

MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, ZUZANNA KRAŚNICKA,
BARBARA GAJKOWSKA

WPŁYW D-PENICYLAMINY NA OBRAZ GLIOPATII WĄTROBOWEJ W HODOWLI TKANKOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski
Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN
Kierownik Pracowni: doc. dr J. W. Borowicz

W poprzednich doświadczeniach prowadzonych na pozaustrojowej hodowli tkanki glejowej, uzyskano patologiczne postaci gleju typowe dla gliopatii, wspólnej dla choroby Wilsona i nieswoistych encefalopatii pochodzenia wątrobowego, przy użyciu surowic od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i ze śpiączką wątrobową (Mossakowski i wsp. 1970). Identyczne zmiany uzyskano przy podaniu do standardowego medium hodowlanego egzogennych soli miedzi i amonu.

Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, że we wszystkich modelach doświadczalnych, z wyjątkiem stosowanego egzogenego amoniaku, w patologicznych komórkach glejowych, przede wszystkim w komórkach Opalskiego, gromadziły się nieprawidłowe złogi miedzi (Mossakowski i wsp. 1976). Na możliwy udział miedzi w kształtowaniu gliopatii wątrobowej, poza chorobą Wilsona, wskazują również spostrzeżenia Śmiałka i Mossakowskiego (1974), którzy stwierdzili jej nieprawidłowe nagromadzenie w przypadkach ostrej encefalopatii wątrobowej. Podobnie Wender i Kozik (1973) znajdowali zwiększoną zawartość miedzi w przewlekłych przypadkach encefalopatii wrotno-układowej.

W oparciu o całokształt dotychczasowych spostrzeżeń (Mossakowski i wsp. 1970, 1975, 1976; Renkawek i wsp. 1973) wysunięto hipotezę, że wspólnym czynnikiem patogenetycznym dla gliopatii wilsonowskiej i wątrobowej jest względny lub bezwzględny niedostatek śródkomórkowego alfa-oksoglutaranu, stanowiącego podstawowe ogniwo głównej drogi detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Patogenetyczna rola miedzi polega natomiast na upośledzeniu produkcji endogennego

alfa-oksoglutaranu, na skutek zaburzenia metabolizmu komórkowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych (Mossakowski 1973).

W związku z powyższym wydawało się celowe prześledzenie wpływu d-penicylaminy, stanowiącej ze względu na zdolność wiązania jonów miedzi, powszechnie stosowany lek w zwyrodnieniu wątrobowo-soczewkowym, na obraz morfologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny gliopatii rozwijającej się pod wpływem surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona i śpiączką wątrobową oraz egzogennej miedzi i amoniaku.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na hodowli tkanki glejowej mózdzku noworodków szczurzych, prowadzonej w warunkach standardowych opisanych przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Posługiwano się hodowlami po 1- i 3-tygodniowym wzroście *in vitro* do badań histologicznych i histochemicznych, oraz 2-tygodniowymi w przypadku badań mikroskopowo-elektronowych. Doświadczenia przeprowadzono w 5 grupach przedstawionych w tabeli 1. Każdej grupie doświadczalnej, w której medium

Tabela 1. Układ doświadczenia
Table 1. Scheme of the experimental groups

Grupa Group	Wiek hodowli Age of culture	Składniki medium Medium content	Czas doświadczenia Time of experiment
I	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + penicylamina* Human serum + penicillamine*	3 dni days
II	1—3 tyg. weeks	Surowica od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym + penicylamina Wilsonian serum + penicillamine	3 dni days
III	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + octan miedzi (Cu ⁺⁺ 50γ/ml) + penicylamina Human serum + Cu acetate (Cu ⁺⁺ 50γ/ml) + penicillamine	3 dni days
IV	1—3 tyg. weeks	Surowica od chorych ze śpiączką wątrobową + penicylamina Serum from patient with hepatic coma + penicillamine	3 dni days
V	1—3 tyg. weeks	Surowica ludzka + chlorek amonu (100 mg%) + penicylamina Human serum + NH ₄ chloride (100 mg%) + penicillamine	3 dni days

*) Dawkę penicylaminy (5 mg%) dla hodowli obliczono na podstawie maksymalnej dawki dobowej na 1 kg wagi ciała, stosowanej w leczeniu choroby Wilsona.

*) Dose of penicillamine (5 mg%) for tissue culture was calculated from the maximum *per diem dosis per* kg/body weight used in Wilson's disease therapy.

odżywcze hodowli zawierało odpowiedni czynnik uszkodzający z dodatkiem d-penicylaminy (5 mg%), towarzyszyła odpowiednia grupa kontrolna bez podania leku.

Hodowle wszystkich grup opracowywano przy użyciu metod histologicznych (błękit toluidyny, hematoksylina-eozyna), histochemicznych (Sudan czarny B, PAS) i histoenzymatycznych (oznaczanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, glutaminowej i glukozo-6-fosforanowej).

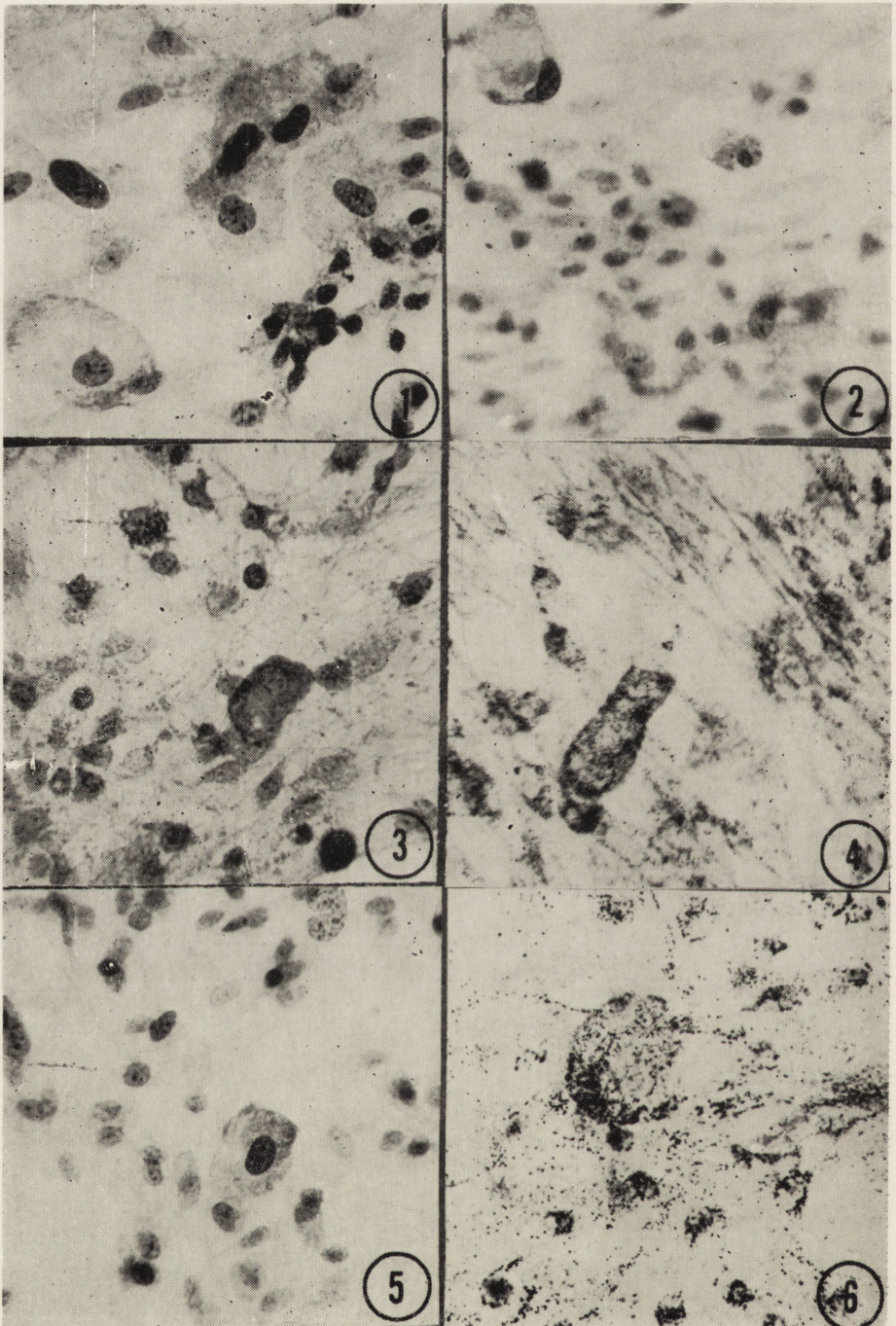
Materiał do badań w mikroskopie elektronowym opracowywano technicznie w sposób opisany przez Borowicza i Kraśnicką (1971). Ultra cienkie skrawki krojono na ultramikrotomie OmU2, f-my Reichert. Kontrastowano je octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał przeglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM 7A, przy napięciu przyspieszającym 80 KV.

Histochemiczną reakcję dla uwidocznienia miedzi na poziomie ultrastrukturalnym wykonywano wg metody Schenera i wsp. (1967).

WYNIKI

Grupa I. Podanie d-penicylaminy w dawce 5 mg% do 1- i 3-tygodniowych hodowli glejowych na okres 3 dni nie prowadziło do powstania jakichkolwiek nieprawidłowości strukturalnych i histochemicznych. Obraz histologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny hodowli wykazywał cechy właściwe dla tkanki glejowej hodowanej *in vitro* w odpowiednich fazach jej wzrostu i zróżnicowania (Kraśnicka, Mossakowski 1965, Renkawek 1972).

Grupa II. Po równoczesnym podaniu surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym z d-penicylaminą do 1-tygodniowej hodowli glejowej obraz gliopatii był znacznie słabiej wyrażony niż przy samej surowicy. Komórki Opalskiego spotykano jedynie sporadycznie. Ich rozmiary były mniejsze niż w hodowlach bez penicylaminy (ryc. 1, 2). Spotykano natomiast dość liczne postacie przejściowe między przerosłymi astrocytami i niezupełnie wykształconymi komórkami Opalskiego. Poronne postaci komórek Opalskiego charakteryzowało obfite nagromadzenie ziarnistości PAS-dodatnich (ryc. 3) i brak złogów sudanofilnych. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej w komórkach Opalskiego, a przede wszystkim przejściowych była jedynie nieznacznie obniżona w stosunku do ich aktywności w otaczających na ogół niezmiennych komórkach glejowych (ryc. 4). Reakcja ujawniająca aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej nie różniła się w nieprawidłowych komórkach od stwierdzanej w niezmiennym gleju.



Hodowle 3-tygodniowe w analogicznych warunkach wykazywały zmiany jeszcze mniej nasilone niż hodowle 1-tygodniowe. Spotykano zaledwie pojedyncze poronne komórki Opalskiego (ryc. 5), w których aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej nie różniła się od aktywności otaczającego gleju (ryc. 6). W obu grupach nie obserwowano w ogóle komórek przypominających komórki Alzheimerera I i II.

Obraz mikroskopowo-elektronowy hodowli z dodatkiem penicylaminy różnił się zasadniczo od obrazu hodowli prowadzonych z samą surowicą od pacjentów z chorobą Wilsona. Komórki glejowe o cechach ultrastrukturalnych komórki Opalskiego występowały bardzo rzadko (ryc. 7). Obok astrocytów i oligodendrocytów o niezmiennym obrazie ultrastrukturalnym, występowały liczne komórki stanowiące formę pośrednią między przerośniętymi astrocytami, i uformowanymi komórkami Opalskiego. Charakteryzowało je występowanie w obfitszej niż w prawidłowym astrocycie cytoplazmie stosunkowo licznych ciał lizosomopodobnych o różnej gęstości elektronowej oraz niekiedy znaczne poszerzenie kanałów pofragmentowanej szorstkiej siatki śródplazmatycznej

Ryc. 1. Hodowla 3-tygodniowa prowadzona przez 3 dni z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym. Liczne komórki Opalskiego. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 1. Three-week-old culture kept for 3 days with the serum from the patient with hepato-lenticular degeneration. Numerous Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 2. Hodowla 1-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Poronne formy komórek Opalskiego, Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 2. One-week-old culture, II experimental group. Abortive forms of Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 3. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Komórka Opalskiego z licznymi ziarnistościami PAS-dodatnimi. Pow. 400 X.

Fig. 3. Three-week-old culture, II experimental group. Opalski cell with numerous PAS-positive granules. X 400.

Ryc. 4. Hodowla 1-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach Opalskiego. Pow. 400 X.

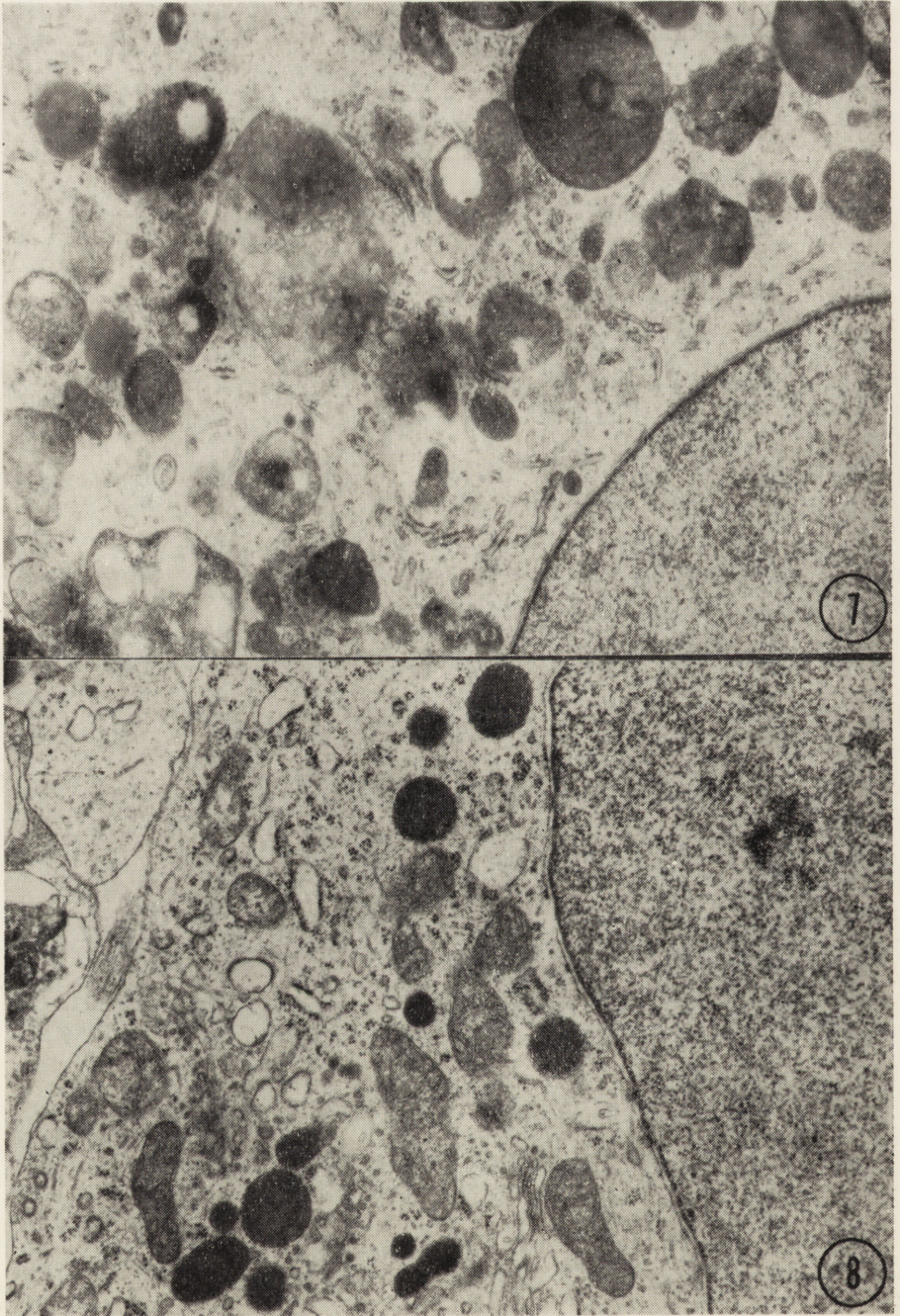
Fig. 4. One-week-old culture, II experimental group. High activity of succinate dehydrogenase in Opalski cells. X 400.

Ryc. 5. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Pojedyncze, drobne komórki Opalskiego. Błękit toluidyny. Pow. 400 X.

Fig. 5. Three-week-old culture, II experimental group. Few small Opalski cells. Toluidin blue. X 400.

Ryc. 6. Hodowla 3-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Wysoka aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w pojedynczej komórce Opalskiego i w sąsiednich komórkach glejowych. Pow. 400 X.

Fig. 6. Three-week-old culture, II experimental group. High activity of succinate dehydrogenase in a single Opalski cell and in neighboring glial cells. X 400.



(ryc. 8). Zwracał uwagę niezmieniony na ogół obraz mitochondriów, z których nieliczne wykazywały cechy obrzmienia (ryc. 9). W niektórych komórkach wykazano obecność drobnoziarnistych złogów miedzi, zlokalizowanych w pojedynczych lizosomach (ryc. 10).

Grupa III. Zmiany patologiczne w hodowlach 1-tygodniowych, do których podano równocześnie octan miedzi z penicylamina były bardziej nasilone niż w odpowiednich hodowlach grupy II, jednakże wyraźnie mniej intensywne niż w hodowlach bez penicylaminy. Po 3 dniach hodowli obserwowano stosunkowo liczne komórki Opalskiego nie osiągające na ogół ich typowych rozmiarów (ryc. 11). Pozostałe ich właściwości morfologiczne i histochemiczne były identyczne jak po zastosowaniu samego octanu miedzi. Cytoplazmę komórek Opalskiego wypełniały obfite ziarnistości PAS-dodatnie.

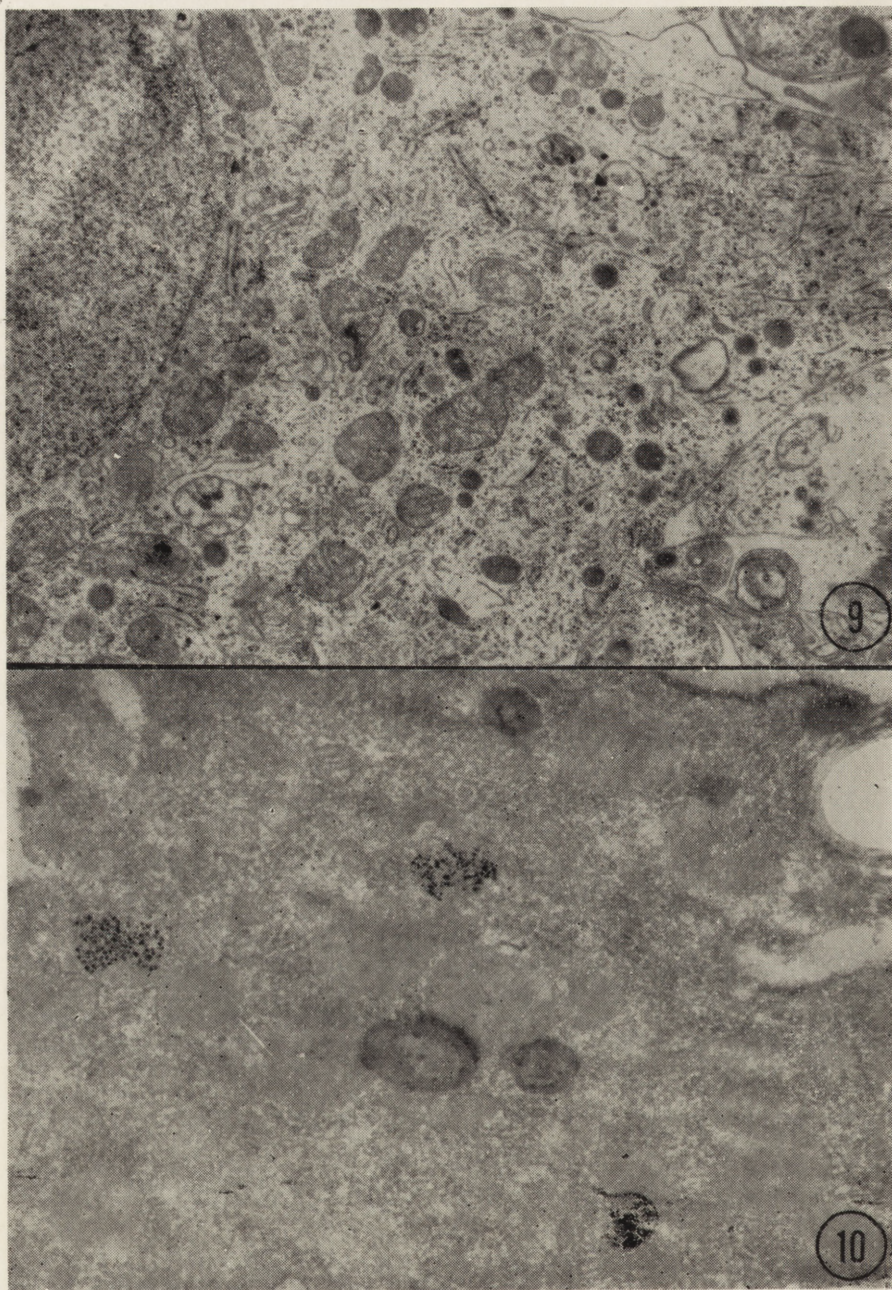
Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i glutaminowej była znacznie obniżona zarówno w komórkach Opalskiego i przejściowych jak również w otaczających komórkach glejowych, nie wykazujących cech strukturalnego uszkodzenia (ryc. 12). Aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w patologicznych formach gleju była nieco podwyższona (ryc. 13). Spotykano również zmienną ilość komórek Alzheimera, typu II. Obraz morfologiczny i histochemiczny hodowli 3-tygodniowych nie różnił się zasadniczo od opisanego w grupie hodowli 1-tygodniowych. Jednakże liczba komórek Opalskiego i przejściowych, jak również komórek Alzheimera typu II, była wyraźnie mniejsza (ryc. 14). Obniżenie aktywności enzymatycznej w patologicznych i prawidłowych komórkach glejowych dotyczyło niemal wyłącznie dehydrogenazy bursztynianowej. Odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy glutaminowej w patologicznych komórkach glejowych wykazywał zmienne nasilenie.

Ryc. 7. Hodowla 2-tygodniowa, z surowicą od pacjenta z chorobą Wilsona. Fragment typowej komórki Opalskiego z dużą ilością ciał wtrętowych, lizosomów i zmienionych mitochondriów oraz słabo rozwiniętą siatkę śródplazmatyczną. Pow. 14 000 \times .

Fig. 7. Two-week-old culture with a serum from the patient with Wilson's disease. Fragment of typical Opalski cell containing numerous inclusion bodies, lysosomes, altered mitochondria and poorly developed endoplasmic reticulum. \times 14 000.

Ryc. 8. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. Fragment zmienionego astrocytu z dużą ilością lizosomów, gliotubuli i poszerzonymi kanałami szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Niektóre mitochondria z przejaśnioną macierzą. Pow. 10 000 \times .

Fig. 8. Two-week-old culture, II experimental group. Fragment of altered astrocyte containing numerous lysosomes, gliotubules and dilated channels of rough endoplasmic reticulum. Some mitochondria have a cleared up matrix. \times 10 000.



W badaniach mikroskopowo-elektronowych stwierdzano wyraźne odchylenia od prawidłowego obrazu ultrastrukturalnego komórek glejowych, jakkolwiek były one mniej nasilone niż w hodowlach bez penicylaminy. Wiele spośród astro- i oligodendrocytów nie wykazywało istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych poza zwiększeniem ilości ciał lizosomopodobnych i gliofibryli, występujących w komórkach gleju gwiaździstego. Obecne były również komórki o właściwościach mikroskopowo-elektronowych komórek przejściowych opisanych w grupie II. Stosunkowo liczne komórki wykazywały jednak cechy typowe dla komórki Opalskiego. W ich cytoplazmie charakteryzującej się zubożeniem szorstkiej siatki śródplazmatycznej występowały liczne lizosomy i ciała lizosomopodobne o różnej gęstości elektronowej. W ich otoczeniu częste były nagromadzenia glikogenu. Nieliczne zwykle i drobne mitochondria nie wykazywały znacznych cech uszkodzenia. Odczyn histochemiczny na miedź wykazywał obecność ziarnistych złogów w nielicznych tylko lizosomach (ryc. 15). Był on znacznie słabszy niż w hodowlach bez podania penicylaminy.

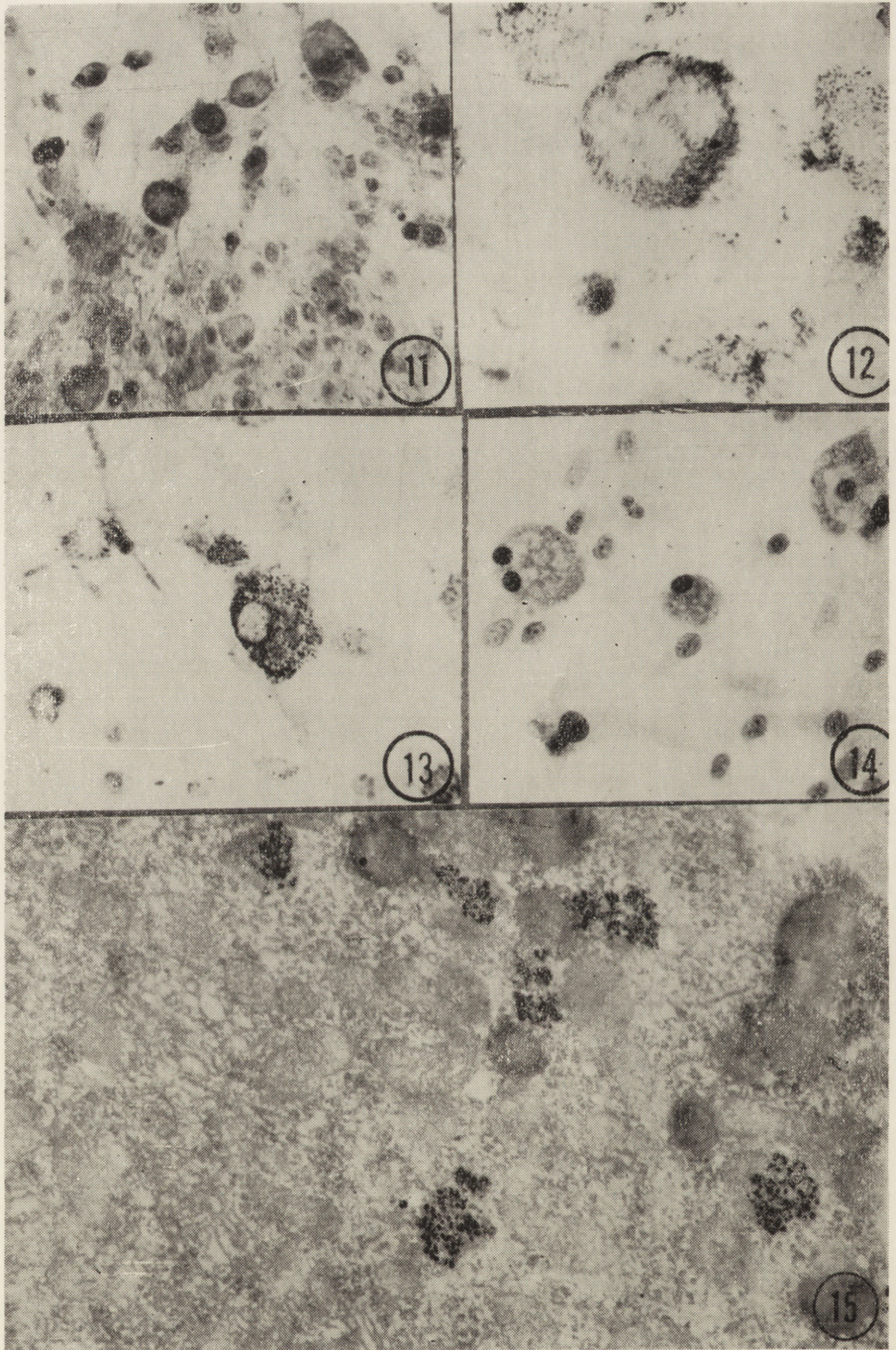
Grupa IV. W hodowlach glejowych, prowadzonych w medium zawierającym surowicę od chorych ze śpiączką wątrobową, do którego dodano d-penicylaminę zmiany patologiczne były mniej nasilone niż w hodowlach bez zastosowania leku i w swoim ogólnym wzorcu przypominały nieprawidłowości opisane w grupie II, będąc jednak nieco bardziej zaawansowane. Ilość typowych komórek Opalskiego była niewielka. W niektórych hodowlach w ogóle nie występowały. Liczniejsze były komórki przejściowe, często z zachowanymi wypustkami. W ich cytoplazmie zawierającej obfite ziarnistości PAS-dodatnie nierzadko spostrzegano liczne wodniczki. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, a zwłaszcza glutaminowej zarówno w komórkach Opalskiego, jak i w komórkach przejściowych była obniżona, w przeciwieństwie do wysokiej aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu. Nie spostrzegano istotnych różnic między obrazem patologicznym hodowli 1- i 3-tygodniowych. W obu grupach występowały nieliczne komórki Alzheimerera, typu II.

Ryc. 9. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. We fragmencie astrocytu widoczna pofragmentowana szorstka siatka śródplazmatyczna, liczne gliotubule, lizosomy i mitochondria, niektóre z cechami obrzmienia. Pow. 9000 \times .

Fig. 9. Two-week-old culture, II experimental group. Fragment of an astrocyte with fragmented rough endoplasmic reticulum, numerous gliotubules, lysosomes and mitochondria, some of which are swollen. \times 9000.

Ryc. 10. Hodowla 2-tygodniowa, II grupa doświadczalna. W nielicznych lizosomach widoczne drobno-ziarniste złogi miedzi. Pow. 12 000 \times .

Fig. 10. Two-week-old culture, II experimental group. Some lysosomes contain fine-granular copper deposits. \times 12 000.



W obrazie mikroskopowo-elektronowym hodowli, mimo podania penicylaminy spostrzegano wyraźne nieprawidłowości strukturalne komórek glejowych, jakkolwiek były one mniejsze niż w hodowlach prowadzonych bez leku. Ultrastrukturę komórek Opalskiego cechowała obfita zawartość ciał lizosomalnych. Niektóre z nich, charakteryzujące się większą gęstością elektroniczną zawierały drobne kropelkowate przejaśnienia. Uboga szorstka siatka śródplazmatyczna, wykazywała odcinkowe poszerzenie kanałów. Nieliczne mitochondria miały zwykle prawidłową strukturę (ryc. 16). Obok typowych komórek Opalskiego, spotykano komórki z mniejszą zawartością ciał lizosomopodobnych, wykazujących jednak większe poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej. W odczynie histochemicznym na miedź wykazano jej nagromadzenie w niektórych lizosomach komórek Opalskiego i komórek przejściowych (ryc. 17). Były one mniej obfite niż w hodowlach prowadzonych bez leku.

Grupa V. W hodowlach prowadzonych w medium zawierającym surowicę ludzi zdrowych z dodatkiem egzogennej amoniaku, podanie d-penicylaminy nie zmieniało obrazu morfologicznego i histochemicznego komórek glejowych.

We wszystkich hodowlach stwierdzono bardzo liczne komórki Opalskiego o typowych cechach histologicznych i histochemicznych oraz komórki Alzheimerera, typu II. Zwracało uwagę bardzo znaczne uszkodzenie komórek glejowych, nie wykazujących zmian struktury charakterystycznych dla gliopatii wątrobowej. Ich aktywność enzymatyczna, podobnie

Ryc. 11. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Liczne drobne formy komórkowe przypominające komórki Opalskiego. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 11. One-week-old culture, III experimental group. Numerous small cellular elements similar to Opalski cells. HE. × 200.

Ryc. 12. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Osłabienie aktywności dehydrogenazy glutaminowej. Pow. 400 ×.

Fig. 12. One-week-old culture, III experimental group. Diminution of glutamate dehydrogenase activity. × 400.

Ryc. 13. Hodowla 1-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Pojedyncza komórka Opalskiego z wysoką aktywnością dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Pow. 400 ×.

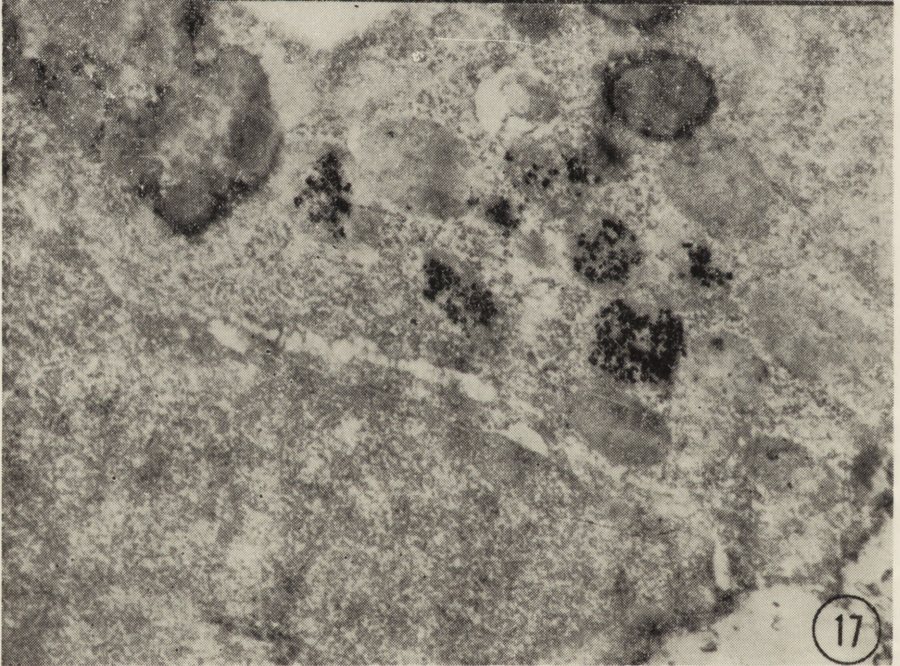
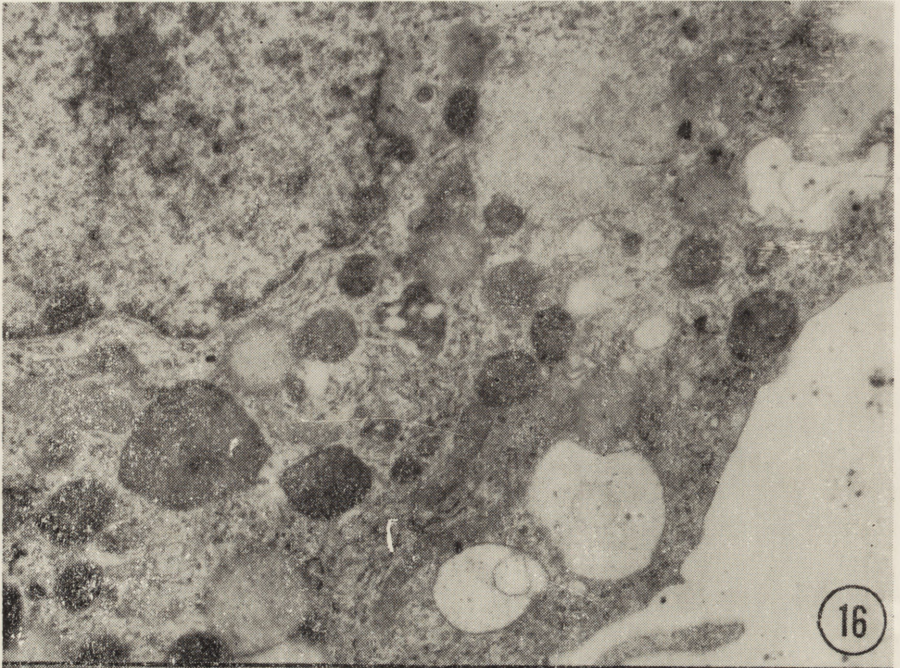
Fig. 13. One-week-old culture, III experimental group. Single Opalski cell exhibits high glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. × 400.

Ryc. 14. Hodowla 3-tygodniowa, III grupa doświadczalna. Poronne formy komórek Opalskiego. Błękit toluidynowy. Pow. 400 ×.

Fig. 14. Three-week-old culture, III experimental group. Abortive forms of Opalski cells. Toluidin blue. × 400.

Ryc. 15. Hodowla 2-tygodniowa, III grupa doświadczalna. W licznych lizosomach widoczny intensywny, drobno-ziarnisty odczyn miedzi. Pow. 14 000 ×.

Fig. 15. Two-week-old culture, III experimental group. Numerous lysosomes show intense, fine-granular reaction for copper. × 14 000.



jak komórek Opalskiego była bardzo niska. W obrazie mikroskopowo-elektronowym większość komórek glejowych wykazywała cechy znacznej dezintegracji cytoplazmy, ze zubożeniem i fragmentacją siatki śródplazmatycznej, zmniejszeniem ilości rybosomów i znacznym uszkodzeniem nielicznych mitochondriów. W komórkach Opalskiego wokół licznych, wielokształtnych ciał lizosomopodobnych obserwowano nagromadzenie glikogenu (ryc. 18). Mitochondria były małe, nieliczne, niektóre z zatartą strukturą. W żadnym typie komórek glejowych, niezależnie od stopnia ich uszkodzenia nie stwierdzano widocznych na poziomie mikroskopowo-elektronowym złogów miedzi (ryc. 19).

OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że zastosowanie d-penicylaminy wyraźnie łagodziło efekt cytotoksyczny surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i ze śpiączką wątrobową oraz egzogennej miedzi. Pozostawało natomiast całkowicie bez wpływu na rozwój gliopatii w następstwie działania egzogennej amoniaku. Wpływ łagodzący efekt cytotoksyczny był największy w stosunku do surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona. Wyrażał się on całkowitym zahamowaniem tworzenia komórek Alzheimerera, typu I i II, zmniejszeniem liczby komórek Opalskiego z zatrzymaniem ich rozwoju na stadium komórek przejściowych oraz znacznym zmniejszeniem nasilenia nieprawidłowości histoenzymatycznych i ultrastrukturalnych. Wyraźnie niższa była zawartość miedzi w lizosomach zmienionych komórek glejowych.

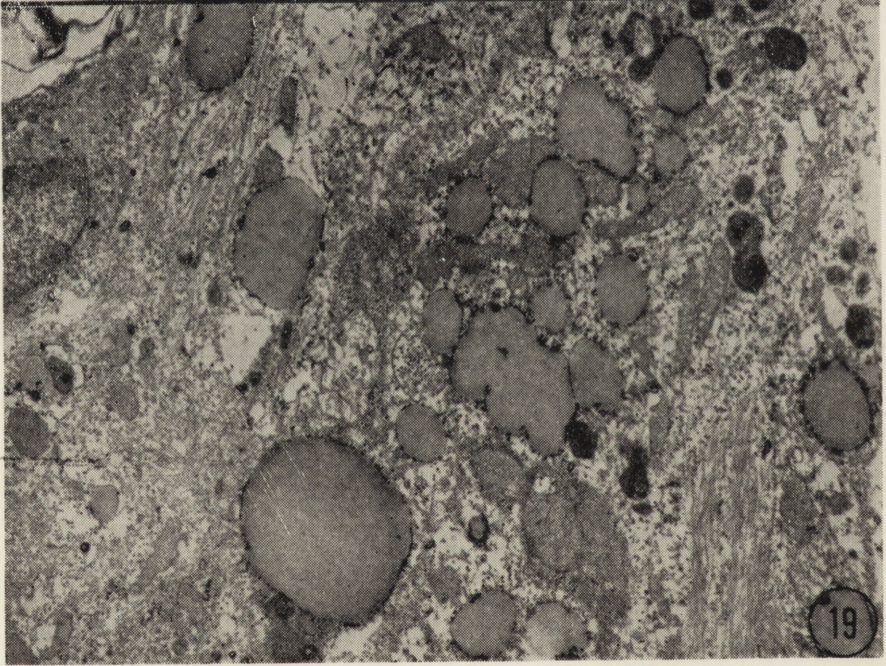
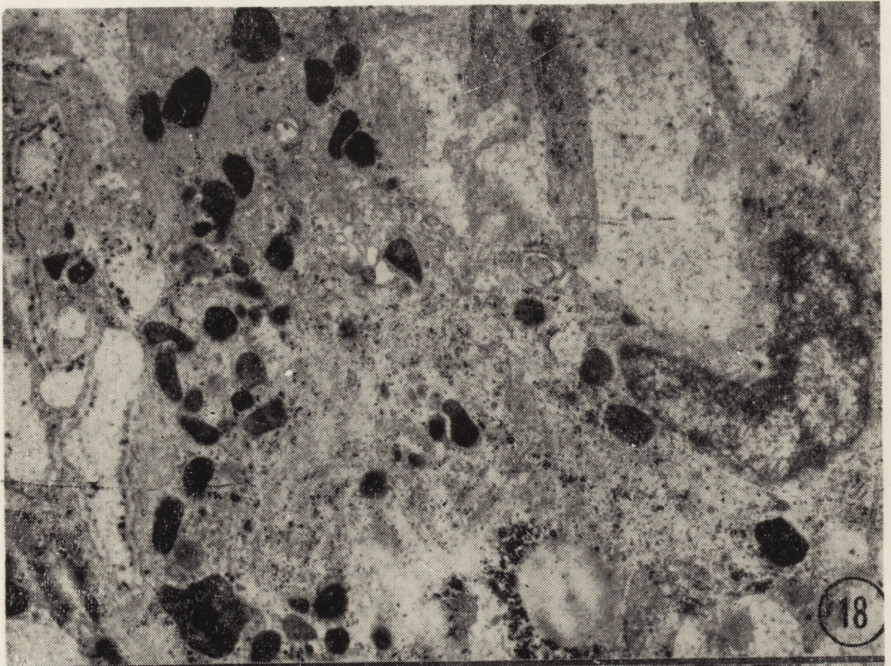
Zmiany patologiczne w komórkach glejowych, zarówno nieswoiste jak i charakterystyczne dla gliopatii wątrobowej, w przypadku surowicy od chorych ze śpiączką wątrobową, mimo podania penicylaminy były bardziej zaawansowane niż w odpowiednich hodowlach prowadzonych z surowicą od pacjentów z chorobą Wilsona. Występowały tu liczniejsze komórki Opalskiego, spotykano również komórki Alzheimerera II.

Ryc. 16. Hodowla 2-tygodniowa, IV grupa doświadczalna. Fragment komórki Opalskiego. W cytoplazmie widoczne liczne ciała wtrętowe i ciała tłuszczowe oraz znaczne rozdęcia szorstkiej siatki śródplazmatycznej. Pow. 12 000 X.

Fig. 16. Two-week-old culture, IV experimental group. Fragment of Opalski cell. The cytoplasm contains numerous inclusion and lipid bodies and markedly dilated rough endoplasmic reticulum. X 12 000.

Ryc. 17. Hodowla 2-tygodniowa, IV grupa doświadczalna. W niektórych lizosomach widoczny dość intensywny, drobno-ziarnisty odczyn na miedź. Pow. 14 000 X.

Fig. 17. Two-week-old culture, IV experimental group. Some lysosomes exhibit rather intense, fine-granular reaction for copper. X 14 000.



Zaburzenia histoenzymatyczne, zwłaszcza dotyczące aktywności dehydrogenazy glutaminowej były bardziej nasilone. W obrazie mikroskopowo-elektronowym większa była liczba komórek glejowych o typowych cechach komórek Opalskiego. Lizosomalne złogi miedzi, skąpsze niż bez stosowania leku, były bogatsze niż w hodowlach prowadzonych z surowicą od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym.

Podobny charakter, choć nieco większe nasilenie miały zmiany patologiczne utrzymujące się mimo podania penicylaminy w hodowlach prowadzonych z dodatkiem egzogennej miedzi. Jednakże efekt penicylaminy, łagodzący cytotoksyczne działanie nadmiaru jonów miedzi był uchwytny, wyrażając się znacznym zmniejszeniem liczby patologicznych form glejowych, osłabieniem nasilenia nieprawidłowości histoenzymatycznych i ultrastrukturalnych, a przede wszystkim mniejszym gromadzeniem miedzi w strukturach lizosomalnych komórek glejowych.

Obecność łagodzącego wpływu d-penicylaminy na rozwój gliopatii wątrobowej w trzech grupach doświadczalnych, przy jego braku w grupie z egzogennym amoniakiem wiązać należy zapewne z jej działaniem chelatującym miedź. Dzięki temu zmniejsza się uszkodzenie układu enzymatycznego w cyklu Krebsa w komórkach glejowych. Utrzymanie niezmięnionej lub tylko nieznacznie obniżonej aktywności dehydrogenazy bursztynianowej zarówno w patologicznych komórkach glejowych, jak i w strukturalnie nie uszkodzonej populacji komórkowej może potwierdzać to przypuszczenie.

Jedyną grupą doświadczalną, w której nie stwierdzono wpływu penicylaminy były hodowle prowadzone przy nadmiarze egzogennych soli amonu. Rozwój gliopatii w tym przypadku wiązać należy z wyłącznym działaniem amoniaku (Mossakowski i wsp. 1970). W pozostałych grupach doświadczalnych natomiast należy brać pod uwagę wyłączne (grupa II i III) lub współtowarzyszące (grupa IV) patogenetyczne działanie miedzi. Możliwość jej cytotoksycznego wpływu w przypadku po-

Ryc. 18. Hodowla 2-tygodniowa, V grupa doświadczalna. W cytoplazmie zmienionego astrocytu widoczne bardzo liczne lizosomy oraz słabo wykształcona siatka śródplazmatyczna. Obfite ziarnistości glikogenu. Pow. 11 200 X.

Fig. 18. Two-week-old culture, V experimental group. The cytoplasm of changed astrocyte contains abundant amount of lysosomes and poorly developed endoplasmic reticulum. Numerous glycogen granules. X 11 200.

Ryc. 19. Hodowla 2-tygodniowa, V grupa doświadczalna. Fragment cytoplazmy astrocytu z bardzo licznymi ciałami tłuszczowymi. Brak odczynu na miedź w lizosomach. Pow. 10 000 X.

Fig. 19. Two-week-old culture, V experimental group. Fragment of the astrocyte cytoplasm with very numerous lipid bodies. No reaction for copper in lysosomes. X 10 000.

dania nadmiaru egzogennych soli miedzi, jak również przy stosowaniu surowicy chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym jest oczywista i została wykazana w naszych poprzednich doświadczeniach (Mossakowski i wsp. 1970, 1976). Istnieje szereg danych pozwalających na przyjęcie przynajmniej jej patogenetycznego współdziałania w przypadku stosowania surowicy od chorych z niewydolnością wątroby. Przemawia za tym zarówno fakt występowania obfitych złogów miedzi w patologicznie zmienionych komórkach glejowych, uzyskanych w hodowli z tego rodzaju surowicami (Mossakowski i wsp. 1976) jak również zależność nasilenia zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym od stopnia nagromadzenia miedzi w jego tkankach w encefalopatii wątrobowej (Śmiałek, Mossakowski 1973). Dodatkowym argumentem jest możliwość podwyższonego poziomu miedzi w surowicy chorych z niewydolnością wątroby (Holmberg, Laurell 1951, Mossakowski i wsp. 1970), jak również jej występowania w formie „wolnej” w związku ze zmianami w składzie białkowym surowicy krwi (Kassur i wsp. 1976).

Zróznicowanie łagodzącego wpływu w poszczególnych grupach doświadczalnych należy wiązać z różnicami w zawartości miedzi w środowisku hodowlanym. Tym tłumaczyć trzeba największy efekt penicylaminy w przypadku surowicy od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym i wyraźnie niższy przy zastosowaniu egzogennych soli miedzi. Mniejszy efekt penicylaminy w stosunku do hodowli z surowicą od chorych z niewydolnością wątroby odnieść należy prawdopodobnie do współdziałania patogenetycznego amoniaku, na które penicylamina pozostawała bez wpływu. Nie można wykluczyć również cytotoksycznego działania innych substancji znajdujących się w surowicy chorych z niewydolną wątrobą (Schuta 1967).

Brak całkowitego zahamowania rozwoju gliopatii pod wpływem penicylaminy w zastosowanych warunkach doświadczalnych, nawet w odniesieniu do surowicy od pacjentów z chorobą Wilsona, wiązać należy zapewne ze stosunkowo niską dawką leku. Jej podwyższenie okazało się jednak niemożliwe, ze względu na stwierdzone w pilotowej serii doświadczeń nieswoiste uszkodzenia tkankowe przy zastosowaniu 10 mg% stężenia leku.

Spostrzeżenia nasze raz jeszcze potwierdzają wysuniętą poprzednio hipotezę (Mossakowski 1973), że typowa gliopatia wątrobowa rozwija się zarówno pod wpływem miedzi jak i amoniaku, przy wspólnym ogniwie patogenetycznym jakim jest względny lub bezwzględny niedobór α -okso-glutaranu, stanowiącego istotny element detoksykacji amoniaku w tkance nerwowej.

М. Я. Моссаковски, З. Красьницка, Б. Гайковска

ВЛИЯНИЕ D-ПЕНИЦИЛАМИНА НА КАРТИНУ ПЕЧЕНОЧНОЙ ГЛИОПАТИИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

Проведена серия исследований влияния d-пенициламина на морфологическую, гистохимическую и электронно-микроскопическую картину глиопатии, прогрессирующей в невроглии, выращиваемой в среде, содержащей сыворотку больных с гепатико-лентиккулярным вырождением, сыворотку больных с печеночной спячкой, а также нормальную сыворотку с добавкой экзогенных солей меди и аммония.

Обнаружено отчетливое влияние пенициламина, смягчающее цитотоксическое действие сыворотки больных с гепатико-лентиккулярным вырождением. Этот эффект был более слабым в случае сыворотки больных с печеночной спячкой и экзогенных солей меди. Однако не обнаружено ослабления цитотоксического действия аммония.

На основе вышеуказанных наблюдений выдвинуто предположение, что защитное действие пенициламина выступает только в тех случаях, когда медь играет роль единственного или сопутствующего патогенного фактора. Эффект этот не имеет места, когда патогенным фактором является аммоний. Только частичное защитное действие пенициламина при применении экзогенных меди и сыворотки больных с печеночной спячкой связывали в первом случае с избытком соли меди относительно количества даваемого пенициламина, а во втором — в совместном действии меди и аммония как равноценных патогенных факторов.

M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, B. Gajkowska

EFFECT OF D-PENICILLAMINE ON THE HEPATIC GLIOPATHY IN TISSUE CULTURE

Summary

The studies were carried out on the effect of d-penicillamine on the morphological, histochemical and electron microscopic picture of gliopathy developing in glial tissue cultured in the medium containing either the serum taken from patients suffering from hepato-lenticular degeneration and from hepatic coma or in the medium containing normal serum to which exogenous copper and ammonium salts were added.

It was found that penicillamine distinctly reduces the cytotoxic action of serum obtained from patients affected with hepato-lenticular degeneration. The effect was less evident when the serum from the patients suffering from hepatic coma and serum containing exogenous copper salts were used. There was no abatement of cytotoxic effect of ammonia.

The above observations led to assumption that the protective effect of penicillamine comes into evidence only in the cases in which copper is the sole or concomitant pathogenic factor. The partial mitigating effect of penicillamine noted in cultures with serum containing exogenous copper and in cultures with serum from the patients affected with hepatic coma is attributed in former case to excess of copper salts in relation to penicillamine and in the latter — to common action of copper and ammonia, the pathogenic factors of equal rank.

PIŚMIENICTWO

1. Borowicz J. W., Kraśnicka Z.: Własna metoda przygotowania hodowli komórkowych in vitro do badania w mikroskopie elektronowym. *Pat. Pol.* 1971, 22, 691—697
2. Holmberg C. G., Laurell C. B.: Oxidase reactions in human plasma caused by ceruloplasmin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1951, 8, 103—108
3. Kassur B., Olejnik Z., Mossakowski M., Kraśnicka Z.: Niektóre aspekty patogenetyczne ostrej encefalopatii wątrobowej w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby. *Przegl. Epid.* 1976, w druku
4. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej in vitro. *Neuropat. Pol.* 1965, 3, 397—408
5. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropath.* 1970, 16, 1—16
6. Mossakowski M. J.: The role of copper in the pathogenesis of Wilsonian gliopathy. II. *Inter. Symp. on Wilson's Disease, Paris, 1973*
7. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of Opalski cells in vitro. *Exp. Neurol.* 1976, w druku
8. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ glutaminianu sodu na obraz gliopatii wywołanej przez amoniak i malonian sodu w warunkach hodowli in vitro. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 1—9
9. Renkawek K.: On the histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured in vitro. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 307—315
10. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes in vitro induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. *Acta neuropath. (Berl.)* 1973, 26, 107—114
11. Schener P. J., Thorpe M. E. C., Marriot P.: A method for the demonstration of copper under the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.* 1967, 15, 300—301
12. Schutta H. S.: Bilirubin encephalopathy in Guam rats. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1967, 26, 689—694
13. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Morphological changes and quantitative topography of copper in the brain of patients with hepatic coma due to acute liver impairment. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 259—268
14. Wender M., Kozik M.: Encefalopatia po zespoleniu żyły głównej dolnej z żyłą wrotną. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1973, 23, 177—181

Adres autorów: Zespół Neuropatologii, Centrum Medycyny Dośw. i Klin. PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.