

DENEYSEL OLUŞTURULMUŞ MOTOR NÖRON HASTALIĞINDA MEDULLA SPİNALİSİN ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELENMESİ

Doç. Dr. İhsan Kara • Dr. Faruk Alkan • Dr. Birol Kalkan

ÖZET: Motor Nöron hastalığı (MNH) üst ve alt motr nöronunu birlikte tutan progressif, degeneratif bir hastalıktır. İlerlemiş devrede motor sistemin hastalığı tümüyle tutulması ise kaçınılmazdır (1,3,10). MNH de patogenezin bilinmemesine rağmen araştırmacıların görürlüğüne vardıkları noktalar, medulla sipinalisin ön boynuz hücrelerinin motor nukleusları ve beyin sapının motor nukleuslarında çok sayıda motor nöron kaybı, kalanlarda büzüşme ve yaygın Lipofuksinin varlığıdır. MNH'in tedavisi de kesin olarak başırlanamamıştır. Guanidin-HCL, end-plate üzerindeki etkisi kesinlik kazanmış ve MNH tedavisinde etkin olduğu bildirilen tek ilaçtır. (6,3). Çalışmamızda Deneysel MNH'in oluşturulmasında 6-Amino nicotinamid (6-AN) kullandık. Yapılan birçok araştırma (6-AN) nin amacımıza en uygun neticeyi elde edebileceğimizi göstermekte idi. Model'imizin Guanidin-HCL ile tedavisinde alınacak sonuçların MNH yakalanmış insanların tedavisi imkanında bir adım teşkil edebileceğini düşündük (14,15,16).

SUMMARY: Motor neuron disease (MND) involves the under and upper part of the motor neuron. its etiology and pathology are not known and there hasn't been any success yet in finding the treatment. We used 6-Aminonicotinamid (6-AN) to constitute MND because of that it is the most appropriate medicine for our aim. We used guanidin HCL for treatment. Becaus it is the most appropriate medicine for treatment that is know. In the cats that were injected only once with 5 mg/kg 6-AN and after that treated with guanidin-HCL and teh control group which were injected with only distilled water did not show any microscopic change. In the anterior horns of the spinal cord of the cats that were injected only once 6-AN 15 mg/kg. There were a lot of vacuol and also there was degeneration of the motor neuron, myelin sheath and glia cells. After we let this group rest, this degenerative changes were resolved. There were not any changes in the cats that were given 15 mg/kg 6-AN and then guanidin HCL for their treatment except gliosis.

METOD

Çalışmamızda 2,5-4,5 kg ağırlığında 46 kedi kullandık. Bunlardan 6 sını kontrol gurubu olarak ayırdık. Diğer kedileri 10 luk guruplara ayırdık ve bütün guruplara değişik mg/kg oranda tek doz 6-AN uyguladık.

1. ci gurup: 5 mg/Kg tek dozluk injeksiyondan sonra 5 tanesi 3 gün diğer 5 tanesi 2 ay sonra işleme alındı.

2.ci gurup: 5 mg/Kg tek dozluk injeksiyonlardan sonra 25 mg/Kg gün Guanidin (HCL ile bir ay tedavi gördü. 10 Kedi de tedavi bitiminde 3 ayda işleme alındı.

3. cü 15 mg/Kg tek dozluk injeksiyondan sonra 5 tanesi 3 cü gün diğer 5 kedi ikinci ayda işleme alındı.

4. ci gurup: 15 mg/Kg tek dozluk injeksiyondan sonra Guanidin-HCL ile 25 mg/Kg/gün olarak bir ay tedvi edildi. 3 cü ayda tedavi bitiminde işleme alındı.

Kontrol gurubundaki 2 kediye 10 cc, 2 kediye 20 cc bidistile su inter peridonal verildi, diğer ikisine hiçbirşey injekte edilmedi.

1 ve 2 ci deney guruplarında 10 cc, 3 cü ve 4 cü gurupta 20 cc bidistile su içinde 6-AN

ve 2 ve 4 cü guruba 20 cc bidistile su içinde Guanidin HCl verildi bütün enjeksiyonlar intra-peritoneal olarak yapıldı.

Ultrastruktürel çalışma için perfüzyon yapıldı. Perfüzyon için aorta abdominalisin proksimal kısmı kullanıldı. Rutin serum setleri ucu alt ekstremitlere dönük olarak üzere sokulup bağlandıktan sonra, sağ ventrikül kesilerek fiksatörün dönüşü sağlandı. Fiksator olarak pH, 7,3 melanin fosfat tamponunda % 3 lük glutar aldehit kullanıldı. Bu işlem oda sıcaklığında yapıldı ve her kedi için 1000 ml kullanıldı. Fiksatörün bitiminde dorsal bölge açılarak Medulla spinalisin dorsal bölgenin ortasında kalan kısmı kesilerek çıkarıldı.

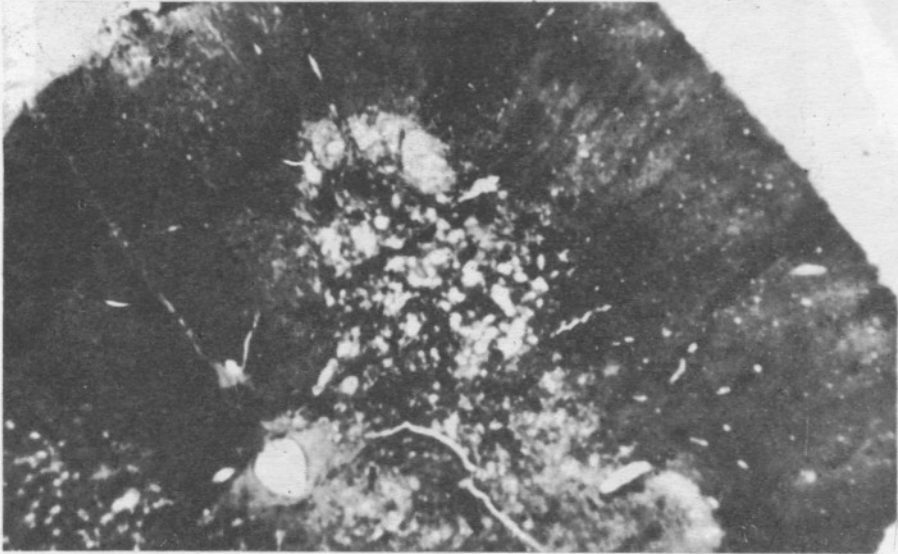
Medulla spinalis segmentleri 1 cm ilk kesitler halinde 24 saat ön fiksasyon için glutar aldehitte tutuldu, ertesi gün bu blokların uçlarından 1 mm kalınlığında düzgün enine kesitler alındı. Fiksator olarak % 1 lik OsO_4 , blok boyası olarak uranil asetat, gömme ortamı olarak epon 812 kullanıldı. 200-300 Å kalınlığındaki ince kesitler kurşun sulfat ve uranil asetatla boyanıp EM 9 S ve EM 10 A da incelendi.

BULGULAR

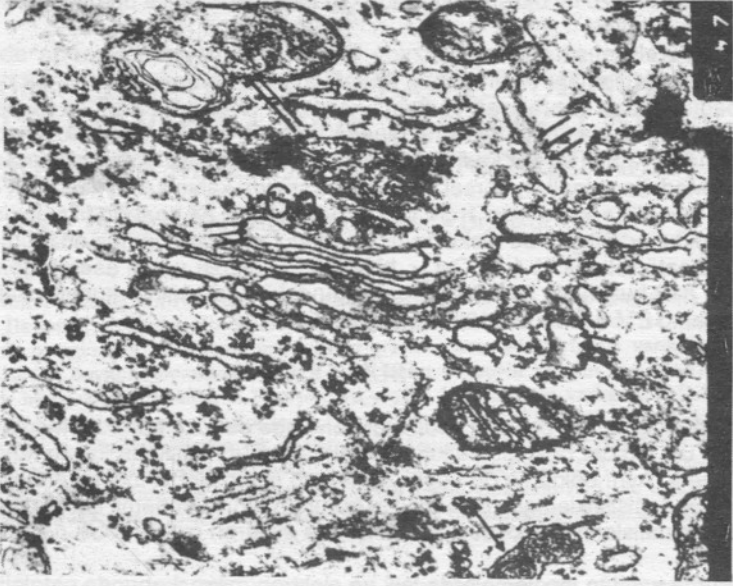
1'ci gurupta (5 mg/Kg, 6-AN) 5 kedi akut dönemde perfüze edildi ve Medulla spinalisin alt dorsal ve üst lomber bölgesinde kalın kesitlerin ışık mikroskobu incelemesinde bir patoloji görülmedi. Aynı bölgenin ön boynuz elektron mikroskobik incelenmesinde de ultrastruktürel yapı değişiklikleri gözlenmedi. Bu gurubun kronik dönemli üst lomber ve alt dorsal Medulla spinalislerin ön boynuzlarında ışık ve elektron mikroskobik değişiklikler tesbit edilmedi.

2'ci gurupta yapılan incelemelerde ışık ve elektron mikroskobunda patoloji saptanmadı.

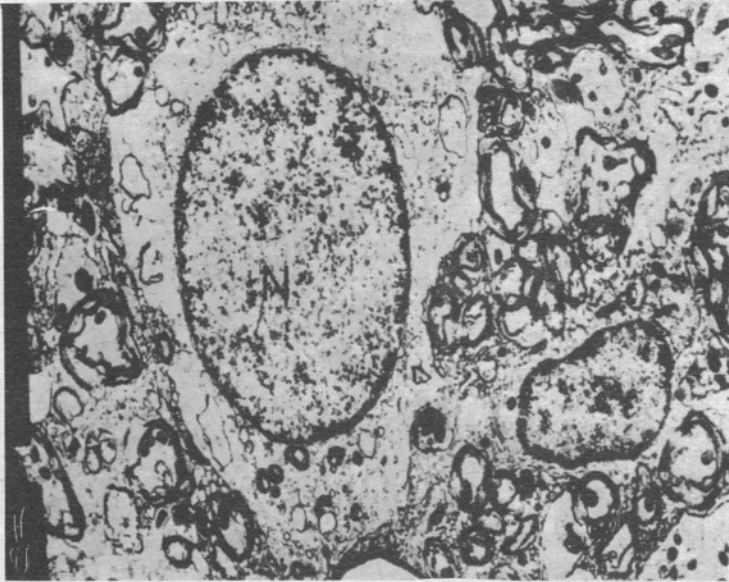
3'cü gurubun 3 günlük denekli hayvanlarının kalın kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde ön boynuz bölgeleri bileteral olarak vakuollerle dolmuştur. Vakuollerin sıklaştığı bölgeler parçalanmış görünümdeydi. Motor nöronların şekillerinde büzüşmeye meyil ve nukleusta yuvarlaklaşma tesbit edildi. Bu alan içindeki myelinli aksonların miyelin kılıflarında dejenerasyon dikkati çekmiştir. Glia hücrelerinde ödem görülmektedir (Resim 1).



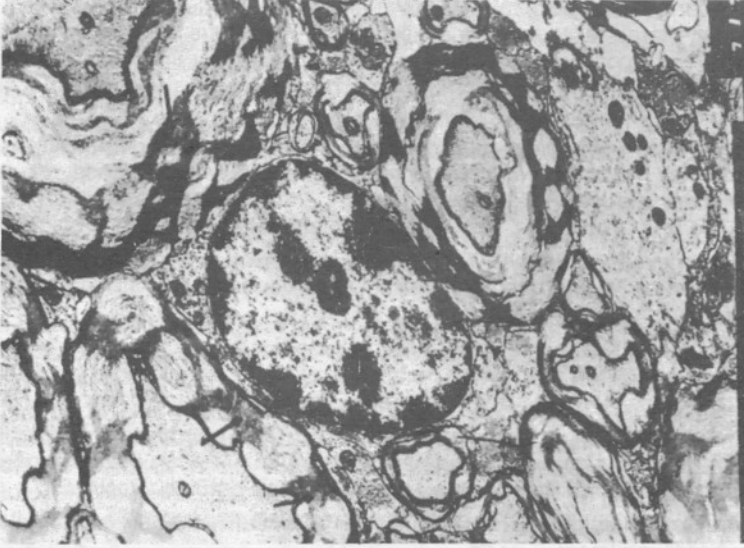
Resim 1: Tek doz 15 mg/Kg 6-AN tatbik edilmiş kedilerin M.S. önbeyaz bölgesinin ışık mikroskobu görünümünde veziküllerin dokuyu parçaladığı gözleniyor x 80.



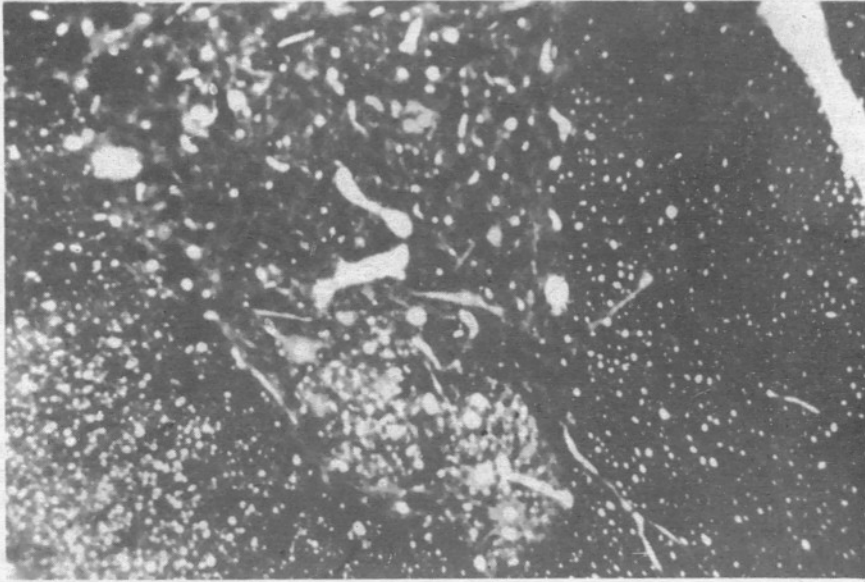
Resim 2: Akut dönemde bir motornöronun E.M. görünüm. Kristalları Lameller bir şekil almış mitekondri (11). Kristalları kaybolmuş yoğun matrixli bir mitokondi (1). SER ve Golgi sisternalarında az yoğun madde birikimi x 3000.



Resim 3: Akut dönemde önboynuzdaki bir astrositten E.M. görünüm. Stoplazmada veziküller, dejenere veya matrixleri yoğunlaşmış mitekondriler görülüyor. Stoplazmik materyel son derece az x 4500.



Resim 4: Akut döneme ait E.M. görünüm. Miyelin düzenliliğini kaybetmiş yer yer yoğunlaşmalar ve miyelin Lamellerinde kaynaşmalar görülüyor x 4500.



Resim 5: 3'cü dönem kronik kedilerde M.S. ön boynuz bölgesi. Motornöron hücreleri sayıca aşalmış. Kalın kesit-Toluidin mavisi x 200.

Elektron mikroskopik incelemelerde akut döneme ait hücrelerde yaygın değişiklikler vardır. Hücreler genelde büzülmüş ve yuvarlaklaşmıştır. Nukleus böbrek şeklini almış, bazıları yuvarlak olarak fakat periferde çekilmiştir. GER azalmış veya şişmiştir. Ribozomlar yaygın veya yeryer polizomlar oluşturmuştur. SER'de ise belirgin bir artış saptandı, hücrelerde sıklıkla "dens body"lere rastlandı. Stoplazmada vakuol artışına paralel olarak mitokondrial defektler de artmaktaydı (Resim 2).

Oligodendronların stoplazmalarında sadece vakuol artışı ön plana çıkmasına karşın, Astrofitlerde olay membran yırtılmasına kadar ilerlemişti ve astrofitlerin çoğu stoplazmik yapıları dejenere olmuştu. Nukleuslar yuvarlaktı, ancak kromatin kaybı barizdi. Bu değişiklikler yanında ön boynuzda az sayıda da olsa makrofajlara rastlandı (Resim 3).

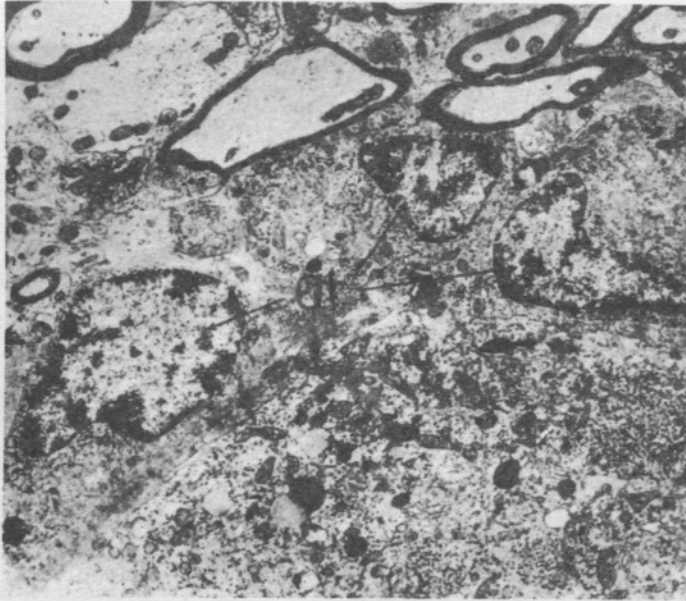
Aksonların miyelin kılıflarında her alanda yıkılma ve dejenereasyon tesbit edildi. Geniş aksonlarda mitokondrileri, nörofilament, veziküller ve dens body ler sıklıkla görülen yapılarıydı (Resim 4).

Bu gurubun kronik deneklerinde (6-AN tatbikinden 2 ay sonra) kalın kesitler ışık mikroskopla incelendiğinde ön boynuz motor hücrelerinde sayıca azalma görüldü. Alanlar yaygın gliosis vardı. Bu değişiklik gri maddenin diğer kısımlarında görülmeydi (Resim 5).

Elektron mikroskopik incelemelerde Motornoron hücrelerde bariz değişiklikler görülmemektedir. Miyelinli akson kılıflarında akut dönem bozuklukları düzelmiş görülmektedir. Oligodendroglia ve astrositlerde artma nedeni ile gliosis görüldü (Resim 6).

4'cü grupta (Guamidin HCl tedavili) ışık ve elektron mikroskopik incelemelerde gliosis dışında değişiklik görülmedi.

5'ci grupta distile su enjekteli ve deneksiz kedilerin 6'sında ışık ve elektron mikroskopik değişiklikler saptanmadı.



Resim 6: Kronik dönemde Glia hücreleri E.M. görünüm. Glia hücreleri sayısında artış gösteriyor. Miyelinli ve Miyelinsiz sinir lifleri arasında oligodendrositler görülüyor x 4500.

İRDELEME

Çalışmamızda deneysel Motornöron hastalığı oluşturmak üzere kullandığımız 6-AN merkezi sinir sisteminde akut dejeneratif etki yapmakta (1,4,16,17) dir. 6-AN nöral doku da glikohidrogenaz yoluyla 6-AN-NAP ve 6-AN-NADP'ye dönüşmekte bu madde de 6-plaspkoglukonate dehydrogenate'i inhibe ederek noroglianin fonksiyonu bozmaktadır (8,9,10). 6-AN periferik sinirleri direk etkilememekte ancak aksoplazmik akımı bloke ederek etkili olmaktadır (3,5,2,12).

İlk iki grupta bulunan 20 kediye 5 mg/Kg tekdoz 6-AN verilmiştir. Bu grupta kedilerde 2'ci ve 3'cü günde görülen iştahsızlık dışında belirti gözlenmemiş, kediler günlük aktivitelerini normal olarak sürdürmüşlerdir. 2'ci gruptaki 10 kediye verilen guanidin-HC1'nin de davranışta belirgin etkisi görülmemiştir.

Yapılan Histolojik tetkiklerde hem ışık hem EM değerlendirmelerde medulla spinaliste patolojik bulguların olmaması Schneider (14) ini 5 mg/Kg tekdez 6-AN'nin kalıcı bozukluk yapmadığı görüşüne uygundur.

3 ve 4 grupta yüksek dozda (15 mg/Kg) 6-AN verilen 20 kedinin tümünde 5'inci saat-ten itibaren 24 saat içinde gittikçe artan davranış bozukluğu tesbit edildi. 10'uncu saatte belirginleşen kuvvet kaybı 18'inci saatte maksimuma ulaştı. 24'ncü saatte ağırlı Stimuluslara motor tepki verilmedi. Bu görünüm Sternberg (15), Welf (17), Galler (7), Schneider (14) ve Chui (4) nin görüşlerini desteklemektedir.

3'cü gurubun 3 gün sonra alınan örneklerin ışık ve EM incelemesinde Medulla spinalisin ön boynuz alanları Rexed'in tarifine uygun olarak parçalanmış görünümdeydi. Glial hücrelerde ödem Akson ve miyelinde görülen parçalanma, Motornöronlarda büzüşme ve nukleusun böbrek şeklinde bir tarafının basık bir şekil alması Sternberg (15), Welf (16) ve Herken (9) un bulgularını desteklemektedir.

Motornöronlarda görülen GER azalması, SER deki artış polizomların çoğalması, dens body'lerin ortaya çıkması, vakuol oluşumu ve mitokondri defectleri ile Glial hücrelerdeki aşırı ödem, oligodendrositlerde stoplazma yoğunluğunun azalması ve vakuol oluşumu, miyelinleri hasara uğramış aksonlarda granülemitekondri paketleri ve buralardaki defectler literature uygunluk göstermektedir (14,11).

3'cu gurubun geç dönem deneklerinde alınan kesitler incelendiğinde hem ışık hemde E.M. incelenmesinde erken dönemde görülen defectler tesbit edilmemiştir. Görülen değişiklik öne boynuzun 6 ve 7'ci bölgelerinde motornöronların azalmasına karşın belirgin gliozis'in vardır. Bu durum Harita (10) ın görüşünü desteklemektedir.

4'cü grupta ışık ve E.M. da yapılan incelemelerde herhangi bir defekt görülmediği gibi gliozis'te azalma tespit ettik.

5'ci gruptaki kontrol hayvanlarının medulla spinalis'lerinin ışık ve elektron mikroskobu incelemesinde bir değişiklik görülmemiştir.

SONUÇ

Yapılan deneysel MNH oluşturan 6-AN küçük dozlarda hemen hiç patolojik olaya sebep olmamakta hafif iştahsızlık gibi belirtilen kısa zamanda ortadan kalkmaktadır. Yüksek doz 6-AN deneklerde kısa sürede gerek davranış gerek histolojik bozukluğa neden olmaktadır. Bu bozukluklar geri dönüşlü olup belirli zamanda ortadan kalkmaktadır. Guanidin HCl kısa sürede deneklerde belirgin bir düzelme sağlamaktadır. Bu düzelme Guanidin verilmeyen deneklerde görülen patolojik olayların Guanidin verilenlerde oldukça azalması şeklinde izlenmektedir.

Sonuç olarak oluşturan model MNH lı hayvanlarda tesbit edildiği gibi Guanidin HCl klinikte tam iyileşme sağlanmasa bile belirgin bir düzelmeye sebep olabilecek bir etkiye sahiptir diyebiliriz.

KAYNAKLAR

- 1- Ansgar Torvik and Fredric Skjörten: Electron microscopic Observations on nerve cell regeneration and degeneration after Axon lesions. *Acta Neuropath (Berl)* 17, 265-282, 1971.
- 2- Boegman, R. J., Albuquerque, E.X.: Axonal transport in rats tendered poraplegic following A single subarachnoid injection of either batrachotoxin or 6-Aminonicotinamide into the spinal cord. *Journal of Neurobiology* Vol. 11, No: 3, pp: 283-290, 1980.
- 3- Brzoska, H.R., and Adhami, H.: Electronmicroscopic study of the effect of 6-AN on the Sciatic Nerve in Newborn Rats. *Acta Neuropath (Berl)* 33, pp. 59-66. 1975.
- 4- Chui, E., and Garcia, J.H.: Pathogenesis of 6-Aminonicotinamide Neurotoxicity. New structural Analysis, Progress in Neuropathology, Vol. 4, Edited by Harry M. Zimmermann, Raven press, New York, 1979.
- 5- Friede, R.L. and Bischhausen, R.: How do axon control myelin formation. *Journal of the Neurological Sciences*. 35: 341-353, 1978.
- 6- Galvan, M., Grage P., and Ten Bruggencate, G.: Facilitatory Actions of Guanidine on synaptic transmission in mammalian brain slices. *Experimental Neurology*., 67, 234-246, 1980.
- 7- Geller, L.L., Cowen, d., and Wolf, A.: Effect of the antimetabolite, 6-Aminonicotinamide, on sound-induced seizures in mice. *Experimental Neurology* 14. (86-98), 1966.
- 8- Herken, H., Lange, K., and Kolbe, K.: Brain disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway Biochemical and biophysical research communications. Vol. 36, No 1, pp. 93-100, 1969.
- 9- Herken, H., Meyer, E., Estorf, G., Halbhüner, K., Loos, D.: Spastic Paresis after 6-Aminonicotinamide: Metabolic disorders in the spinal cord and Electromyographically Recorded Changes in the hind limbs of rats. *Mauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 293-245-255, 1976.
- 10- Horita, N., Ishii, T., and Izumiyama, Y.: Ultrastructure of 6-Aminonicotinamide (6-AN)-Induced Lesions in the central Nervous System of rats. *Acta Neuropathol.*, (Berl) 49: 19-27, 1980.
- 11- Horita, N., Oyanagi, S., Ishii, T., and Izumiyama, Y.: Ultrastructure of 6-Aminonicotinamide (6-AN) induced lesions in the central nervous system of rats. *Acta Neuropathol.*, (Berl), 44:11-119 (1978).
- 12- Max, S.R., Deshpande, S.S. and Alqueue, E.X.: Neural refulation of muscle acetylcholinesterase: Effects of batrachotoxin and 6-Aminonicotinamide. *Brain Res* 130/1 pp. 101-107, 1977.
- 13- Otsuka, M., and Endo, M.: the effect of Guanidine on neuromuscular transmission, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 128: 273, 1980.
- 14- Schneider, H. and Cerver-Navarro, J.: Acute Gliopathy in spinal cord and Brainstem Induced by 6-Aminonicotinamide *Acta neuropathol (Berl)*, 27,11-23, 1974.
- 15- Sternberg S.S., Philips, F.S.: 6-Aminonicotinamide and Acute degeneratif changes in the central nervous system. *Science* Vol. 127, pp. 644, 1957.
- 16- Wolf, A., and Cowen, D.: Pathological changes in the central nervous system produced by 6-Aminonicotinamide. *New York, Pathological Society*, Vol. 35, No: 12, pp. 814-817, 1959.
- 17- Wolf, A., Cowen, D., and Geller, L.M.: The effects of an Antimetabolite, 6-Aminonicotinamide on the central nervous system. *Trans. Am. Neurol. Assol.*, 84: 140-145 (1959).