne) nie wykazujące cech uszkodzenia, jednak ich zidentyfikowanie w tych preparatach fluorescencyjnych bez zastosowania swoistego markera nie było możliwe. Często obserwowano pola astrocytów bardziej dojrzałych, o typowej gwiazdzistej budowie i wyraźnej włóknistej strukturze cytoplazmy (ryc. 3). Hodowle kontrolne, w których surowicę odpornościową zastępowano PBS, a surowicę przeciwko IgG króliczym — fluorescencyjnym odczynnikiem kontrolnym — były ujemne (ryc. 4).

Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z obserwacjami Roisena i wsp. (1982), którzy nie stwierdzili cytotoksycznego działania surowic chorych na hodowle mózdzku, chociaż obserwowali taki efekt wywierany na hodowane komórki rogów przednich „częściej i w większym stopniu” niż przez surowice kontrolne. Wolfgram i Myers (1973) obserwowali efekt



Ryc. 3. Hodowla inkubowana z surowicą chorego nr 1. Odczyn IF z surowicą anti GFAP. Strefa wzrostu z grupą dojrzałych astrocytów o wyraźnie widocznej włóknistej strukturze cytoplazmy, charakterystycznej dla odczynu na GFAP. Wygląd komórek nie odbiega od obserwowanego w hodowlach kontrolnych. Pow.  $125 \times$

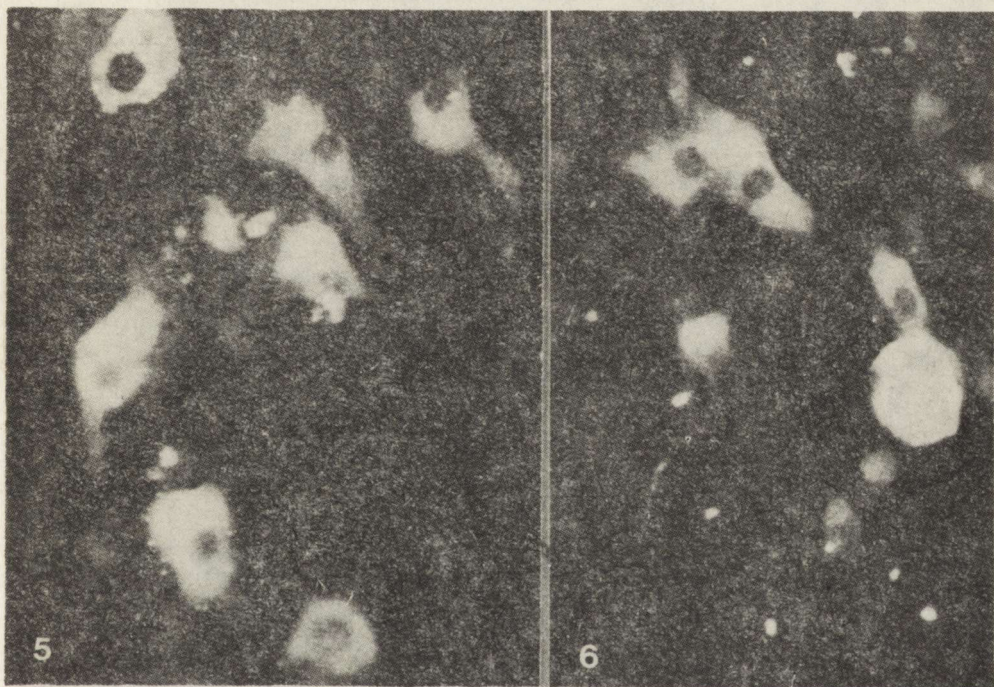
Fig. 3. Rat cerebellum culture incubated with ALS patient serum no 1 and stained by indirect immunofluorescence with anti-GFAP serum. Group of astrocytes in the growth zone with well visible fibrillary structure of cytoplasm typical for GFAP reaction, similar to reaction observed in the control cultures.  $\times 125$

Ryc. 4. Hodowla 20-dniowa. Kontrolny odczyn IF całkowicie ujemny. Pow.  $125 \times$

Fig. 4. Twenty-day-old culture. Control immunofluorescence test negative.  $\times 125$



cytotoksyczny surowic w hodowanych komórkach rogów przednich rdzenia myszy, chociaż efektu tego nie można było z całą pewnością przypisać działaniu przeciwciał. Natomiast Horwich i wsp. (1974) oraz Liveson i wsp. (1975) nie wykazali żadnego swoistego oddziaływania na hodowle. Także Lerich i Couture (1978) nie obserwowali wpływu takich surowic na hodowane komórki *neuroblastoma*. Niektórzy autorzy stwierdzali natomiast występowanie czynników powodujących demielinizację w hodowli (Field, Hughes 1969; Wolfgram, Myers 1973; Lisak i wsp. 1975). Różnice wykazane przez wielu autorów, a dotyczące swoistości i oddziaływania wykrywanych czynników cytotoksycznych (przeciwciał?) są na obecnym etapie badań trudne do interpretacji. Roisen i wsp. (1982) skłonni są przypisywać te różnice stopniowi dojrzałości komórek w hodowli i różnym technikom wykrywania cytotoksyczności, a Wolfgram i Myers (1973) poza



Ryc. 5. Hodowla 20-dniowa. Odczyn IF z surowicą chorego nr 1 i surowicą przeciwko ludzkim IgG. Widoczne wiązanie IgG badanej surowicy na niektórych elementach komórkowych hodowli w postaci bardzo silnej homogennej fluorescencji. Pow. 125  $\times$

Fig. 5. Twenty-day-old culture. Immunofluorescence test with serum from ALS patient no 1 as a first layer and with antiserum against human IgG as a second layer. Binding of IgG as a very strong homogeneous fluorescence in some cellular elements is visible.  $\times 125$

Ryc. 6. Hodowla 20-dniowa. Odczyn jak na ryc. 5. Fragment hodowli z pojedynczymi komórkami z silną homogenną fluorescencją cytoplazmy. Pow. 125  $\times$

Fig. 6. Twenty-day-old culture. Immunofluorescence test as in Fig. 5. Fragment of culture with particular cells showing strong homogeneous fluorescence in the cytoplasm.  $\times 125$



wiekami hodowli także usytuowaniu komórki w strefie wzrostu lub w eksplantacie.

W drugiej części naszych doświadczeń wykonywano odczyn IF stosując nierozcieńczoną surowicę chorych jako pierwszą warstwę. We wszystkich hodowlach stwierdzono wiązanie się gamma-globulin na niektórych komórkach (ryc. 5, 6). Wiązanie dotyczyło tylko pewnej liczby komórek, co może sugerować jego swoisty charakter. Wydaje się, że gammaglobuliny surowicy wiążą się zarówno na komórkach glejowych, jak i nerwowych, jednak wyjaśnienie przeciwko jakiemu typowi komórek są skierowane hipotetyczne przeciwciała mózgowe wymaga przeprowadzenia dalszych doświadczeń.

W przypadkach SLA poszukiwano dowodów na istnienie swoistej reakcji immunologicznej, szczególnie skierowanej przeciwko komórkom rogów przednich rdzenia. Uzyskane dane przynoszą w większości odpowiedź negatywną. Donnenfeld i wsp. (1984) stwierdzili występowanie złożeń IgG i dopełniacza głównie w astrocytach i w niektórych oligodendrocytach rogów przednich rdzenia, a Weinerowi i wsp. (1980) nie udało się wykazać wiązania IgG na neuronach rdzenia pacjentów zmarłych na SLA, także wtedy, kiedy eksplantaty hodowano w autologicznych surowicach. Cashman i wsp. (1985), stosując m.in. metodę immunofluorescencji, nie wykazali wiązania IgG na neuronach ruchowych rdzenia.

Podsumowując nasze wstępne wyniki i dane z piśmiennictwa można stwierdzić, że poszukiwanie czynników immunologicznych w chorobach zwyrodnieniowych ma coraz więcej zwolenników. Być może mechanizmy autoimmunologiczne są odpowiedzialne za szereg niewyjaśnionych dotąd w pełni objawów tych chorób, a ich poznanie pozwoliłoby na zastosowanie skuteczniejszego leczenia.

#### EFFECT OF SERA FROM ALS PATIENTS ON THE ORGANOTYPIC CULTURE OF CEREBELLUM

##### Summary

The effect of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) on the organotypic cultures of newborn rat cerebellum was studied. We have found no evidence of cellular damage after 4-day incubation of cultures with 20% of ALS sera, especially in astrocyte population using immunofluorescence technique with anti-GFAP serum. It may suggest that the sera do not contain cytotoxic factors against cerebellum cells *in vitro*. On the other hand using direct immunofluorescence test with antiserum against human IgG we observed binding of IgG from ALS sera to some cells cultured *in vitro*. It may be evidence of presence of specific antibodies in ALS sera, which in our experimental conditions may not exert the cytotoxic effect on the cultured cells.



ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТОК БОЛЬНЫХ БОКОВЫМ  
АМИОТРОФИЧЕСКИМ СКЛЕРОЗОМ  
НА ОРГАНОТИПНУЮ КУЛЬТУРУ МОЗЖЕЧКА

Резюме

Исследовано влияние сывороток больных боковым амиотрофическим склерозом на органотипическую культуру мозжечка новорожденных крыс. После четырехдневной инкубации с 20% сывороткой больных, культуры не проявляли повреждения; это было особенно отчетливо видно в популяции астроцитов, оцененной методом иммуофлюоресценции в реакции IF с антисывороткой против кислого белка астроцитарной волокнистости (GFAP). Это внушает, что в исследованных сыворотках не выступают цитотоксические к клеткам мозжечка факторы. С другой стороны было обнаружено связывание гаммаглобулинов с некоторыми клетками культуры при помощи непрямой реакции IF с сывороткой против гаммаглобулинов человека. Это, вероятно, свидетельствует о появлении специфических антител, которые в экспериментальных условиях могут не оказывать цитотоксического эффекта.

PIŚMIENNICTWO

1. Bartfeld H., Dham C., Donnenfeld H., Jashnani L., Carp R., Kacsak R., Vilcek J., Rapport M., Wallenstein S.: Immunological profile of amyotrophic lateral sclerosis and their cell-mediated immune response to viral and CNS antigens. *Clin. exp. Immunol.*, 1982, 48, 137—147.
2. Brock T. O., McIlwain D. L.: Astrocytic proteins in the dorsal and ventral roots in amyotrophic lateral sclerosis and Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neuro-path. exp. Neurol.*, 1984, 43, 609—619.
3. Brown R. H., Ogonowski M., Johnson D., Weiner H. L.: Antineuronal antibodies in sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (N.Y.)*, 1984, 34, Suppl. 1, 238.
4. Cashman N. R., Gurney M. E., Antel J. P.: Immunology of amyotrophic lateral sclerosis. Springer Seminars in Immunopathology. Red. A. Miescher, H. J. Müller-Eberhard. *Immunoneurology (I)*, 1985, 141—152.
5. Donnenfeld H., Kacsak R. J., Bartfeld H.: Deposits of IgG and C3 in the spinal cord and motor cortex of ALS patients. *J. Neuroimmunol.*, 1984, 6, 51—57.
6. Field F. J., Hughes D.: Toxicity of serum from motor neuron disease for myelin and glial cells in tissue culture. W: Motor neuron diseases: Research on amyotrophic lateral sclerosis and related disorders. Red. F. J. Norris Jr., L. T. Kurland, Grune and Stratton, New York 1969, 197—183.
7. Horwich M. S., Engel W. K., Chauvin P. B.: Amyotrophic lateral sclerosis sera applied to cultured motor neurons. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 332—333.
8. Iwata M., Hirano A.: Current problems in the pathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog. Neuropathol.*, 1979, 4, 277—286.
9. Kletti N. B., Marton L. S., Antel J. P., Stefansson K.: Antibodies against neural antigens in sera of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (N.Y.)*, 1984, 34, Suppl. 1, 238.
10. Lerich J. R., Couture J.: Amyotrophic lateral sclerosis sera are not cytotoxic to neuroblastoma cells in tissue culture. *Ann. Neurol.*, 1978, 41, 384—387.
11. Liveson J., Frey H., Bornstein M. B.: The effects of serum from ALS patients on organotypic nerve and muscle tissue cultures. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 32, 127—131.



12. Roisen F. J., Donnenfeld H., Bartfeld H., Baxter J.: Circulating neurotoxins in amyotrophic lateral sclerosis. W: Human motor neuron diseases. Red. L. P. Rowland. Raven Press, New York, 1982, 403—408.
13. Weiner L. P., Strolman S. A., Davis R. L.: Attempts to demonstrate virus in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (N.Y.)*, 1980, 30, 1319—1322.
14. Wolfgram F., Myers L.: Amyotrophic lateral sclerosis: effect of serum on anterior horn cells in tissue culture. *Science*, 1973, 179, 579—580.

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



Mieczysław Śmiałek, Teresa E. Bugera-Piecuch, Barbara Kosicka: Effect of ascorbic acid on dopamine level in the mouse brain after intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) . . . . .	299
Mieczysław Śmiałek, Barbara Kosicka, Teresa E. Bugera-Piecuch: Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the respiratory activity of dopaminergic neurons in the mouse brain . . . . .	305
Janusz Szymaś, Wiesława Biczysko, Przemysław Gabriel: The presence of glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an exponent of differentiation of neuroblastoma cells . . . . .	313
Halina Kroh, Sławomir Walencik, Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Spontaneous astrocytoma in the Mongolian gerbil ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) . . . . .	329
Felix Cruz-Sanchez, Jose V. Laufente, Hans Vogel, Georg Gosztonyi: Morphological changes in the skeletal muscles in a case of Kearns-Sayre syndrome . . . . .	337
Halina Weinrauder, Irina W. Gannuszkińska: Effect of sera from ALS patients on the organotypic culture of cerebellum . . . . .	343

### СОДЕРЖАНИЕ

М. Вендер, З. Адамчевска-Гонджевич, Ю. Щех, А. Годлевски: Миелиновые липиды в стареющем мозгу . . . . .	235
М. Вендер, А. Гонджевич: Восприимчивость крыс Вистар к энцефалитогенному антигену, происходящему от животных в старческом возрасте . . . . .	247
М. Стрыецка-Циммер, И. Зельман: Негистоновые белки хроматина из разных районов мозга кролика <i>pt.</i> и здорового . . . . .	253
М. Крашпульски, Т. Вжолкова: Обмен кровь—мозг в некоторых областях лимбической системы. Морфометрические исследования . . . . .	265
И. Лукашык, Т. Вжолкова: Околосудистые нервные окончания в соотношении с клеточными компонентами терминальных сосудов миндалевидного тела кошки . . . . .	273
А. Капустински: Мозговой проток крови в экспериментальной модели клинической смерти крыс . . . . .	287
М. Смялек, Т. Е. Бугера-Пецух, Б. Косицка: Влияние аскорбиновой кислоты на дофамин в мозгу мышей, отравляемых 1-метило-4-фенило-1,2,3,6-четырегидропиридиной (МРТР) . . . . .	299
М. Смялек, Б. Косицка, Т. Е. Бугера-Пецух: Оценка влияния 1-метило-4-фенило-1,2,3,6-четырегидропиридины (МРТР) на дыхательную активность дофаминергических нейронов в мозгу мышей . . . . .	305
Я. Шымась, В. Бичыско, П. Габрыель: Присутствие кислого фибриллярного глиозного белка (GFAP) как показатель дифференцировки клеток медуллобластомы . . . . .	313
Х. Крох, С. Валенчик, М. Я. Моссаковский, Х. Вэйнраудер: Спонтанная астроцитомы у монгольского хомяка . . . . .	329
Ф. Круз-Санчез, И. В. Лафуенте, Х. Фогель, Г. Гоштоный: Морфологические изменения в скелетных мышцах в случае синдрома Kearns—Sayre'a . . . . .	337
Х. Вэйнраудер, И. В. Ганнушкина: Влияние сывороток больных боковым амиотрофическим склерозом на органотипную культуру мозжечка . . . . .	343



SPIS TREŚCI

Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Janina Stanisławska, Józef Szczech, Antoni Godlewski: Lipidy mieliny w starzejącym się mózgu	235
Mieczysław Wender, Andrzej Goncerzewicz: Podatność szczurów Wistar na antygen encefalitogenny pochodzący od zwierząt w wieku starym . . .	247
Marta Stryjecka-Zimmer, Irmina B. Zelman: Białka niehistonowe różnych obszarów mózgu u królika zdrowego i królika pt . . . . .	253
Michał Kraszpulski, Teresa Wrzołkowa: Wymiana krew-mózg w wybranych okolicach układu limbicznego. Badania morfometryczne . . . . .	265
Irena Łukaszyk, Teresa Wrzołkowa: Zakończenia nerwowe okołonaczyniowe w relacjach ze składowymi naczyniami terminalnymi ciała migdałowego kota	273
Andrzej Kapuściński: Mózgowy przepływ krwi w doświadczalnym modelu śmierci klinicznej u szczurów . . . . .	287
Mieczysław Śmiałek, Teresa E. Bugera-Piecuch, Barbara Kosicka: Wpływ kwasu askorbinowego na poziom dopaminy w mózgowiu myszy po zatruciu 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-czterohydropirydyną (MPTP) . . . . .	299
Mieczysław Śmiałek, Barbara Kosicka, Teresa E. Bugera-Piecuch: Ocena działania 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-czterohydropirydyny (MPTP) na aktywność oddechową neuronów dopaminergicznych w mózgowiu myszy . . .	305
Janusz Szymaś, Wiesława Biczysko, Przemysław Gabryel: Obecność kwaśnego włókienkowego białka glejowego (GFAP) jako wykładnik różnicowania komórek rdzeniaka . . . . .	313
Halina Kroh, Sławomir Walencik, Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Samoistny gwiazdziak u chomika mongolskiego . . . . .	329
Felix Cruz-Sanchez, Jose V. Laufente, Hans Vogel, Georg Gosztanyi: Zmiany morfologiczne w mięśniach szkieletowych w przypadku zespołu Kearns-Sayre'a . . . . .	337
Halina Weinrauder, Irina W. Gannuszkina: Oddziaływanie surowic chorych na stwardnienie zanikowe boczne na organotypową hodowlę mózdzku . .	343

CONTENTS

Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Janina Stanisławska, Józef Szczech, Antoni Godlewski: Pattern of myelin lipids in the ageing brain . . . . .	235
Mieczysław Wender, Andrzej Goncerzewicz: Susceptibility of Wistar rats to encephalitogenic antigen derived from aged animals . . . . .	247
Marta Stryjecka-Zimmer, Irmina B. Zelman: Nonhistone nuclear proteins from different regions of healthy and pt rabbits brain . . . . .	253
Michał Kraszpulski, Teresa Wrzołkowa: Blood-brain exchange in various regions of the limbic system. Morphometric studies . . . . .	265
Irena Łukaszyk, Teresa Wrzołkowa: Relations between nerve terminals and components of terminal vessels of the cat amygdaloid body . . . . .	273
Andrzej Kapuściński: Cerebral blood flow in the experimental model of clinical death in rats . . . . .	287

Index 36668