

HALINA WEINRAUDER, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI,
IRINA V. GANUSZKINA

WPŁYW SUROWIC CHORYCH ZE ZWYRODNIENIEM
WĄTROBOWO-SOCZEWKOWYM LECZONYCH D-PENICYLAMINĄ
NA ROZWÓJ GLIOPATII WILSONOWSKIEJ *IN VITRO*

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa
Laboratorium Doświadczalnej Patologii Instytutu Neurologicznego
ANM ZSRR, Moskwa

Prowadzenie pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej w środowisku odżywczym, zawierającym surowicę chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, prowadzi do uszkodzeń komórek gleju gwiaździstego, typowych dla tzw. gliopatii wilsonowskiej. Nieprawidłowości komórkowe przyjmują postać uogólnionego przerostu indywidualnych astrocytów, któremu towarzyszą zmiany zwyrodnieniowe, wyrażające się przede wszystkim fragmentacją ich wypustek, prowadzące do pojawiania się amebowatych bezwypustkowych komórek. Na tle tych nieswoistych uszkodzeń występują zmienione komórki gwiaździste znane pod nazwą komórek Alzheimera typu II oraz komórek Opalskiego, które obok komórek Alzheimera typu I stanowią najbardziej charakterystyczny komponent patologii gleju w chorobie Wilsona (Mossakowski i wsp. 1970; Mossakowski, Weinrauder 1984). Identyczne nieprawidłowości komórkowe uzyskano w pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej, prowadzonej w środowisku odżywczym, zawierającym surowice zdrowych ludzi z dodatkiem egzogennych związków miedzi w ilości odpowiadającej jej stężeniu w mózgach ludzi z chorobą Wilsona. Spostrzeżenie to skłoniło do wysunięcia przypuszczenia, iż miedź gromadząca się w nadmiarze w ośrodkowym układzie nerwowym i podwyższona w surowicy krwi u chorych z zespołem zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego jest podstawowym czynnikiem lub jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój patologii gleju zarówno *in situ*, jak i *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970). Pośrednie potwierdzenie słuszności tej hipotezy przyniosła kolejna seria doświadczeń, w których do środowiska odżywczego hodowli, zawierającego surowicę chorych z nieleczonym zespołem zwyrod-

nienia wątrobowo-soczewkowego lub egzogenne związki miedzi podawano d-penicylaminę, stanowiącą podstawowy lek współczesnej terapii choroby Wilsona. Podawanie d-penicylaminy w tych warunkach zapobiegało rozwojowi gliopatii wilsonowskiej, a przede wszystkim pojawianiu się komórek Alzheimera typu II i komórek Opalskiego (Mossakowski i wsp. 1977).

W tym świetle wydawało się celowe prześledzenie wpływu surowic od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, leczonych d-penicylaminą na rozwój oraz obraz morfologiczny i immunohistochemiczny doświadczalnej gliopatii wilsonowskiej *in vitro*. Terapia d-penicylaminą prowadzi do wydatnego obniżenia poziomu miedzi w surowicy krwi chorych, nie wpływając istotnie na zawartość i aktywność ceruloplazminy stanowiącej alfa-2-glikoproteinę surowicy, syntetyzowaną w wątrobie i wiążącą w trudno dysocjujący związek jony miedzi. Zawartość ceruloplazminy oraz jej zdolność wiązania miedzi stanowi czynnik decydujący o proporcji tzw. miedzi związanej, tworzącej z nią trwałą związek, oraz miedzi wolnej, pozostającej w łatwo dysocjującym związku z albuminami surowicy. Do badań celowo użyto surowic chorych o różnym czasie trwania procesu chorobowego ze zróżnicowanym okresem stosowania terapii d-penicylaminą.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na organotypowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych, prowadzonych we flaszках Carrela według metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Środowisko odżywcze hodowli, zmieniane dwa razy w tygodniu, zawierało 50% surowicy krwi ludzi zdrowych, 40% zbuforowanego płynu wieloelektrolitowego (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin) i 10% wyciągu z zarodków kurzych. Uzupełniano je glukozą do końcowego stężenia 600 mg⁰%, a jego pH doprowadzano do 7,0—7,3.

W 14—16 dniu *in vitro* do wybranych hodowli w miejsce prawidłowej surowicy ludzkiej podawano surowicę od leczonych chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, przetrzymując je w tych warunkach przez okres 3—4 dni. Hodowle kontrolne przez cały okres doświadczenia prowadzono w rutynowym środowisku odżywczym. Hodowle kontrolowano codziennie w mikroskopie fazowo-kontrastowym. Po upływie założonego czasu doświadczenia używano je do badań histologicznych i immunomorfologicznych.

Do badań histologicznych hodowle utrwalano w płynie Carnoya i barwiono je błękitem toluidyny. Hodowle przeznaczone do badań immunomorfologicznych płukano trzykrotnie po 15 min w zbuforowanym fizjologicznym roztworze chlorku sodu (PBS), suszono i utrwalano w zimnym acetonie (−20°C) przez okres 4 min. Utrwalone hodowle inkubowano następnie w temperaturze pokojowej przez okres 30 min w su-

rowicy odpornościowej zawierającej przeciwciała przeciwko kwaśnemu białku włókienek glejowych (GFAP), rozcieńczonej w stosunku 1:100. Surowica odpornościowa pochodziła z Protein Laboratory Copenhagen University (dr E. Bock). Po inkubacji hodowle płukano trzykrotnie po 15 min w PBS, a następnie poddawano je drugiej inkubacji z użyciem fragmentu F/ab₂ antykróliczej immunoglobuliny IgG, skoniugowanej z fluoresceiną (Boehring, R.G. RFN). Po wypłukaniu szkieł z nadmiaru surowicy montowano je w zbuforowanej glicerynie i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Leitz. Kontrolę swoistości odczynu fluorescencyjnego przeprowadzano zastępując surowicę odpornościową surowicą nieimmunizowanych królików.

Do doświadczeń użyto surowice od 3 chorych z klinicznie i biochemicznie zweryfikowanym zespołem zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego.

Chory W., mężczyzna l. 19 z akinetyczno-hipertoniczną postacią choroby Wilsona i 6-letnim wywiadem chorobowym. Od lat 2 otrzymywał leczenie d-penicylaminą. Krew pobrano bezpośrednio po zakończeniu serii leczenia. Zawartość miedzi w surowicy 2,4 mg⁰/. Aktywność oksydazowa ceruloplazminy 2,4 j.m.

Chory D., mężczyzna l. 26 z typowym zespołem choroby Wilsona i 2-letnim wywiadem chorobowym. Po raz pierwszy leczony d-penicylaminą. Poprzednio leczony Kuprenilem. Krew pobrana w środku kuracji. Zawartość miedzi w surowicy — 13,6 mg⁰/. Aktywność ceruloplazminy — nieoznaczalna.

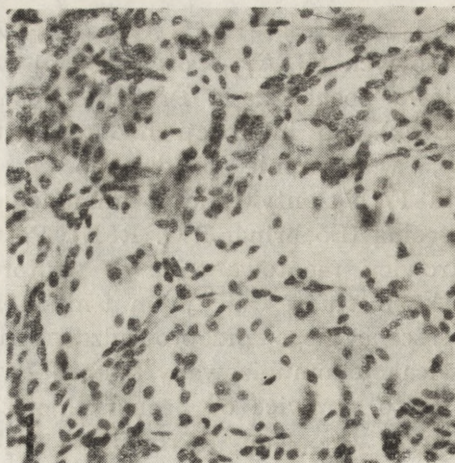
Chora B., kobieta l. 16 z typowym zespołem klinicznym choroby Wilsona, z 1-rocznym wywiadem chorobowym. Początkowo leczona Kuprenilem, wobec braku poprawy zastosowano leczenie d-penicylaminą. Krew pobrana bezpośrednio po zakończeniu pierwszej kuracji. Zawartość miedzi w surowicy krwi — 13,6 mg⁰/. Aktywność ceruloplazminy — 1 j.m.

WYNIKI

Obraz morfologiczny

Obraz morfologiczny hodowli z surowicami od wszystkich chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym różnił się istotnie od spostrzeganych w materiale kontrolnym (ryc. 1), wykazując ponadto uchwytne różnice w zależności od zastosowanej surowicy.

Podstawową różnicę materiału doświadczalnego w stosunku do kontroli stanowiło znaczne bogactwo komórek glejowych zarówno w eksplantacie, jak i w strefie wzrostu hodowli. Występując w hodowlach ze wszystkimi surowicami zjawisko to było najbardziej zaznaczone w przypadkach surowic pacjentów z krótszym wywiadem chorobowym (chory D. i B.). W obu tych przypadkach obecne były ponadto liczne powiększone jądra glejowe z niezwykle bogatą zawartością chromatyny (ryc. 2, 3). Widoczne były również komórki glejowe z cechami prze-



Ryc. 1. Hodowla kontrolna, 18 dni *in vitro*. Typowy obraz mieszanej astrocytarno-oligodendroglejowej strefy wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 200 \times

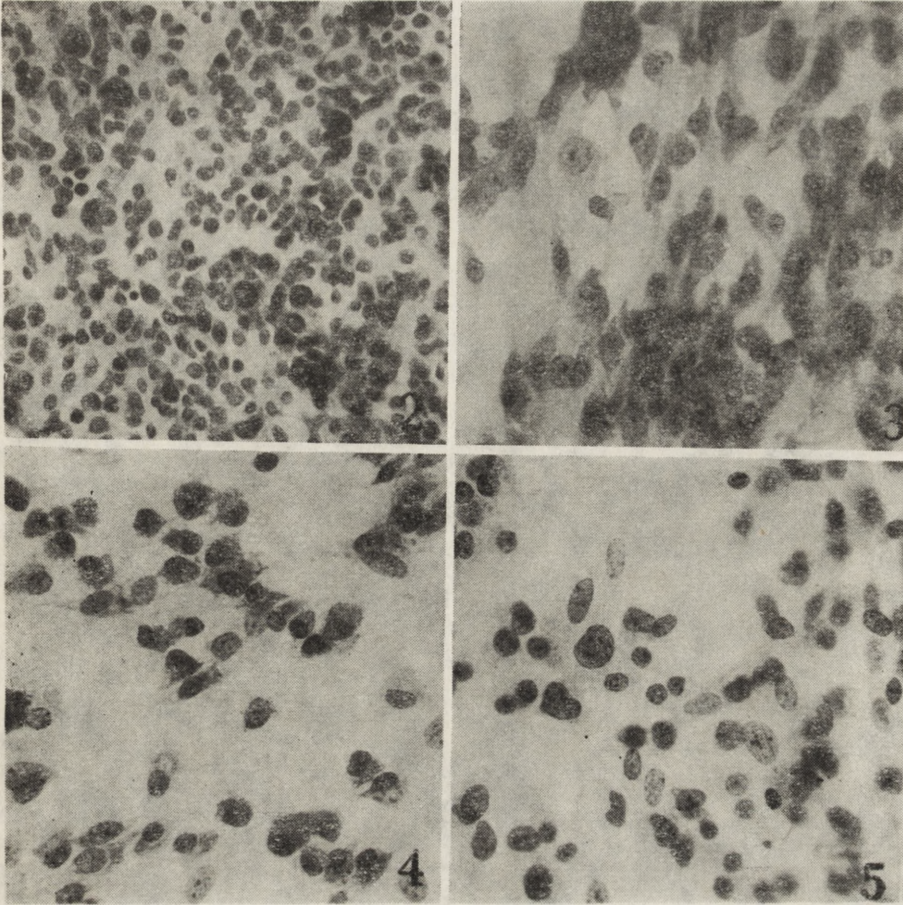
Fig. 1. Control culture, 18 days *in vitro* (DIV). Typical picture of mixed astrocytic-oligodendrocytic outgrowth zone. Toluidine blue. \times 200

rostu, przypominające typowe gemistocyty, różniące się jedynie od nich stosunkowo dobrze zachowanymi wypustkami (ryc. 4). Nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe astrocytów, polegające na nagromadzeniu wodniczek w cytoplazmie, zatarciu zarysów błon cytoplazmatycznych i rozpadzie wypustek były na ogół mniej zaznaczone. Były stosunkowo nieliczne w przypadku surowicy chorej B. z najkrótszym okresem trwania procesu chorobowego (ryc. 5), a nieco obfitsze z surowicą od chorego D. z dwuletnim wywiadem chorobowym (ryc. 6). Były natomiast najsilniej wyrażone przy użyciu surowicy pacjenta W. z najbardziej zaawansowanym i najdłuższym przebiegiem choroby (ryc. 7). Tę samą zależność stwierdzono w stosunku do częstości występowania i obfitości komórek Alzheimerera typu II. Występując pojedynczo w przypadku B., nieco częściej w przypadku D., stanowiły zjawisko dość pospolite w przypadku surowicy W. (ryc. 8). Komórki Opalskiego w całym materiale występowały sporadycznie. Podobnie jak nagie jądra, spotykano je najczęściej w przypadku surowicy chorego W. (ryc. 9). W pozostałych przeważały komórki przejściowe między uformowanymi komórkami Opalskiego a przerośniętymi astrocytami.

Obraz immunomorfologiczny

Odczyn immunohistochemiczny wykazywał wyraźną zależność od charakteru i nasilenia nieprawidłowości strukturalnych komórek glijowych. W hodowlach z przewagą procesów przerostowych był on silniejszy, a znacznie słabszy przy nasileniu zmian zwyrodnieniowych.

Najsilniejszą fluorescencję stwierdzano w dużych, przerośniętych astrocytach z obfitą cytoplazmą i dobrze zachowanymi wypustkami. Ja-



Ryc. 2. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Obfita populacja glejowa z licznymi dużymi hiperchromatycznymi jądrami. Pobrzeże strefy wzrostu i eksplantatu. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×

Fig. 2. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Dense glial population from the explant periphery with numerous, enlarged, hyperchromatic nuclei. Toluidine blue. × 200

Ryc. 3. Hodowla doświadczalna, surowica B., 18 dni *in vitro*. Wśród typowego astrocytarnego utkania strefy wzrostu widoczne gniazda komórek z hiperchromatycznymi jądrami. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

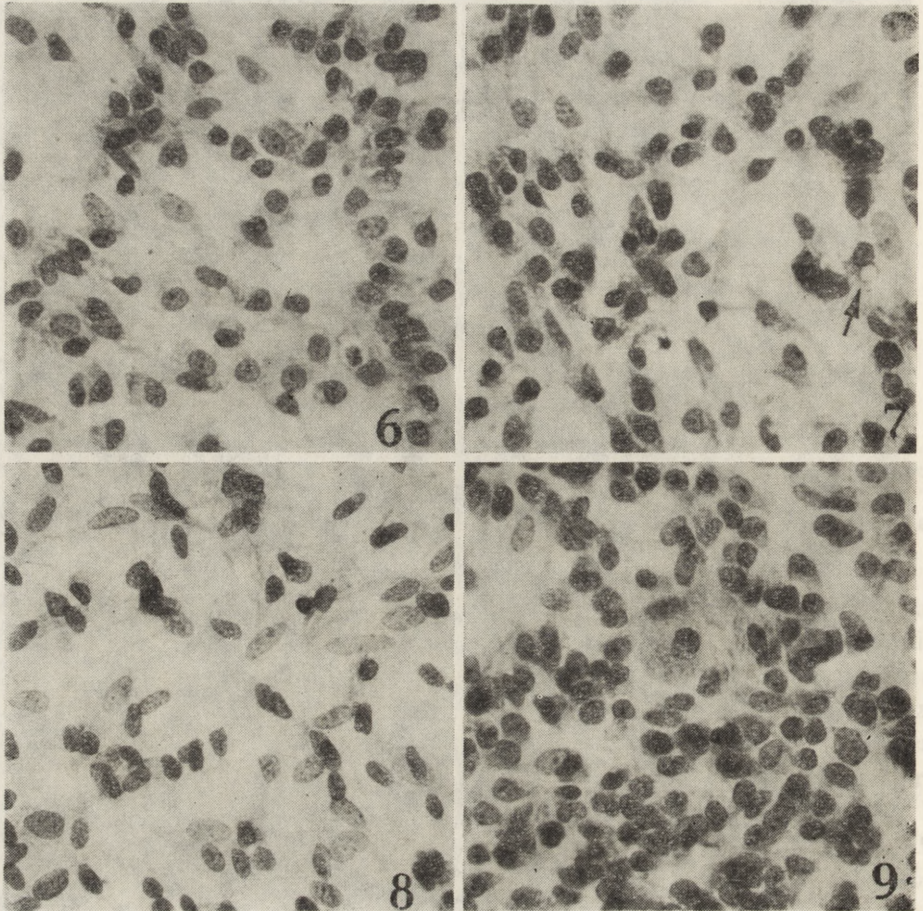
Fig. 3. Experimental culture, 18 DIV, serum B. In typical astrocytic population of the outgrowth zone, nests of hyperchromatic nuclei are visible. Toluidine blue. × 400

Ryc. 4. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Gemistocytopodobne komórki glejowe w strefie wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

Fig. 4. Experimental culture, 18 DIV, serum D. Gemistocyte-like glial cells from the outgrowth zone. Toluidine blue. × 400

Ryc. 5. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 dni *in vitro*. Astrocyty strefy wzrostu ze słabo widoczną cytoplazmą, w znacznej części pozbawione wypustek. Widoczne pojedyncze nagie jądra. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

Fig. 5. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Astrocytes from the outgrowth zone with hardly visible contours of cytoplasm and processes. Some naked nuclei are present. Toluidine blue. × 400



Ryc. 6. Hodowla doświadczalna, surowica D, 18 dni *in vitro*, surowica D. Astrocyty strefy wzrostu ze słabo widocznymi zarysami cytoplazmy, w większości pozbawione wypustek. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 6. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Most of the astrocytes from outgrowth zone deprived of cytoplasm and processes. Toluidine blue. \times 400

Ryc. 7. Hodowla doświadczalna, surowica W., 17 dni *in vitro*. Ciężko uszkodzone komórki strefy wzrostu. Niektóre z widocznymi wodniczkami w cytoplazmie (strzałka). Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

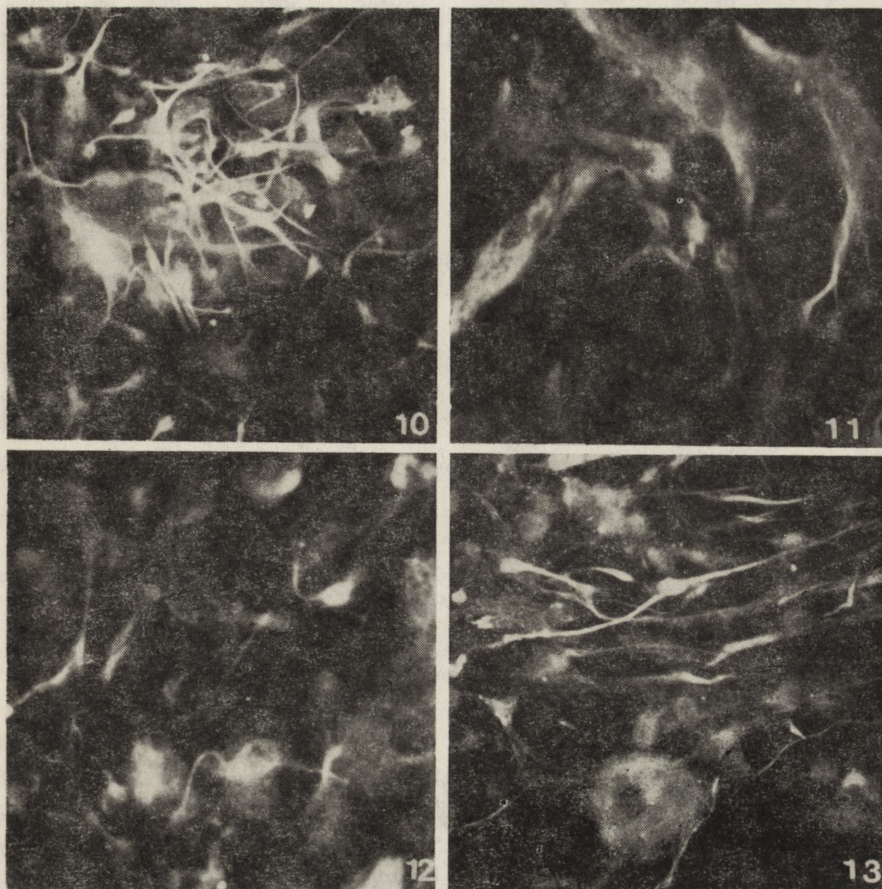
Fig. 7. Experimental culture, serum W., 17 DIV. Severely damaged astrocytes from outgrowth zone; some of them with intracytoplasmic vacuoles (arrow). Toluidine blue. \times 400

Ryc. 8. Hodowla doświadczalna, surowica W., 18 dni *in vitro*. Obficie nagromadzone komórki Alzheimer'a typu II w strefie wzrostu hodowli. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 8. Experimental culture, serum W., 18 DIV. Abundant accumulation of Alzheimer, type II cells in the outgrowth zone. Toluidine blue. \times 400

Ryc. 9. Hodowla doświadczalna, surowica W., 19 dni *in vitro*. Komórka Opalskiego wśród obficie nagromadzonych komórek strefy wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 9. Experimental culture, serum W., 19 DIV. Opalski cell in the outgrowth zone. Toluidine blue. \times 400



Ryc. 10. Hodowla doświadczalna, surowica B., 18 dni *in vitro*. Intensywna fluorescencja przerosłych astrocytów strefy wzrostu. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 10. Experimental culture, serum B., 18 DIV. Intense immunofluorescence reaction in hypertrophied astrocytes within outgrowth zone. GFAP. × 400

Ryc. 11. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Odczyn immunofluorescencji w przerosłych astrocytach, wykazujący związek z włóknistymi strukturami cytoplazmatycznymi. GFAP. Pow. 800 ×

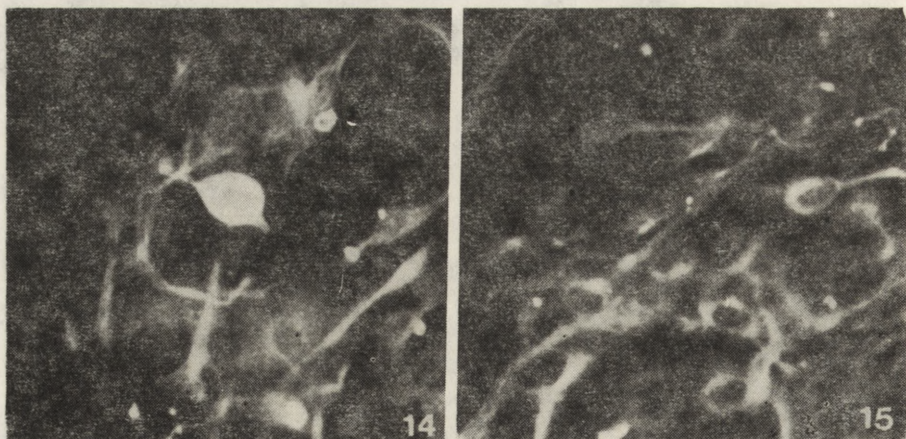
Fig. 11. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Immunofluorescence reaction in hypertrophied astrocytes, connected with intracytoplasmic fibrillary structures. GFAP. × 800

Ryc. 12. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 dni *in vitro*. Słaby odczyn immunofluorescencyjny w uszkodzonych astrocytach pozbawionych wypustek. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 12. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Weak immunofluorescence in damaged astrocytes deprived of cellular processes. GFAP. × 400

Ryc. 13. Hodowla doświadczalna, surowica W., 19 dni *in vitro*. Umiarkowany odczyn immunofluorescencyjny w komórce Opalskiego. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 13. Experimental culture, serum W., 19 DIV. Moderate immunofluorescence in Opalski cell. GFAP. × 400



Ryc. 14. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 *in vitro*. Silna fluorescencja w komórce przejściowej. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 14. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Strong immunofluorescence in a transitory cell. GFAP. × 400

Ryc. 15. Hodowla doświadczalna, surowica W., 18 dni *in vitro*. Zmienne natężenie odczynu immunofluorescencyjnego w komórkach Alzheimerera typu II. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 15. Experimental culture, serum W., 18 DIV. Immunofluorescence reaction of varying intensity in Alzheimer type II cells. GFAP. × 400

skrawa fluorescencja ostro obrysowywała kontury perykarionalnej cytoplazmy i grubych wypustek (ryc. 10). W licznych hipertroficznym komórkom gwiaździstych stwierdzało się związki świecenia z siatkowatymi lub pasmowatymi włóknistymi strukturami śródplazmatycznymi (ryc. 11). W przypadku komórek z cechami zwyrodnienia, a zwłaszcza z fragmentacją wypustek, odczyn immunofluorescencyjny był znacznie słabszy i bardziej zróżnicowany od wyraźnego do ledwie dostrzegalnego (ryc. 12). Komórki Opalskiego charakteryzowały się żywą fluorescencją (ryc. 13), która była jednakże mniej intensywna niż w przerosłych astrocytach. Nieco żywszy odczyn, zawsze o charakterze dyfuzyjnym lub ziarnistym, występował w komórkach przejściowych między uformowanymi komórkami Opalskiego i hipertroficznymi astrocytami (ryc. 14). Wyróżniały się one w stosunku do typowych komórek Opalskiego mniejszymi rozmiarami i obecnością resztkowych wypustek. Charakter odczynu immunofluorescencyjnego w komórkach Alzheimerera typu II wykazywał znaczne zróżnicowanie od ledwie dostrzegalnego do żywego świecenia, o zmiennej szerokości, otaczającego powiększone, zazwyczaj owalne jądra komórkowe (ryc. 15).

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki wskazują, że zastosowanie surowic od leczonych d-penicylaminą chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym pozwala na uzyskanie uszkodzeń gleju typowych dla gliopatii wilsonow-

skiej. Różnią się one jednak od zmian stwierdzanych w hodowlach z surowicami od chorych nieleczonych (Mossakowski i wsp. 1970; Mossakowski, Weinrauder 1984). Podstawowa różnica polega na przewadze uogólnionych procesów rozplemowych i przerostowych, przy znacznie mniej nasilonych nieswoistych zmianach zwyrodnieniowych i rzadkim występowaniu nieprawidłowych postaci astrocytów, typowych dla choroby Wilsona, takich jak komórki Alzheimerera typu II i komórki Opalskiego. Ogólny wzorzec zmian przypomina pod tym względem bardziej obraz ostrej encefalopatii wątrobowej u ludzi (Mossakowski i wsp. 1983) oraz wczesnej fazy encefalopatii wątrobowej u zwierząt doświadczalnych (Norenberg i wsp. 1972, 1974; Hilgier i wsp. 1983), niż nieprawidłowości typowe dla zaawansowanej choroby Wilsona. Zwraca przy tym uwagę obecność przerośniętych, hiperchromatynowych jąder glejowych, niespotykanych w poprzednich badaniach nad encefalopatią wilsonowską *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970).

Wydaje się, że stosunkowo nikły stopień uszkodzenia astrocytów w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w przypadku surowic od chorych nieleczonych wiązać należy z obniżoną zawartością miedzi we wszystkich użytych surowicach, niższą niż wartości kontrolne u ludzi zdrowych (norma laboratoryjna 85—120 $\mu\text{g}/100$). Zwraca równocześnie uwagę drastyczne obniżenie we wszystkich przypadkach, niezależnie od leczenia, aktywności ceruloplazminy (w przypadku jednego chorego do wartości nieoznaczalnych). Wskazuje to na możliwość przesunięcia proporcji miedzy miedzią związaną i wolną w surowicy. W warunkach prawidłowych miedź związana stanowi około 98% jej ogólnej zawartości w surowicy, podczas gdy miedź wolna nie przekracza 2—5%. W zaawansowanej chorobie Wilsona miedź wolna sięga wartości 40–60%. W tej sytuacji wydaje się prawdopodobne, iż mimo obniżenia bezwzględnej zawartości miedzi w stosowanych surowicach, wobec znacznego spadku aktywności ceruloplazminy, zawartość miedzi wolnej mogła być wystarczająca dla wywołania uszkodzeń komórkowych, choć mniej nasilonych, niż w przypadku surowic chorych nie leczonych. Ich nasilenie i typowość nie wykazywały przy tym zależności od bezwzględnej zawartości miedzi, lecz bardziej od aktywności ceruloplazminy, mimo iż nie stanowi ona wskaźnika stopnia wiązania miedzi. W dwóch przypadkach o jednakowym poziomie miedzi w surowicy bardziej nasilone i typowe zmiany komórkowe występowały przy nieoznaczalnej aktywności ceruloplazminy. Zależność ta zbieżna była z czasem trwania choroby i stopniem jej zaawansowania. Najbardziej charakterystyczne nieprawidłowości astrocytów znamionowały surowicę od pacjenta z najdłuższym wywiadem chorobowym, najmniej nasilone — z najkrótszym.

Badania immunomorfologiczne potwierdziły poprzednie spostrzeżenia, iż zmienione komórki glejowe zachowywały antygenowe właściwości astrocytów (Mossakowski, Weinrauder 1984). Wszystkie ich postaci wyka-

zywały obecność kwaśnego białka włókienek glejowych uznanego za swoisty znacznik komórek gleju gwiaździstego (Eng i wsp. 1971; Bignami i wsp. 1972; Ludwin i wsp. 1976).

Intensywność odczynu immunofluorescencyjnego była zróżnicowana w zależności od charakteru zmian strukturalnych. Była ona najwyższa w przerośniętych astrocytach, wykazując tu wyraźny związek z włóknistymi strukturami cytoplazmatycznymi oraz w komórkach Opalskiego. Była znacznie mniejsza w komórkach gwiaździstych z cechami zwyrodnienia, a w komórkach Alzheimerera typu II znamionowało ją znaczne zróżnicowanie od wyraźnego do śladowego.

To ostatnie zjawisko wymaga odrębnego omówienia w świetle spostrzeżeń Sobela i wsp. (1981) oraz Kimury i Budki (1984), którzy w materiale encefalopatii wątrobowej u ludzi stwierdzili całkowity brak odczynu z surowicami anti-GFAP. Pierwsi z nich fakt ten skłonni są wiązać z uszkodzeniem przez podstawowy czynnik (lub czynniki) patogenetyczny procesów syntezy białek w zmienionych astrocytach. Za interpretacją taką przemawiać mogą badania Albrechta (1981), który metodami biochemicznymi stwierdził upośledzenie syntezy RNA w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Morfologiczny charakter badań własnych ogranicza możliwość dyskusji nad tym mechanizmem. Wydaje się, że odmienność naszych spostrzeżeń może być uwarunkowana przez cały szereg czynników, w tym przede wszystkim charakter materiału — pozaustrojową hodowlę tkanki nerwowej, w której nie mamy do czynienia z komórkami Alzheimerera typu II występującymi w warunkach *in situ*, a jedynie z komórkami do nich morfologicznie podobnymi. Drugim czynnikiem, który należy brać pod uwagę jest stosowana technika odczynu immunomorfologicznego — fluorescencyjna w naszym przypadku, metoda PAP (peroksydaza-antyperoksydaza) w materiale zarówno Sobela i wsp. (1981), jak i Kimury i Budki (1984). Uwzględnić należy również fakt, że badania ich, prowadzone na materiale ludzkim, a Albrechta (1981) na materiale doświadczalnym, dotyczyły encefalopatii wątrobowej, podczas gdy w doświadczeniach własnych stosowano surowicę od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym. Mimo zasadniczego podobieństwa, jeśli nie identyczności morfologicznej komórek Alzheimerera typu II w obu procesach chorobowych, różnice etiologiczne i patogenetyczne mogą wpływać na odrębności biologiczne strukturalnie identycznych form komórkowych. Rola tego czynnika wydaje się jednak drugorzędna, ponieważ w poprzednich badaniach wykazano obecność dodatniego odczynu immunohistochemicznego w komórkach Alzheimerera, typu II, uzyskanych zarówno z surowicami od chorych ze śpiączką wątrobową, jak i ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (Mossakowski, Weinrauder 1984).

W świetle tych spostrzeżeń wydaje się uzasadnione zwrócenie uwagi na fakt, iż nagie jądra, stanowiące zmienione patologicznie astrocy-

ty, w obrazie mikroskopowo-elektronowym charakteryzują się bardzo znacznym zubożeniem organelli cytoplazmatycznych (Norenberg, Lapham 1974; Norenberg 1977; Mossakowski i wsp. 1984). Niekiedy przybierają one postać powiększonych, ubogochromatynowych jąder zawieszonych w wodnistej cytoplazmie, całkowicie pozbawionej struktur subkomórkowych (Ostenda i wsp. 1976). Przekształcenie astrocytu w komórkę Alzheimerera typu II jest procesem postępującym, stąd też mogą obok siebie występować komórki o różnym stopniu uszkodzenia struktur cytoplazmatycznych, co tłumaczyłoby zróżnicowanie odczynu ujawniającego GFAP, aż do jego całkowitego zaniku. Na taką możliwość wskazują badania immunomorfologiczne, przeprowadzone na autopsyjnym materiale przypadku choroby Wilsona, w których wykazano, że wśród przeważającej populacji nagich jąder z ujemnym odczynem na GFAP występują również dodatnie immunomorfologicznie typowe komórki Alzheimerera typu II (Mossakowski, Weinrauder 1986).

Wysoco prawdopodobne jest przy tym współistnienie obu czynników: metabolicznego i strukturalnego, a nawet ich wzajemny związek przyczynowy.

Autorzy dziękują dr Elisabeth Bock z Protein Laboratory, Copenhagen University, za dostarczenie surowicy do badań.

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ, СТРАДАЮЩИХ ГЕПАТО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ И ПРОШЕДШИХ КУРС ЛЕЧЕНИЯ ПЕНИЦИЛАМИНОМ НА РАЗВИТИЕ *IN VITRO* ВИЛЬСОНОВОЙ ГЛИОПАТИИ

Резюме

Авторы исследовали влияние сывороток, полученных от больных, страдающих гепато-церебральной дегенерацией и прошедших курс лечения пеницилламином, на морфологическую и иммуноморфологическую картину органотипических культур нервной ткани. Для данных сывороток характерно значительное понижение как содержания меди, так и активности церулоплазмينا. Обнаружены существенные различия между воздействием данных сывороток и сывороток больных, не прошедших курса лечения. Различия заключались в более высоком содержании глиальных клеток и в преобладании гипертрофии астроцитов над их неспецифической дегенерацией. Выступали также патологические формы астроцитов, характерные для Вильсоновой глиопатии, как например, клетки Альцгеймера II типа и клетки Опальского. Интенсивность дегенеративных изменений и обилие голых ядер зависели от стадии болезни и степени падения активности церулоплазмينا в сыворотке. Все формы астроцитов, как с признаками гипертрофии, так и дегенерации, а также клетки Альцгеймера II типа и клетки Опальского проявляли положительную иммунофлуоресцентную реакцию на сыворотку, содержащую антитела к кислому фибриллярному белку (GFAP).

Авторы выдвигают предположение, что меньшая интенсивность патологических изменений в астроцитах по сравнению с воздействием сывороток, полученных от больных, не прошедших курса лечения, связана с более низким содержанием меди в примененных сыворотках. Однако сопутствующее падение активности церулоплазмينا привело к нарушению равновесия между связанной и свободной медью. В этих условиях содержание последней могло быть достаточно высоким, чтобы вызвать характерные повреждения астроцитов.

INFLUENCE OF SERA FROM PATIENTS WITH HEPATO-LENTICULAR
DEGENERATION TREATED WITH D-PENICILAMINE
ON THE DEVELOPMENT OF WILSONIAN GLIOPATHY IN VITRO

Summary

Studies on the influence of sera from patients with Wilson's disease treated with d-penicilamine upon morphology and immunomorphology of astrocytes in organotypic cultures of newborn rat cerebella were performed. The pathological sera applied were characterized by significant reduction of both copper level and ceruloplasmine activity. Remarkable differences were found as compared with the influence of sera from untreated patients. They consisted in greater cellularity of cultures and predominance of astrocytic hypertrophy over nonspecific cellular degeneration. However, astrocytic abnormalities, typical for Wilsonian gliopathy such as Alzheimer cells, type II and Opalski cells were also present.

Intensity of degenerative changes of astrocytes and frequency of Alzheimer cells type II and Opalski cells appearance were correlated with the advancement of the disease process and degree of ceruloplasmine activity reduction. All abnormal astrocytes both showing features of hypertrophy and degeneration gave positive immunofluorescent reaction with anti-GFAP serum. So did Alzheimer cells, type II and Opalski cells.

The authors supposed that less severe astrocytic abnormalities as compared with those obtained with sera from untreated patients were due to lowered copper content in sera used in present experiments. However, disturbed proportion between bound and free copper in sera resulting from reduction of ceruloplasmine activity could be responsible for the appearance of Wilsonian gliopathy features, even under conditions of lowered general content of copper.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Cerebral RNA synthesis in experimental hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.*, 1981, 6, 555—558.
2. Bignami A., Eng L. F., Dahl D., Uyeda C. T.: Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 1972, 43, 420—435.
3. Eng L. F., VanderHaegen J. S., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
4. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
5. Kimura T., Budka H.: GFA and S-100 proteins in degenerative and neoplastic glial disease: a comparison by immunocytochemistry. Second European Conference for Neuropathology. Abstracts. Warsaw, September 20—22. 1984, p. 39.
6. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
7. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S-100 and GFAP proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.*, 1976, 165, 179—208.
8. Mossakowski M. J., Borowicz J. W., Hilgier W.: Electron microscopy of hepatogenic encephalopathy in rats induced by thioacetamide intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 185—195.

9. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ D-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 57—74.
10. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby. *Przegląd. Epidem.*, 1983, 37, 219—230.
11. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1970, 16, 1—16.
12. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 161—178.
13. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Glial fibrillary acidic protein and S-100 in abnormal astrocytes in Wilson's disease. *Neuropat. Pol.*, 1986 (w druku).
14. Norenberg M. D.: A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Lab. Invest.*, 1977, 36, 618—627.
15. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscope study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 422—435.
16. Norenberg M. D., Lapham L. W., Eastland M. W., May A. G.: Diffusion of protoplasmatic astrocytes in acute experimental hepatic encephalopathy. *Am. J. Path.* 1972, 67, 403—411.
17. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.
18. Sobel R. A., DeArmond S. J., Forno L. S., Eng L. F.: Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1981, 40, 625—632.

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