

Polskie tłumaczenie tekstu artykułu „Cajal-Retzjus cells in acoustic cortex from patients in the early phase of Alzheimer's disease: A Golgi and electron microscope study.” zamieszczonego w Psychogeriatruii Polskiej Vol 1 No 3.
Ilustracje, ryciny, tabele oraz bibliografia znajdują się w tekście oryginalnym.

Komórki Cajala-Retzjusa w korze słuchowej u pacjentów we wczesnej fazie choroby Alzheimera - badanie metodą Golgiego i za pomocą mikroskopii elektronowej.

Stavros J.Baloyannis

Streszczenie

Podstawy: Otępienie typu Alzheimera jest neurodegeneracyjną chorobą wieku średniego i starczego powodującą postępujący spadek zdolności intelektualnych, utratę funkcji zawodowych, stopniowe narastające zaburzenia zachowania i funkcjonowania społecznego oraz wczesną utratę wglądu, zaburzenia komunikacji i zdolności językowych i objawy neurologiczne. Zaburzenia funkcji słuchowych są widoczne u wielu pacjentów. We wcześniejszych badaniach opisywaliśmy przebudowę synaptyczną w mózgu we wczesnej fazie ch.A., która występowała w korze słuchowej, przyśrodkowym ciele kolankowatym, wzgórku dolnym blaszki czworaczej. Obecnie stwierdziliśmy morfologiczną i morfometryczną przebudowę komórek Cajala-Retzjusa I warstwy kory słuchowej. Komórki te wytwarzają relinę odgrywającą kluczową rolę w komórkowym rozwoju neuronów i tworzeniu sieci neuronalnej.

Materiał i metody: Badaniu poddaliśmy 20 mózgów pacjentów z wczesną ch.A. W badaniach w mikroskopie świetlnym stosowaliśmy technikę Golgiego, metody Golgiego-Nissl'a, Holzer'a, Bielschowskiego-Hiranga, i technikę impregnacji Bodian'a. W celu badania w mikroskopie elektronowym zastosowano utrwalanie próbek w roztworze Sotelo'a.

Wyniki: Badanie morfologiczne ujawniło przebudowę organelli komórkowych komórek Cajala-Retzjusa, przebudowę mitochondriów, fragmentację cystern aparatu Golgiego i przebudowę synaptyczną. Badania morfometryczne z kolei obniżyły ilość komórek Cajala-Retzjusa w porównaniu z próbą kontrolną.

Wnioski: Komórki Cajala-Retzjusa oraz relina (którą wytwarzają) są ważnym czynnikiem synaptogenezy i rozwoju lokalnej sieci neuronalnej, ich utrata może mieć związek z wieloczynnikową patogenezą ch.A. Zaburzenie na poziomie komórkowym może objawiać się we wczesnej fazie choroby jako zaburzenie ośrodkowych funkcji słuchowych.

Wstęp

Choroba Alzheimera jest postępującą chorobą zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego. Charakteryzują się głównie zaburzeniami pamięci, utratą funkcji poznawczych, zmianami osobowości i stopniowym spadkiem funkcji neurologicznych, prowadząc ostatecznie do stanu wegetatywnego i śmierci[1].

Pomimo licznych hipotez, podłoże etiopatogenetyczne choroby wciąż pozostaje nieznane. Badania prowadzone na styku neurogenetyki, neuropatologii, neurochemii i neuroimmunologii sprawiają, że zbliżamy się do odkrycia etiologii choroby, ale wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi.

Z morfologicznego punktu widzenia obszary zmysłowe kory są szczególnie narażone na uszkodzenie, wśród nich nowa kora w ch.A. [2], tam lokalizują się blaszki starcze oraz komórki charakterystyczne dla przebudowy komórkowej w ch.A[3,4].

Liczne doniesienia kliniczne dotyczące ośrodkowych funkcji słuchowych[5], sugerują zaburzenia w obrębie kory słuchowej przypuszczalnie związane z neuropatologiczną przebudową na poziomie poza- oraz wewnątrzkomórkowym.

Zaburzenia ośrodkowych funkcji słuchowych zostały opisane w ch.A.[5] za pomocą takich parametrów jak: długość bodźca, stymulacja i zadanie powtórzenia słyszanych poleceń. Sugeruje to, ch.A. jest związana z przebudową funkcji korowych związanych z wybiórczą uwagą słuchową [6]. Zaburzenia językowe w ch.A. mogą przyjmować postać postępującej afazji semantycznej, agnozji, słabszej wymowy niż w otępieniu czołowo-skroniowym lub zaniku płatowym [6]. Pomimo współistnienia poważnych zaburzeń w pamięci deklaratywnej zostały opisane również przypadki zachowania pamięci muzycznej w ch.A. [7]. Najczęściej jednak inne przypadki cechowało zaburzone rozpoznawanie znanych wcześniej dźwięków niewerbalnych z użyciem „maszyny obrazkowej”. [8].

Cechy przebudowy histologicznej takie jak: utrata neuronów, utrata wypustek dendrytycznych w II,III i IV-tej warstwie korowej związane z wyraźnym spadkiem odnóg aksonalnych trójkąta dużego i neuronów okrągłych zostały opisane w korze słuchowej we wcześniejszym badaniu [9]. Przebudowa jest także związana ze zmianami strukturalnymi warstwy I [10] i synaps[11].

Badanie zostało podjęte celem analizy morfologicznej i morfometrycznej parametrów komórek Cajala-Retziusa w korze słuchowej we wczesnych przypadkach ch.A. z użyciem technik impregnacji srebrowej, metody Golgi-Nissl'a, mikroskopem elektronowym

Komórka Cajala-Retziusa jest widocznym neuronem warstwy I kory półkul mózgowych, która związana jest z rozwojem nowej kory, komórkowym i tworzeniem neuronalnej sieci. Neuron ten wydziela relinę (glikoproteina[14]), która warunkuje rozwój struktur korowych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Materiał i metody

Opisano morfologiczną przebudowę komórek Cajala-Retziusa u 20 przypadków ch.A., 7 mężczyzn i 13 kobiet w wieku 52-87 lat, spełniających kliniczne, neuropsychologiczne i laboratoryjne kryteria diagnostyczne ch.A.

Średni czas edukacji pacjentów wyniósł 15.1 lat, wszyscy płynnie mówili w ojczystym języku.

Procedury przesiewowe przy włączaniu do badania obejmowały wywiad, badania fizykalne ogólne z badaniem kardiologicznym oraz oceną stanu psychicznego i neurologicznego. Wszystkim pacjentom wykonano EEG, badanie dopplerowskie głowy, tomografię komputerową, rezonans magnetyczny oraz SPECT. Ocenę stanu psychicznego dokonano za pomocą Mini-Mental State Examination(MMSE) oraz Dementia Rating Scale(DRS)[18].

Badanie pośmiertne było wykonane w ciągu 2h, mózgi wypreparowane w temperaturze otoczenia 4 C. 10 dodatkowych (nienaruszonych morfologicznie) stanowiło próbę kontrolną, były to zdrowe osoby, które zmarły wskutek wypadku.

Do celów mikroskopii elektronowej wycięto kilka małych próbek z obszaru słuchowego kory skroniowej, wycięcia wykonano obustronnie i próbki umieszczono w roztworze Sotelo'a.

Następnie zostały zanurzone na 30 min w 1% czterotlenku osmu w temperaturze pokojowej i odwodnione roztworem alkoholu etylowego i tlenu propylenu. Próbki pocięto na podłużne(cienkie) kawałki aparatem Reichert'a i po zanurzeniu w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu wykonano badanie mikroskopem elektronowym typu Zeiss 9aS (powiększenie 56000X).

Do celów mikroskopii świetlnej pozostałą część obszaru słuchowego kory (Heschl gyri of the superior temporal gyrus) impregnowano srebrem. Kora słuchowa została pocięta w kawałki, po 3 tygodniach zanurzenia w formalinie umieszczona w dwuchromianie potasu (7g potasu w 300ml wody) na 10 dni. Ostatecznie próbki umieszczono w 1% azotanie srebra na 10 dni, w oparciu o metodę Golgiego.

Po gwałtownym odwodnieniu w roztworze alkoholu etylowego, próbki zostały osadzone w parafinie i pocięte na kawałki o grubości 10 μ -100 μ . Badano mikroskopem świetlnym typu Zeiss Axiolab Photomicroscope.

Niektóre próbki zanurzano w parafinie i barwiono hematoksyliną i eozyną, również metodą Holzer'a, Bielschowskiego-Hirano i techniką impregnacyjną Bodian'a.

Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test Student'a badający 200 próbek z 20 mózgow (10 od grupy z ChA, 10 z grupy kontrolnej). Znamienność statystyczna wyniosła $p < 0.005$.

Wyniki

Mikroskop świetlny

Badania kory słuchowej mózgow z ChA. ujawniły znaczący zanik komórek Cajala-Retziusa w I warstwie kory (rys.1) i skrócenie rozgałęzień dendrytycznych w zakresie części komórek Cajala-Retziusa w porównaniu kontrolnymi mózgami. Widoczne było zmniejszenie korowej warstwy I. Metodą Golgiego uwidoczniono neurodegeneracyjne płytki starcze znalezione w całej korze słuchowej oraz rozrost gleju we wszystkich 3 warstwach kory akustycznej.

Mikroskop elektronowy

Komórka Cajala-Retziusa zawiera cytoplazmę wypełnioną rybosomami, okołojądrowy aparat Golgiego, siateczkę endoplazmatyczną gładką i szorstką, złożone lipofuscyny, różnokształtne mitochondria. Z morfometrycznego punktu widzenia elipsowate mitochondria posiadały średni wymiar 650-/+250nm, średnicę 1.9+/-0.2. Jądro usytuowane było zwykle peryferycznie, najczęściej okrągłe lub eliptyczne z homogenną chromatyną. Komórka Cajala-Retziusa zazwyczaj była widoczna w pozycji równoległej do powierzchni kory.

M ó z g i p a c j e n t ó w z C h A.

Stwierdzono niedobór komórek Cajala-Retziusa we wszystkich próbkach pobranych z kory słuchowej pacjentów z ChA. Nieliczne komórki, które pozostały w warstwie I posiadały gęste pyknotyczne jądro(Rys.2). Ciało komórki składało się z kilku rybosomów i ograniczonej liczebnie siateczki endoplazmatycznej z cysternami. Cysterny aparatu Golgiego w większości były podzielone, morfometryczna analiza ujawniła zmniejszenie ich powierzchni w porównaniu w próbą kontrolną (rys.3). Dodatkowo obserwowano cienkie wypustki aksonalne oraz mnóstwo glikogenu we wszystkich warstwach kory akustycznej.

Uwidoczniono także tzw. sparowane spiralne filamenty (PHF-Paired Helical Filament), widoczne w kilku komórkach warstwy I kory akustycznej. Mitochondriów było mniej, posiadały one różne rozmiary i kształty, większość z nich była mała, okrągła lub wydłużona. Widoczna była utrata grzebieni, ułożonych różnokształtnie.

Morfologiczna przebudowa mitochondriów były widoczne także w przekroju dendrytu oraz w głównych odgałęzieniach komórki Cajala-Retziusa. Z morfologicznego punktu widzenia elipsowate mitochondria posiadały średni średnicę $495\text{-}/+250\text{nm}$ i środkowy $1.4\text{-}/+$. Obwód średni mitochondrium wyniósł 265 nm .

Widoczne były także nieliczne połączenia komórek Cajala-Retziusa z neuronami z innych warstw oraz ilość wypustek dendrytycznych i zakończeń presynaptycznych.

Dyskusja

Większość autorów celem identyfikacji tych komórek stosuje obecnie metodę histochemiczną. Uważamy, że sama relina nie może być markerem specyficznym dla komórek Cajala-Retziusa, gdyż jest wydzielana przez różne subpopulacje neuronów. Duża liczba komórek zawierających relinę jest GABA-ergiczna, a niektóre ujawniają immunoreaktywność z białkami wiążącymi wapń, jak kalretenina wydzielana przez inne subpopulacje sieci neuronalnej kory.

Dla trójwymiarowego uwidocznienia neuronów i celem dokonania ich pomiarów morfologicznych stosowano techniki impregnacyjne srebrem. Komórki Cajala-Retziusa można łatwo odróżnić od innych składających się na I warstwę kory po ci okrągłym kształcie [26].

W mikroskopie elektronowym można je także łatwo zauważyć z uwagi na glejową osłonkę, która otacza ciało komórkowe z wyjątkiem połączeń synaptycznych oraz po oznakach degeneracji [27].

Dane mówiące o istnieniu różnych komórek Cajala-Retziusa u różnych ssaków, wliczając człowieka w różnych fazach rozwojowych nasuwają wnioski, że komórki kontaktują się poprzez wypustki z różnymi warstwami dochodząc aż do opony [31,32]. Dodatkowo obserwacje sugerują brak ograniczenia w czasie migracji tych komórek, która może utrzymywać się u dorosłego człowieka [33].

Wczesna utrata aktywności przez komórki Cajala-Retziusa jest skojarzona z neurologicznym stanem i charakteryzuje się głównie wadami rozwojowymi kory oraz mózdzku [33]. Badania eksperymentalne nad zjawiskiem tzw. „hamowania reliny” ujawniły zaburzenia w rozwoju hipokampa. Wycięcie komórek ze struktur hipokampa zapobiegło wzrostowi wypustek dendrytycznych [34] sugerując, że komórki te i relina pełnią kluczową rolę w tworzeniu połączeń hipokampalnych. U zwierząt z defektem migracji komórkowej stwierdzono nieobecność tych komórek [35].

W dodatku komórki Cajala-Retziusa i relina SA ważnym elementem prawidłowej synaptogenezy w hipokampie i nowej korze [36,37,38]. Allele apolipoproteiny E (ApoE), E3 i E4 hamują wiązanie reliny z receptorami lipoproteinowymi *In vivo* [39], co może mieć znaczenie w ch.A.

Morfologiczna przebudowa komórek jest znacznie dalej posunięta niż w obrębie innych warstw korowych w ch.A [41], podział cystern aparatu Golgiego był lepiej widoczny niż w komórkach Purkiniego mózdzku [42], a mitochondrialna bardziej zaawansowana niż w innych korowych i podkorowych neuronach [44,45,46,47].

Niektóre z objawów ch.A. można wiązać z utratą komórek Cajala-Rheziusa. Cechą charakterystyczną są tzw. Sparowane spiralne filamenty (PHF) [1], objaw związany z hiperfosforylacją białka tau [23,49]. U myszy transgenicznych, u których widoczna była ekspresja genu ApoE4 wzrosły poziomy ufosforylowania białka tau [50]. Z drugiej strony badania dowiodły, że białko można wykryć także u myszy nie produkujących reliny [51,52].

Wnioski

Morfologiczna i morfometryczna ocena komórek Cajala-Rheziusa w korze słuchowej we wczesnym stadium ch.A. ujawniła spadek liczby tych komórek w porównaniu z próbą kontrolną. Komórki które wciąż były na miejscu ujawniały poważne cechy przebudowy morfologicznej szczególnie związanej z mitochondriami i aparatem Golgiego.

Utrata komórek Cajala-Rheziusa w korze słuchowej może uszkadzać korową analizę słuchową.