

Ciałka Lafory w ośrodkowym układzie nerwowym psa beagle przyczyną napadów padaczkowych

ZENON SOŁTYSIAK, KRISZTINA KUNGL*, JÓZEF NICPOŃ*

Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów,
pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

Sołtysiak Z., Kungl K., Nicpoń J.

Lafora bodies causing seizures in the Central Nervous System of a Beagle

Summary

Seizures were observed in a three year old beagle. Histopathology of the brain revealed the presence of Lafora bodies. These bodies are intracytoplasmic neuronal inclusions that occur in the CNS of dogs and in this case their presence was associated with neurological disorders, such as progressive primary generalized seizures. Lafora bodies were present within the neuronal pericaria, dendrites and axons or unattached in the neuropil. The lafora bodies were ovoid in shape, basophilic, and strongly PAS-positive. They were randomly distributed, particularly in the neurons of frontal, parietal, temporal, occipital cortex, thalamus, hypothalamus, cerebellum, medulla oblongata, and the spinal cord.

Keywords: seizures, dog CNS, Lafora bodies

W ludzkiej terminologii neurologicznej pod pojęciem stanów napadowych, rozumie się zarówno padaczkę, jak i napady padaczkowe nie będące wyrazem padaczki, a także stany napadowe nie będące napadem padaczkowym. Padaczka jest przewlekłym zespołem chorobowym mózgu o różnorodnej etiologii, cechującym się napadami padaczkowymi, napadami drgawkowymi, powtarzającymi się bez żadnej uchwytnej przyczyny napadami drgawkowymi lub innymi stanami napadowymi. W sensie elektrofizjologicznym napad padaczkowy jest gwałtowną zmianą czynności mózgu, wynikającą z napadowych wyładowań neuronalnych, związanych z zaburzeniami biochemicznymi. Pojęcia padaczki i napadu padaczkowego często używane są jako pojęcia zastępcze. Jest to błędne, gdyż napad padaczkowy jest objawem, a nie chorobą. W powstawaniu napadów padaczkowych znaczenie mają takie czynniki, jak: a) zmiany morfologiczne lub czynnościowe mózgu, które powodują patologiczny wzrost pobudliwości komórek nerwowych, b) genetycznie uwarunkowany niski próg pobudliwości drgawkowej, c) tzw. mechanizmy spustowe, sprzyjające wystąpieniu napadu. Napad padaczkowy jest podstawowym elementem padaczki. Może on mieć różnorodny charakter i będzie określał różne zespoły kliniczne.

W dostępnym piśmiennictwie istnieją różne klasyfikacje napadów padaczkowych (1, 16). Opierają się one na modyfikacjach klasyfikacji z medycyny ludzkiej. U ludzi zgodnie z międzynarodową klasyfikacją dzieli się napady na: 1) częściowe (o elementarnej lub złożonej symptomatologii) i wtórnie uogólnione, 2) uogólnione, które dzieli się na: a) toniczne, b) kloniczne, c) toniczno-kloniczne, d) miokloniczne, e) atoniczne, f) akine-

tyczne, 3) jednostronne lub przeważnie jednostronne, 4) niesklasyfikowane. Napady uogólnione dzielą się na napady drgawkowe bez umiejscowionego początku i napady bezdrgawkowe. Napady drgawkowe mogą występować pod postacią napadów toniczno-klonicznych, tonicznych, klonicznych i mioklonicznych. Zasadniczą cechą wymienionych napadów jest wczesna utrata przytomności inicjująca napad, symetria objawów drgawkowych oraz ich uogólnienie. Wystąpienie napadu może na 1-2 dni wyprzedzać okres zwiastunowy, który polega na wystąpieniu rozdrażnienia, trudności skupienia uwagi, złego samopoczucia. Napad rozpoczyna się utratą świadomości, połączony ze skurczem wszystkich mięśni. Niekiedy człowiek lub zwierzę wydaje donośny krzyk. Żrenice rozszerzają się i nie reagują na światło. Pojawia się krótkotrwały bezdech, połączony z sinicą. Może dojść do oddania moczu, przygryzienia języka i obecności piany na ustach. Czas trwania fazy tonicznej nie przekracza 30 sekund, po czym występuje trwająca nieco dłużej faza kloniczna z następującą śpiączką, przechodzącą w głęboki sen trwający niekiedy kilka godzin (3).

Wystąpienie napadu padaczkowego może powstać na podłożu genetycznym zaburzeń metabolizmu komórek nerwowych, organicznych uszkodzeń mózgu na różnym tle, procesów nowotworowych, zwyrodnieniowych czy zapalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Choroba Lafory (postępująca miokloniczna padaczka typu Lafora) należy do rzadko spotykanych zwyrodnieniowych schorzeń OUN ludzi. Ciałka Lafory są uznane za patognomiczne dla padaczki mioklonicznej. Choroba Lafory u ludzi jest przekazywana jako cecha autosomalna (gen EPM2A kodujący białko o długości 331

aminokwasów), ustępująca, nieco częściej występująca u płci żeńskiej. Rozpoczyna się pomiędzy 6. a 20. rokiem życia. Najwcześniejszym objawem są uogólnione napady padaczkowe, do których dołączają się w różnym okresie czasu mioklonie i postępujące otępienie umysłowe, objawy mózdkowe i zaburzenia pozapiramidowe o typie parkinsonoidalnym. Przebieg schorzenia jest przewlekłe postępujący i prowadzi do śmierci po kilku lub kilkunastu latach od momentu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych.

Etiologia tego schorzenia związana jest ze zniekształceniem domeny łączącej węglowodany (carbohydrate binding domain – CBD) białka laforin, które w efekcie nie mogą się łączyć z glikogenem i ulegają wytrąceniu pod postacią ciałek Lafory (17). Niektórzy autorzy zgłaszają jednak zastrzeżenia co do swoistości zmian, stanowiących podstawę tej hipotezy. Badania neuropatologiczne, poza obecnością charakterystycznych wtętuw w neuronach zwanych ciałami Lafory lub ciałkami mioklonicznymi u ludzi, wykazują obecność materiału w mięśni sercowym (18), wątrobie, mięśniach szkieletowych, siatkówce i nerwach rdzeniowych (11). Ponadto w tej chorobie obserwuje się nieswoiste zmiany w postaci zaniku komórek nerwowych i gęstość włóknistą istoty białej. Typowe ciałka Lafory w OUN ludzi posiadają koncentryczną budowę warstwową. Wtęty homogenne spotyka się znacznie częściej. Są silnie zasadochłonne, mniejsze niż jądro oligodendrocytu i oddzielone od cytoplazmy jasnym, nie barwiącym się „halo”. Występują one przede wszystkim w małych komórkach nerwowych i ich wypustkach neuronalnych. Ciałka o budowie warstwowej spotyka się głównie w perykarionach. Oba rodzaje ciałek mioklonicznych, pomimo że nie zawierają glikogenu, są szczególnie dobrze widoczne w barwieniu karminem Besta, którym barwią się dodatkowo dzięki obecności wiązań alfa 1-4 w polimerze glukozy (12). Budowa mikroskopowo-elektronowa (M-E) obu rodzajów ciałek mioklonicznych jest zasadniczo podobna. Ciałka te o małej gęstości elektronowej wypełnione są materiałem niejednorodnym, w którym występują nieregularnie ułożone struktury włókniste, o średnicy 7-13 nm i materiał ziarnisty tworzący często skupienia. Duże ciałka miokloniczne nie mają błony otaczającej i zawierają wspomniane uprzednio struktury włókniste i materiał ziarnisty, pomiędzy którymi znajdują się, głównie na obwodzie wtętu, organelle cytoplazmatyczne (6). Nemetsek i wsp. (13) uważają, że struktury włókniste o typowych cechach ultrastrukturalnych utworzone są z rozgałęzionych cząstek wielocukru i posiadają budowę zbliżoną do amylopektyny. Ustalono badaniami histochemicznymi i histoenzymatycznymi, że ciałka Lafory zawierają kompleks polisacharydowo-białkowy, w którym komponent cukrowy stanowi rozgałęziony polimer glukozy. W wyizolowanych ciałkach Lafory Yokoi i wsp. (18) wykazali 80% glukozy i tylko 6% białka. Występowanie ciałek Lafory w poszczególnych strukturach mózgu jest zmienne, podobnie jak liczba wtętuw w poszczególnych przypadkach. Najczęściej spotyka się je w jądrze zębatym, istocie czarnej, korze mózgu, zwłaszcza w zakrętach czołowych i centralnych, wzgórze, w warst-

wie ziarnistej mózdzku i na całej długości rdzenia kręgowego (11, 15).

Ciałka Lafory były opisywane również w OUN psów i innych gatunków zwierząt pochodzących z różnych środowisk. Choroba Lafory u psów (neuralna glikoproteinoza, wrodzona progresywna padaczka psów) została kilkakrotnie opisana (2, 5, 6, 8, 10). Opisywano ją częściej u młodych psów, głównie ras takich, jak: beagle, pudle czy bassety, u których wcześniej występowały ataki padaczkowe lub zaburzenia neurologiczne w postaci skurczów mioklonicznych mięśni głowy, szyi lub depresji i senności (4, 8). Ciałka Lafory psów były wielkości 5-20 μm , bazofilne z kompleksem glukoproteinowym zajmującym perykarion, dendryty czy akson. Obserwowano je również pozakomórkowo, co jest skutkiem rozpadu komórki. U psów z chorobami neurologicznymi ciałka Lafory są szczególnie częste w komórkach Purkiniego mózdzku. Często występują w głównych dendrytach w sąsiedztwie warstwy molekularnej, neuronach wzgórze i są także przypadkowym znaleziskiem ujawnianym z wiekiem psów, które nie wykazują żadnych objawów neurologicznych. Opisane ciała Lafory były tworami okrągłymi, średnicy około 15 μm i nie wykrywano ich u psów młodszych niż 2-letnie (14).

Celem pracy było przedstawienie progresji choroby neurologicznej u psa z obrazem padaczki, która w badaniu mikroskopowym ośrodkowego układu nerwowego okazała się chorobą Lafory.

Opis przypadku

W niniejszym opracowaniu przedstawiono przypadek kliniczny, w którym zdiagnozowano padaczkę miokloniczną. Pies, beagle, samiec, trikolor o masie ciała 14 kg, został nabyty w wieku 2,5 lat. Zwierzę przez całe życie utrzymywane było w warunkach kenelowych w towarzystwie innych beagli (z dostępem do wybiegu oraz wychodziło na spacer). Pies żywiony był karmą komercyjną kompletnie zbilansowaną. Odrobaczany był 3 razy do roku i corocznie szczepiony przeciwko chorobom zakaźnym. Pies ani przed wystąpieniem schorzenia, ani w trakcie jego trwania nie chorował na inne choroby; miał jedynie niewielkie wyłysienia na łapach, które wyleczono stosując miejscowo chlorcheksydynę.

Pierwsze objawy nerwowe zaobserwowano w wieku 3 lat. Na kilka minut przed atakiem obserwowano aurę strachu oraz niepokoju, po czym następował atak uogólniony toniczno-kloniczny (typu grand mal) trwający ok. 1 minuty. Po ataku przez ok. 10 minut zwierzę było otępiałe i nie reagowało na bodźce zewnętrzne. Następnie zachowanie wracało do normy. Badanie neurologiczne psa nie wykazało żadnych odstępstw od stanu prawidłowego. Początkowo ataki występowały z częstotliwością jeden atak na 6-8 tygodni (zawsze w nocy), dlatego nie stosowano leków przeciwpadaczkowych. W połowie czerwca 2002 r. pies miał 2 ataki w ciągu dnia, dlatego zdecydowano o zastosowaniu doustnie phenobarbitalu w ilości 2 \times 50 mg dziennie. W trakcie stosowania takiej dawki nie zanotowano ataków padaczkowych. Po 3 miesiącach bez występowania ataków obniżono dawkę o 25%, po czym po tygodniu zaobserwowano atak padaczkowy podobny do opisanych wyżej. Zwiększono dawkę leku do 150 mg dziennie, a po miesiącu zmniejszono do 100 mg dziennie w dwóch dawkach podzielonych. Przy takim lecze-

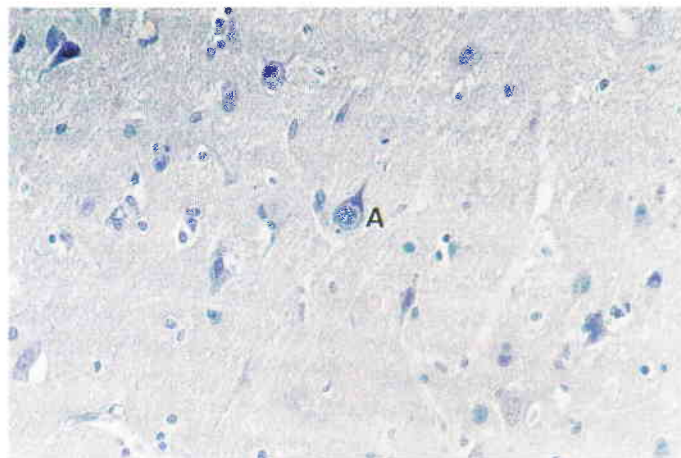
niu nie wystąpiły ataki padaczkowe przez ok. siedem miesięcy. W tym czasie przeprowadzono szczegółowe kontrolne badanie krwi: wszystkie parametry były w zakresie normy. W maju, pomimo stosowania leku, wystąpił atak toniczno-kloniczny uogólniony, ale z bardzo przedłużonym okresem depresji po ataku. Pomimo zwiększenia dawki leku do 200 mg dziennie w ciągu następnego dnia wystąpiły krótkie ataki bezdrgawkowe polegające na nagłej depresji, ośpieniu i zaburzeniach świadomości (pies był silnie osowiały). W ciągu następnej nocy wystąpił stan padaczkowy: ciągła silna depresja, bez reakcji na bodźce zewnętrzne oraz częściej niż raz na godzinę całkowita utrata przytomności i atak typu grand mal. Dożylne podanie diazepamu nie doprowadziło do przerwania stanu padaczkowego. Po podjęciu decyzji o eutanazji pies otrzymał dodatkowo środki premedykujące (ksylazyne, ketamine), po których znowu pojawiły się silne skurcze uogólnione. Psa poddano eutanazji.

Wykonano badanie sekcyjne. Do badań histopatologicznych pobrano wycinki ośrodkowego układu nerwowego wg schematu badań neuropatologicznych. Preparaty barwiono metodami: hematoksylina Delafielda i eozyne (H-E), met. Nissla, czerwień Kongo i PAS. Pomiarów ciałek Lafora dokonano z wykorzystaniem systemu pomiarowego Multi-ScaneBase.

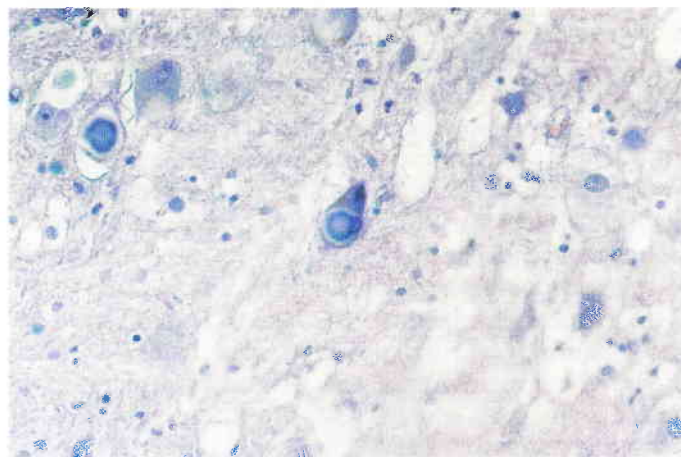
Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badanie sekcyjne w zakresie narządów klatki piersiowej i jamy brzusznej nie wykazało zmian. Badaniem histopatologicznym wycinków OUN psa wykazano wewnątrzcytoplazmatyczne ciała Lafora, które zajmowały wszystkie badane struktury OUN. Komórki nerwowe w około 10-15% populacji posiadały ciała Lafora. Perykariony neurocytów były rozdęte wskutek obecności ciał wtrętowych, a ich cytoplazma barwiła się jasnoniebiesko hematoksylina. Miały one charakter okrągłych wtrętów śródplazmatycznych o zróżnicowanych rozmiarach od 5,6 nm, (pow. 20,5 nm²) do 19,7 nm, (270 nm²). Średni wymiar ciałek Lafora wynosił 10,9 nm, (71 nm²). Dojrzałe ciała to twory okrągłe, rzadziej nieregularne, zbudowane z gęstego rdzenia intensywnie barwiącego się metachromatycznie w metodzie Nissla, hematoksylina na niebiesko, met. PAS na czerwono. W barwieniu czerwień Kongo na amyloid były negatywne. Rdzeń wtrętu otaczał jasne, niebarwiące się halo. Obwód wtrętu był nierówny, wykazywał promienistości. W kierunku obwodu widoczne było niebarwiące się halo i wybarwiona na niebiesko błona graniczna oddzielająca ciało Lafora od elementów cytoplazmy perykarionu. Właściwości histochemiczne pozwoliły na ich odróżnienie od innych typów ciał wtrętowych. W obrazie mikroskopowym wyróżnia się odmiany strukturalne ciałek Lafora, które zostały uszeregowane w dwa podstawowe typy: jednorodny i współśrodkowy.

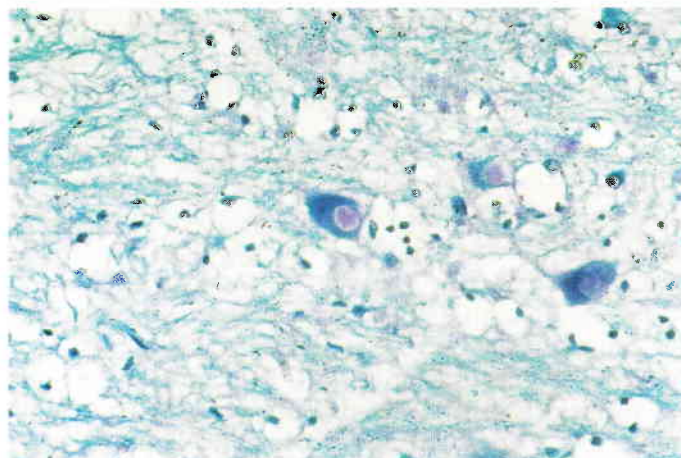
W opisanym przypadku występował głównie jednorodny typ ciałek Lafora charakteryzujący się okrągłą, kulistą częścią centralną i bezstrukturalnym pierścieniem otaczającym. W jednej komórce nerwowej obserwowano tworzenie się nawet czterech ciałek Lafora, wówczas perykarion przypominał owoc maliny lub morwy. Ciała Lafora występowały w każdej warstwie neurocytów kory bez wybiórczej lokalizacji (ryc. 1). Licznie występowały



Ryc. 1. Kora ciemieniowa psa, beagle w wieku 3 lat. A – dojrzałe ciało Lafora w perykarionie komórki piramidowej, H-E, pow. 400 ×

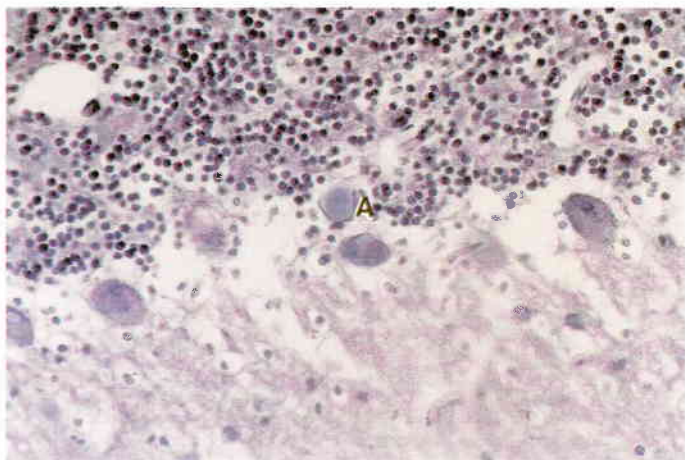


Ryc. 2. Uformowane ciała Lafora w perykarionach podstawy mózdzku psa rasy beagle, H-E, pow. 400 ×



Ryc. 3. Uformowane ciała Lafora w perykarionach podstawy mózdzku psa rasy beagle, met. PAS, pow. 400 ×

powowały w neuronach kory węchowej, czołowej, ciemieniowej, potylicznej, skroniowej, jądrze ogoniastym, wzgórzu, podwzgórzu, strukturach formacji hipokampa, istocie czarnej, ciele kolankowym bocznym, w neuronach piramid i ciała trapezowatego. W neuronach jądrach podstawy mózdzku, rdzeniu przedłużonym wykazano liczne, duże ciała Lafora (ryc. 2, 3). Tworzące się ciała Lafora powodowało ucisk i zepchnięcie jądra komórki



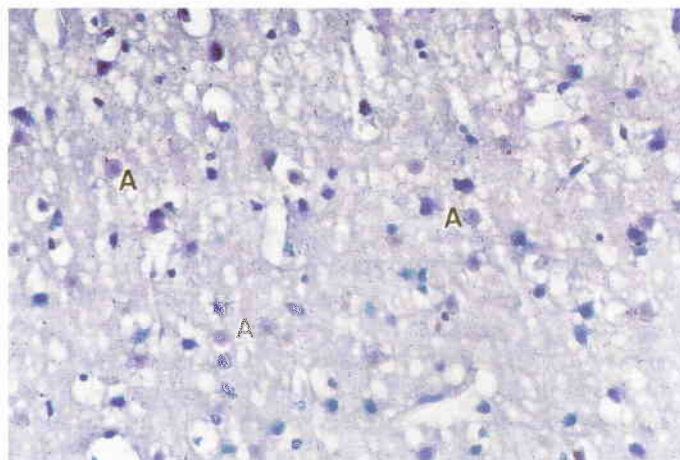
Ryc. 4. Warstwa komórek Purkinjego mózdzku psa rasy beagle. A – komórka Purkinjego mózdzku z ciałkiem Lafory, H-E, pow. 400 ×

nerwowej na obwód lub w kierunku wypustki, wskutek czego jądro przyjmowało kształt półksiężyca. Elementy cytoplazmy komórki zanikały i następował rozpad komórki, a śladem po komórce było duże, uformowane ciało Lafory. Mikroskopowa obserwacja ciał Lafory pozwala wyróżnić różne formy morfologiczne powstających ciałek Lafory: a) gromadzenie materiału w perykarionie, dendrytach lub aksonie neurocytów widoczne pod postacią jasnoniebieskich wakuoli, b) ciała Lafory z gęstym, niebieskim rdzeniem na różnym etapie formowania, c) uformowane ciało Lafory z dużym, gęstym rdzeniem i nieregularnym zarysem obwodu rdzenia, jasnym halo i zewnętrzną obwódką, d) uformowane ciało Lafory z nieregularnym zarysem obwodu rdzenia bez jasnego halo.

Pojedyncze ciała Lafory znajdowano w neurocytach formacji hipokampa, perykarionach, dendrytach komórek Purkinjego i komórkach Golgiego typu II mózdzku (ryc. 4). Bardzo liczne ciała znajdowały się w komórkach koszyczkowych i gwiazdzistych warstwy molekularnej mózdzku (ryc. 5). W małych komórkach warstwy ziarnistej i w komórkach gleju ciałek Lafory nie stwierdzono.

W mikroskopie świetlnym, immunohistochemicznie i w mikroskopie elektronowym ciała Lafory podobne są do ciał skrobiowych (*corpora amylacea*) stwierdzanych w OUN (9, 12, 13) czy też w narządach wewnętrznych, np. płucach (7), oraz ciałek Lewy'ego (choroba rozsianych ciałek Lewy'ego u ludzi z lokalizacją w neuronach istoty czarnej mózgu) (4, 12).

Przebieg choroby Lafory oraz objawy kliniczne u psów mogą być różne. Opisane przypadki obejmują rasy: beagle, basset hound, pudel, małe psy walijskie w wieku od 5 miesięcy do 10 lat. W każdym przypadku występowaniu ciałek Lafory towarzyszyły postępujące objawy nerwowe. Opisane ataki padaczkowe miały jednak bardzo różny przebieg: od drgawek głowy (2), poprzez częściowe napady dotyczące głowy oraz przednich kończyn (5), aż po uogólnione ataki toniczno-kloniczne (1, 10). W opisanym przypadku charakterystyczne były krótkie ataki toniczno-kloniczne na początku oraz zaburzenia świadomości bez drgawek i silne ośpienie pod koniec choroby.



Ryc. 5. Warstwa molekularna mózdzku psa rasy beagle. A – PAS dodatnie ciała Lafory w komórkach nerwowych, PAS, pow. 400 ×

W trakcie badania neurologicznego psów wymienionych ras, u których występują różne postacie ataków padaczkowych należy uwzględnić wrodzone zaburzenia metabolizmu neuronów OUN pod postacią choroby Lafory. Ze względu na podłoże genetyczne tego schorzenia warto by było zwrócić szczególną uwagę na konkretne linie hodowlane psów. Ponieważ zarówno przebieg choroby, jak i zmiany histopatologiczne wykazują duże podobieństwo do schorzenia u ludzi, pies może stanowić dobry model badawczy (10).

Piśmiennictwo

1. Braund K. G.: Clinical Syndromes in Veterinary Neurology. Mosby Inc., St. Louis 1994, 167-168.
2. Cusick P. K., Cameron A. M., Parker A. J.: Canine neuronal glycoproteinosis – Lafora's disease in the dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1976, 12, 518-521.
3. Czochońska J.: Neurologia dziecięca. PZWL, Warszawa 1985.
4. Davis K. E., Finnie J. W., Hooper P. T.: Lafora's disease in a dog. Aust. Vet. J. 1990, 67, 192-193.
5. Hegreberg G. A., Padgett G. A.: Inherited progressive epilepsy of the dog with comparisons to Lafora's disease of man. Fed. Proc. 1976, 35, 1202-1205.
6. Holland J. M., Davis W. C., Prieur D. J., Collins G. H.: Lafora's disease in the dog a comparative study. Am. J. Pathol. 1970, 58, 509-529.
7. Hollander D., Hutchins G. M.: Central spherulites in pulmonary corpora amylacea. Arch. Pathol. Lab. Med. 1978, 102, 629.
8. Jian Z., Alley M. R., Cayzer J.: Lafora's disease in an epileptic Basset hound. N. Z. Vet. J. 1990, 38, 75-79.
9. Kruś S., Skrzypek-Fakhoury E.: Patomorfologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1996.
10. Mackenzie C. D., Johnson R. P.: Lafora's disease in a dog. Aus. Vet. J. 1976, 52, 144-145.
11. Mc Gavin M. D., Carlton W. W., Zachary J. F.: Thomson's Special Veterinary Pathology. Mosby a Hecourt Health Sciences Company, St. Louis 2000.
12. Mossakowski M., Dymecki J., Wender M.: Podstawy neuropatologii. PZWL, Warszawa 1981.
13. Nemetschek Th., Volk B., Ule G.: Die sogenannten Filamente in Lafora-Körperchen Corpora amylacea und Bielschowsky-Körperchen. Fascioläre Substrukturen in intraplasmatischen Speicherungsprodukten bei cellulären Dysmetabolien. Acta Neuropathol. (Berl.) 1975, 33, 79-84.
14. Suzuki Y., Akiyama K., Suu S.: Lafora-like inclusion bodies in the CNS of aged dogs. Acta Neuropathol. (Berl.) 1978, 44, 217-222.
15. Suzuki Y., Ohta K., Kamiya S., Suu S.: Topographic distribution of Lafora-like bodies in the spinal cord of some animals. Acta Neuropathol. (Berl.) 1980, 49, 159-161.
16. Šrenk P., Galková R.: Padaczka u psów. Mat. konf. Neurologia weterynaryjna. Puławy 1998.
17. Wang J., Stuckey J. A., Wishart M. J., Dixon J. E.: A unique carbohydrate binding domain targets the Lafora disease phosphatase to glycogen. J. Biol. Chem. 2002, 277, 2377-2380.
18. Yokoi S., Aikawa Y., Maeda S.: The myocardium in Lafora disease. Acta Neuropathol. (Berl.) 1975, 33, 343-349.