

ZUZANNA KRAŚNICKA, MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI,
KRYSTYNA RENKAWEK

MORPHOLOGIE ET HISTOCHIMIE DE NEURONES
DE GANGLIONS SPINAUX CULTIVÉS *IN VITRO*
DANS LES CONDITIONS D'ANOXIE *)

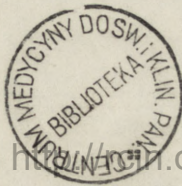
Centre de la Médecine Expérimentale et Clinique de l'Académie Polonaise
des Sciences, Département de Neuropathologie
Chef de Département: prof. agr. M.J. Mossakowski

La sensibilité du système nerveux central à l'anoxie est un fait évident. Les différents degrés de la sensibilité des structures particulières et des éléments cellulaires du système nerveux central sont également connus. Les cellules nerveuses et leurs prolongements manifestent une sensibilité la plus marquée. La vulnérabilité sélective manifeste en plus une différenciation dans la population neuronale intervenue probablement en fonction de différences métaboliques des cellules nerveuses particulières.

La plupart des expériences dans ce domaine ont été effectuées sur le matériel animal, les changements intervenus dans les tissus nerveux *in vivo* constituaient l'objectif des recherches. Il est reconnu que l'anoxie de tout l'organisme et même du système nerveux seul provoque toute une série de réactions de tout l'ensemble des organes et qui s'accumulent sur les altérations entraînées par l'anoxie.

Dans cette optique au cours des dernières années nous nous sommes attaquées dans notre laboratoire aux recherches relatives à l'influence de l'anoxie sur le tissu nerveux cultivé *in vitro*. Nous avons présenté les résultats de nos recherches relatives à la nevroglie dans les publications parues précédemment (Kraśnicka et coll. 1967a, 1967b, Renkaweck 1967, Kraśnicka, Renkaweck 1969). L'objectif de notre présente communication est d'évaluer les changements morphologiques et histoenzymatiques des neurones dans les conditions de culture soumis à l'action de l'anoxie. L'objet d'un examen détaillé est de les analyser en fonction de la durée de l'anoxie et du degré de la maturité du tissu cultivé.

*) Ce travail a été réalisé avec l'aide de PL 480 U.S. Public Health. Service accord 227704.



MATERIEL ET METHODES

Les recherches étaient effectuées sur les cultures de ganglions spinaux d'embryons de poulet de neuf jours. Les cultures étaient maintenues dans les flacons de Carrel pendant une à quatre semaines. Pour obtenir les conditions expérimentales d'anoxie on a utilisé un flacon de Carrel modifié (Kraśnicka et coll. 1967a). Les cultures croissantes dans les conditions standardisées dans les flacons de Carrel jusqu'à l'âge requis 1, 2, 3, 4 semaines ont été transportées dans les conditions stériles dans les flacons modifiés. Ensuite après avoir servi le milieu à composition normale on a ajouté de l'azote. On a fait passer de l'azote par les flacons pendant trois minutes et ensuite on a fermé les voies d'introduction et de dérivation. On maintenait les cultures dans l'atmosphère d'azote au cours d'une, trois, douze et vingt quatre heures. Ensuite on a procédé aux examens histologiques et enzymatiques. Le tableau 1 présente les méthodes histologiques, histo-chimiques et histoenzymatiques utilisées. En vue de chaque analyse enzymatique on a effectuée des contrôles en faisant incuber des cultures supplémentaires dans les mélanges dépourvues de substrats

Tableau 1. Méthodes histologiques, histochimiques et enzymatiques

Methodes histologiques et histochimiques	Nissl Bodian PAS PAS-Dimedon Noir Soudan B
Enzymes oxydoreductifs	G-6-PDH Hess et coll. *) LDH SDH Scarpelli et coll. **)
Enzymes du cycle Lelcir-Cardini	Ph-ase Takeuchi et Kuriaki ***) UDPG-G-ase Takeuchi et Glenner ****)

*) Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. E. G.: The cytochemical localisation of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide — linked dehydrogenases. *J. biophys. biochem. dytol.* 1958, 4, 753—760.

**) Scarpelli D. G., Hess R., Pearse A. E. G.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1958, 4, 747—752.

***) Takeuchi T., Kuriaki K.: Histochemical detection of phosphorylase in animals tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1955, 3, 153—160.

****) Takeuchi T., Glenner G.: Histochemical demonstration of uridine diphosphate glucose-glycogen transpherase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1961, 9 304—316.

demandés. Pour comparer les changements morphologiques et enzymatiques on a effectué des examens de contrôle sur les cultures de ganglions spinaux maintenues dans les conditions standardisées et dans les périodes requises de la croissance des cultures.

RESULTS

Groupe I — Anoxie d'une heure.

Les changements morphologiques intervenus dans les neurones de ganglions spinaux se font remarquer dans tous les groupes d'âge des cultures. Ils consistent en tigrolyse, en dégénération vacuolaire et en gonflement cellulaire. Les noyaux des cellules satelitaires autour des neurones sont manifestement accrus.

Dans la méthode PAS après une heure d'anoxie de petites agglomérations de granules PAS positives dans les neurones particuliers se font remarquer (fig.1). Dans la méthode PAS-dimedon on ne décèle la présence de glycogène ni en neurones, ni en cellules satelitaires qui les accompagnent, dans aucune période des cultures.

Dans la méthode de Bodian après une heure d'anoxie on ne remarque pas d'altérations des neurofibrilles ni dans les jeunes ni dans les vieilles cultures. Dans ce groupe experimental on ne décèle pas non plus de changements pathologiques en coloration de Soudan noir B.

Sous l'action d'une heure d'anoxie les neurones sensitifs manifestent l'activité de deshydrogenases lactique et glucose-6-phosphatique insensiblement diminuée (fig. 2, 3). Les grains de la réaction enzymatique dans la cytoplasme sont disposée irrégulièrement. L'intensité de l'activité de ces deshydrogenases diffère d'une cellule à l'autre, mais dans la plupart des cellules l'activité enzymatique est moins élevée que dans les cultures de conditions standardisée. L'activité de deshydrogenase succinique est la plus faible (fig. 4). Les petits grains de la réaction enzymatique sont aussi irrégulièrement disposés dans les cellules. Les ampicites et les cellules de Schwann manifestent également l'activité de ces enzymes sensiblement diminuée.

Dans ce groupe experimental l'activité des enzymes métabolisant le glycogène (de la phosphorylase et de la synthethase glykogénique) est assez forte et correspond à l'intensité de l'activité de ces enzymes dans les conditions normaux. Dans l'anoxie on remarque aussi l'activité de la phosphorylase plus intense que celle de la synthethase glykogénique.

Groupe II — Anoxie de trois heures.

En comparaison avec les résultats du groupe I les changements morphologiques sont plus intenses. Le nombre et la taille des vacuoles

dans les neurocytes augmente. La tigrolyse est plus avancée. Les petits grains de tigroïde se trouvent sous la membrane cellulaire.

Dans la méthode de Bodian après trois heures d'anoxie les premiers changements des neurofibrilles se font détecter. Les neurofibrilles sont disposées d'une façon irrégulière, parfois elles sont groupées sur la périphérie de la cellule. Dans la méthode PAS après trois heures d'anoxie la quantité de substances PAS positives augmente insensiblement dans les cellules satellitaires, tandis que dans les neurones elle apparaît en moindre quantité.

Dans ce groupe d'anoxie on observe que l'activité des deshydrogenases baisse toujours et l'activité de phosphorylase et de synthétase glycogénique dans le cytoplasme des neurones augmente (fig. 5).

Groupe III — Anoxie de douze heures.

En comparaison avec les résultats des groupes précédents on observe une augmentation croissante des changements dégénératifs. Dans la méthode de Nissl tous les neurones sont dépourvus des grains de tigroïde. Souvent on remarque aussi des changements dans les noyaux, s'exprimant en atrophie de la membrane nucléaire. Les nucléoles se tiennent le plus longtemps. Autour des neurones on remarque une forte prolifération des cellules satellitaires et leurs noyaux gonflés (fig. 6).

Dans la méthode PAS après douze heures d'anoxie la plupart des neurones sont dépourvus de granules PAS positives, tandis que les cellules satellitaires accumulent des quantités considérables de cette substance (fig. 7).

Parfois on trouve des produits sphériques PAS positifs dans le cytoplasme.

Dans la méthode PAS-dimedon après douze heures d'anoxie on ne décèle pas la présence de glycogène dans les cultures.

Dans la méthode de Bodian dans ce groupe expérimentale toutes les neurofibrilles sont manifestement déplacées sous la membrane cellulaire dans les neurones conservés. De plus les axones manifestent des renflements irréguliers (fig. 8).

Après douze heures d'anoxie l'activité de la deshydrogenase lactique et glucose-6-phosphatique est très faible, l'activité de la deshydrogenase succinique est insignifiante ou même indétectable. Dans ce groupe d'anoxie seule l'activité de la phosphorylase et de la synthétase du glycogène est augmentée sensiblement.

Groupe IV — Anoxie de vingt quatre heures.

Le changement le plus essentiel dans ce groupe d'anoxie est la désintégration de gaine myélinique. Au cours de la coloration avec

du Soudan noir B les cultures précédemment manifestent une demyelination accompagnée d'une fragmentation de myéline (fig. 9).

Les changements morphologiques et enzymatiques remarquées dans ce groupe ressemblent aux résultats du groupe d'anoxie de douze heures (fig. 10, 11). Outre de l'intensité des changements pathologiques observés dans les groupes précédents une plus grande atrophie des neurocytes se fait remarquer.

Dans tous les groupes expérimentaux les cultures jeunes manifestent des changements pathologiques les plus intenses et l'affaiblissement de l'activité des deshydrogenases le plus marqué. Les cultures plus vieilles sont affectées de changements moins avancés et l'activité des enzymes baisse moins sensiblement.

DISCUSSION

Les neurones sensitifs de ganglions spinaux maintenus in vitro dans les conditions d'anoxie manifestent des changements morphologiques et histoenzymatiques dans tous les groupes d'âge de la culture. Le caractère et l'intensité des changements dépendent de la durée de leur séjour dans l'atmosphère sans oxygène et de l'âge de la culture au moment initial de l'action du facteur altérant. L'intensité des changements est en proportion de la durée de l'anoxie, les changements pathologiques sont d'autant plus profonds et plus massifs que la durée de l'anoxie est plus longue. La lésion des cellules nerveuses dans les cultures jeunes (1—2 semaines) est plus manifeste que dans les cultures plus vieilles pendant la même durée de l'anoxie. Ce phénomène est contraire aux observations faites jusqu'ici sur les expériences effectuées sur les animaux qui avaient prouvé que les cellules embryonnaires sont moins sensibles à l'anoxie que les cellules mures. Cette divergence peut être expliquée, paraît-il de deux façons: 1° dans les conditions où l'embryon est traité *in toto* il existe quantité de mécanismes de tout l'organisme protégeant contre l'anoxie qui font défaut dans les cultures *in vitro*; 2° dans les premiers stades de la culture les cellules nerveuses sont en état de réaction axonale résultant de la lésion de l'axone, provoquée au cours du recuillement du matériel pour la culture (Kraśnicka 1969). Dans ce stade l'anoxie agit sur la cellule déjà altérée. Les changements pathologiques remarqués peuvent résulter d'une somme de facteurs nocifs.

Les changements morphologiques remarqués consistent en gonflement des cellules nerveuses, en tigrolyse, en dégénération vacuolaire, en dégénération de neurofibrilles, en fragmentation des axones et en démyélinisation. La sensibilité des éléments particuliers de la cellule à l'ano-

xie détermine la succession temporelle des changements apparus. La démyélinisation intervient après les changements qui s'étaient effectués dans les éléments péricariaux mais coïncide avec le temps de dégénération de l'axone et avec les changements intervenus dans les cellules de Schwann. Cela peut prouver qu'il existe un rapport causal entre la démyélinisation et les changements de neurone et de cellules Schwann.

La disparition de glycogène en cytoplasme de neurone dans les conditions d'anoxie attire un intérêt particulier. Dans les conditions standardisées les dépôts abondants glycogènes s'accumulent dans leur cytoplasme dans la période entre la 1-ère et la 3-ème semaine de la croissance de la culture. Les observations histochimiques peuvent expliquer la disparition de glycogène.

Le passage de la culture dans les conditions d'anoxie sur la voie de glucolyse anaerobique énergétiquement moins effective aboutit à une mobilisation de tous les matériels de réserve, y compris le glycogène s'accumulant en cytoplasme de neurone qui traduit une réaction axonale (Kraśnicka 1969, Szumańska, Rap 1971). L'abolition de glycogène est accompagnée d'une activité augmentée des enzymes métabolisant le glycogène, avant tout les phosphorylases qui prennent part au processus catabolique. Il y a lieu d'attirer attention sur le fait que les enzymes cytoplasmiques métabolisant le glycogène ont été les seuls qui aient manifesté une activité augmentée au cours de l'anoxie. C'est probablement dû à la mobilisation de toutes les carbohydrates de réserve sous l'influence de l'afflux limité de l'oxygène et à la résistance de ces enzymes à l'anoxie dont avait parlé Mossakowski et coll. (1968) et Long et coll. (1969). Ces chercheurs ont souligné l'activité accrue de la phosphorylase et de la transphérase glycogénique en cellule gliale et en neurone sous l'influence de l'anoxie.

Une chute fort sensible de l'activité de deshydrogenase glucose-6-phosphate, lactique et succinique prouve un grand affaiblissement des processus métaboliques de glucose sur toutes les étapes de son métabolisme, excepté le cycle Leloir-Cardini. Un affaiblissement fort et précoce de l'activité de deshydrogenase succinique est l'indice d'une lésion considérable de mitochondries.

CONCLUSIONS

1) Les neurones sensitifs cultivés in vitro dans les conditions d'anoxie manifestent des changements morphologiques et histoenzymatiques. La démyélinisation intervient après les changements qui s'étaient effectués

dans le cytoplasme des neurones mais coincide avec le temps de dégénération de l'axone et des cellules de Schwann.

2) La lésion des neurones dans les cultures jeunes est plus manifeste que dans les cultures plus vieilles pendant la même durée de l'anoxie.

3) Dans les conditions d'anoxie on observe la disparition de glycogène en cytoplasme des neurones.

4) Dans les conditions d'anoxie on observe la chute de l'activité des deshydrogenases et l'augmentation de l'activité des enzymes métabolisants le glycogène.

Z. Kraśnicka, M. J. Mossakowski, K. Renkawek

MORFOLOGIA I HISTOCHEMIA NEURONÓW CZUCIOWYCH IN VITRO W NIEDOTLENIENIU

S t r e s z c z e n i e

Przebadano morfologię i aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, bursztynianowej i mleczanowej oraz aktywność enzymów metabolizujących glikogen (fosforylazy i syntetazy glikogenowej) w neuronach czuciowych in vitro w warunkach doświadczalnego niedotlenienia.

Badania przeprowadzono na zwojach międzykręgowych pobieranych z 9-dniowych zarodków kurzych i hodowanych in vitro od 1 do 4 tygodni. Hodowle w wieku 1, 2, 3 i 4 tygodnie przetrzymywano w atmosferze czystego azotu od 1 do 24 godzin.

W warunkach doświadczalnego niedotlenienia neurony wykazywały zmiany morfologiczne w postaci tigrólizy, zwyrodnienia wodniczkowego, rozpadu włókien nerwowych i osłonek mielinowych. W żadnym okresie wzrostu hodowli nie stwierdzono gromadzenia glikogenu w neuronach. Zaobserwowano wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen oraz znaczny spadek aktywności badanych dehydrogenaz.

З. Красьницка, М. Я. Моссаковский, К. Ренкавек

MORFOLOGIA I HISTOCHIMIA SENSORNYCH NEURONÓW W TKANEWOJ KULTURZE W HIPOKSII

Резюме

Исследовали морфологию и активность глюкозо-6-фосфатной, янтарной и лактатной дегидрогеназ, а также активность ферментов метаболизирующих гликоген (фосфорилазы и синтетазы гликогена) в сенсорных нейронах in vitro в условиях экспериментальной гипоксии.

Исследования проводили на межпозвоночных ганглиях, взятых от 9-дневных куриных зародышей и выращиваемых in vitro в течение 1 до 4 недель. Культуры в возрасте 1, 2, 3 и 4 недели содержали в атмосфере чистого азота от 1 до 24 часов.

В условиях экспериментальной гипоксии нейроны обнаруживали морфологические изменения в виде тигролиза, вакуольной дегенерации, распада нервных волокон и миелиновых оболочек. В никаком периоде развития культуры не обнаруживали нагроможждения гликогена в нейронах. Наблюдали рост активности энзимов метаболизирующих гликоген и значительное снижение активности исследованных дегидрогеназ.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kraśnicka Z. Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju zarodkowym. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 395 — 434.
2. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Obraz morfologiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.* 1967a, 5, 115 — 123.
3. Kraśnicka Z., Renkawek K., Mossakowski M.J.: Aktywność enzymów oksydo-redukcyjnych w tkance glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.* 1967b, 5, 125 — 134.
4. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Morfologia i histochemia mikrogleju w hodowli tkankowej prowadzonej w warunkach prawidłowych i patologicznych. *Neuropat. Pol.* 1969, 7, 75 — 90.
5. Long D.M., Mossakowski M.J., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in central nervous system due to ischemia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1969.
6. Mossakowski M.J., Long D.M., Myers R.E., Rodrigez de Curet H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1968, 27, 500 — 516.
7. Renkawek K.: Aktywność enzymów hydrolitycznych w tkance glejowej hodowanej in vitro w atmosferze o zmiennej zawartości tlenu. *Neuropat. Pol.* 1967, 5, 135 — 148.
8. Szumańska G., Rap Z.: Zachowanie się glikogenu i enzymów metabolizujących glikogen w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego w zwyrodnieniu osiowym. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 111 — 128.

Adresse des auteurs: Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, ul. Dworkowa 3.

FIGURES

Fig. 1. La culture d'une semaine. Les petites agglomérations de granules PAS-positives les neurones. Dégénération vacuolaire de neurone. Après 1 heure d'anoxie. PAS, agr. 400X.

Ryc. 1. Hodowla 1-tygodniowa po 1 godzinie anoksji. Widoczne ziarnistości PAS + oraz wakuole w protoplazmie neuronów. PAS. X 400.

Fig. 2. La culture d'une semaine. L'activité de G-6-P dehydrogenase après 1 heure d'anoxie. Agr. 600 X

Ryc. 2. Hodowla 1-tygodniowa po 1 godzinie anoksji. Aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej. Pow. 600 X

Fig. 3. La culture de 2 semaines. L'activité de lactique deshydrogenase après d'une heure d'anoxie. Agr. 400 X

Ryc. 3. Hodowla 2-tygodniowa. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej po 1 godzinie anoksji. Pow. X 400

