

Clinica neurologică Tg.-Mureş (cond. acad. prof. dr. Dezső Miskolczy, doctor
in ştiinţe medicale)

REZULTATELE UNOR EXAMINĂRI HISTOCHIMICE IN CITEVA CAZURI DE GLIOBLASTOM MULTIFORM

György Róth

În ultimul timp se acordă o atenţie din ce în ce mai mare caracteristicilor biochimice şi histochimice ale tumorilor. Faptul e de altfel firesc, deoarece cunoaşterea tot mai adîncă a proceselor metabolice ale tumorilor, contribuie la clarificarea etiopatogeniei acestora.

În cursul proliferării maligne se modifică în mod evident procesele metabolice; de aceea este de aşteptat ca studiul biochimic al tumorilor să clarifice multe probleme legate de viaţa acestora.

Acesta este considerentul care ne-a determinat să procedăm la studiul caracteristicilor histochimice ale unor tumori cerebrale.

În ultimul timp am efectuat la clinica noastră, următoarele examinări pe material tumoral: examenul fosfatazei alcaline, și acide după metoda Gomori, reacția histochimică pentru detectarea glicogenului după metoda lui Mc. Manus Hotschkiss (a. n. reacția PAS) și reacția Feulgen pentru detectarea acidului desoxiribonucleic (ADN). În această lucrare nu descriem amănunțit metodele folosite, ci amintim doar atât, că în cursul reacției pentru detectarea glicogenului am efectuat totdeauna și digestia cu diastază.



În materialul bibliografic ce ne-a stat la dispoziție, am găsit puține date asupra caracteristicilor histochimice ale tumorilor (indiferent de localizare și caracter) dar am găsit mai ales date asupra studiului biochimic al acestora. Studiile se referă cu prioritate la problema tumorilor cerebrale. Pe de altă parte, datele și referințele găsite sînt destul de contradictorii, ceea ce dovedește că acest studiu este încă în faza de început.

Caracteristicile biochimice ale țesuturilor în creștere se deosebesc în multe privințe de cele ale celulelor în repaus. Totuși determinarea biochimică a malignității este azi încă imposibilă (G. Siebert — 6).

Mulți autori sînt de părere că activitatea fosfatazei crește în raport cu gradul malignității. E. V. Micheeva (5) a examinat mai multe tumori la copii, aparținînd tumorilor neuroectodermice (meduloblastoame și astrocitoame), și a confruntat rezultatele examenului biochimic al acestora cu evoluția bolii. Micheeva a ajuns la concluzia că în aceste cazuri se ivește un paralelism hotărît între gradul activității fermentative și gradul malignității: cu cît procesul se dezvoltă mai repede și cu cît evoluția bolii este mai malignă, cu atît activitatea fosfatazei acide este mai pronunțată. Astfel, în cazuri de meduloblastoame, activitatea fosfatazei a fost mai pronunțată decît în cazurile de astrocitoame, acestea din urmă fiind mult mai benigne decît meduloblastoamele. Activitatea fosfatazei la astrocitoame a fost mai scăzută decît activitatea acestei enzime în țesutul cerebral normal.

J. Greenstein (3) a găsit un înalt grad de activitate fosfatazică în hepatoame experimentale la șoareci și șobolani, însă în cazuri de carcinoame intestinale, fosfataza alcalină a dispărut aproape total (deși în mod normal, aici se constată o intensă activitate fosfatazică). În cazuri de carcinoame ale prostatei și în metastazele vertebrale și costale ale acestora, autorul a găsit o activitate fosfatazică acidă pronunțată. La fel și datele lui Domagk (2) confirmă existența unei activități fosfatazice mărite în carcinoame.

În ceea ce privește comportarea glicogenului, Butenandt și Dannenberg (1) sînt de părere că aceasta are un caracter foarte schimbător și depinde în mare măsură atît de localizarea și creșterea tumorilor cît și de gradul de alimentație al individului. De ex. la hepatom de șoarece în inanție, glicogenul dispare. După părerea acestor autori, tumoarea transplantată conține mult mai puțin glicogen decît tumoarea originală, probabil pentru că tumoarea originală mai conține și celule normale.

De asemenea ei mai susțin că transplantatele care cresc mai încet conțin mai mult glicogen, decît cele care cresc mai repede.

A. E. Goseva (4) a examinat cu ajutorul metodei histochemice conținutul în glicogen al astrocitoamelor, spongioblastoamelor multiforme, meduloblastoamelor și papiloamelor plexului chorioidean: în astrocitoame în vivo a lipsit aproape total glicogenul, iar în culturi a găsit destul de mult glicogen. Țesutul tumoral al spongioblastomului multiform a fost bogat în glicogen. În general, părțile dense (adică părțile care conțin multe celule) au fost mai bogate în glicogen, decît cele cu o structură mai laxă, conținînd mai puține elemente celulare. Așadar tumorile cu o proliferare celulară activă și bogate în celule au fost mai bogate și în glicogen. În cultura spongioblastului multiform Goseva a găsit mult glicogen. În schimb în meduloblastomul în vivo nu a găsit glicogen, dar în cultură a găsit mult. Goseva este de părere că glicogenul se înmulțește paralel cu gradul malignității. Lipsa glicogenului în meduloblastom, care este tumoarea cea mai malignă, s-ar explica prin faptul că această tumoare constă din celule absolut nediferențiate. Goseva crede că în țesutul tumoral, glicogenul poate să apară în două forme diferite: prima care poate fi denumită „glicogen de asimilare” ar fi legată de procesele de asimilare, de proliferarea celulară, de procesele de viață, iar cealaltă formă „glicogenul de disimilare”, care ar fi legată de procesele de dezintegrare, de moartea elementelor celulare.

În tumori, acidul dezoxiribonucleic (ADN) se găsește în general într-o cantitate mai mare, ceea ce se explică prin numărul ridicat al celulelor (Siebert, Butenandt—Dannenberg).



În lucrarea de față redăm rezultatele pe care le-am obținut în urma examenului histochemic a trei cazuri de glioblastom multiform.

I. Bolnavul N. V. în vîrstă de 57 ani, agricultor, a fost internat de doua ori în serviciul nostru, fiind supus de fiecare dată unei intervenții chirurgicale. Boala a debutat cu patru luni înainte primei internări (noiembrie 1957), prin schimbarea caracterului bolnavului, iar pe urmă, prin apariția unor tulburări în timpul mersului. Intellectul bolnavului a scăzut și au apărut tulburări de vorbire. Simptomele progresaază destul de repede (ataxie, afazie, tulburări psihice). Cu ocazia primei intervenții se îndepărtează o tumoare temporală chistică (Simó—Nagy—Róth), constatîndu-se că din punct de vedere histologic aceasta e un astrocitom cu semne de malignizare (Komjátszegi). Bolnavul părăsește clinica în stare mult ameliorată. După două luni, apar din nou dureri de cap, tulburări de vorbire și tulburări psihice, care progrediază iarăși destul de repede. La a doua internare (aprilie 1958) se observă o hemipareză dreaptă cu afazie pronunțată și cu tulburări psihice. La a doua intervenție (Komjátszegi—Nagy—Szabó) se constată o tumoare chistică, ce ocupă întregul lob temporal, invadînd în direcția occipitală și medială. Se face rezecție parțială.

Din punct de vedere histologic și histochemic s-a examinat o parte laterală a tumorii, adică o parte infiltrată a creierului și o bucată din mijlocul tumorii, iar pentru control rinichi de șobolani.

Microscopic se dovedește că e vorba de un glioblastom multiform. Fosfataza alcalină arată o activitate pronunțată numai în pereții vaselor sanguine, iar în jurul lor activitate ușoară. De asemenea, o activi-

GY. ROTH: REZULTATELE UNOR EXAMINĂRI HISTOCHIMICE IN CITEVA CAZURI
DE GLIOBLASTOM MULTIFORM



Figura Nr. 1.

Cazul I. (N. V.) Reacția Feulgen și supracolorare cu „lichtgrün”; în general, colorația nucleilor celulelor mari este mai slabă decât a nucleilor celulelor mici.

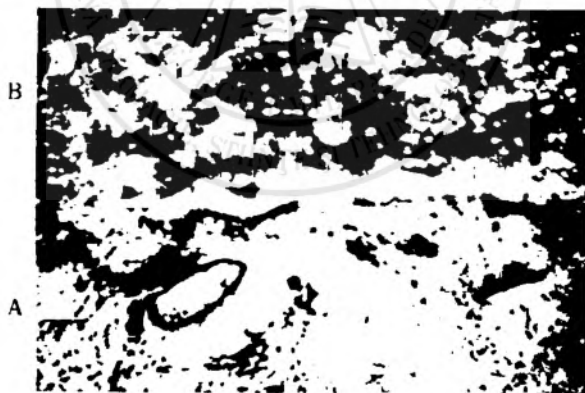


Figura Nr. 2.

Cazul I. (N. V.) Fosfataza alcalină după metoda lui Gömori-Danielli: în timp ce în partea net tumorală se observă activitate fosfatazică numai în pereții vasculari, în partea mai marginală, infiltrată, care este mai bogată în substanță intercelulară, se vede activitate fosfatazică pronunțată.

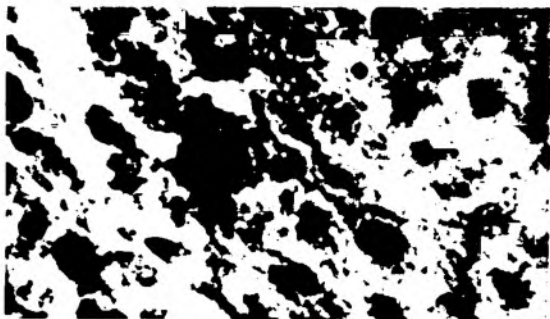


Figura Nr. 3. - Cazul III. (J. J.) Fosfatază acidă după metoda Gömori-Danielli: activitatea este mai pronunțată în celulele uriașe, decît în celelalte celule și se referă mai ales la elementele celulare.

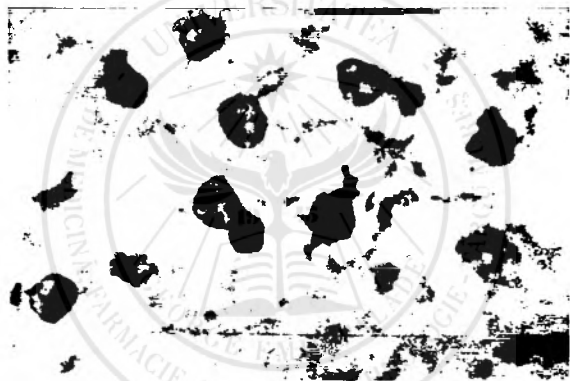


Figura Nr. 4. - Detectarea glicogenului cu metoda PAS, colorație nucleară cu bematoxilină. Cazul II. (A. I.) În partea marginală a tumorii se găsește glicogen în cantitate foarte mică. (Imersie.)

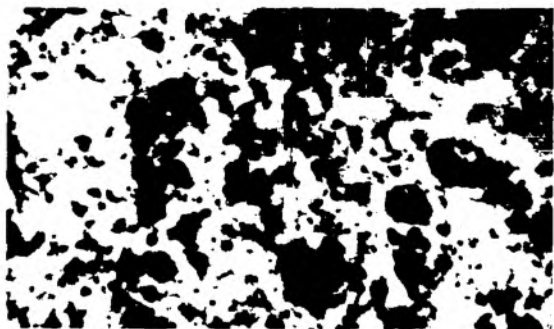


Figura Nr. 5. - Detectarea glicogenului cu metoda PAS în cazul nr. III. (J. J.), țesutul tumoral este foarte bogat în glicogen. (Imersie.)

tate mai accentuată se observă și din partea unor grupuri de celule mari, cu plasmă spumoasă (și, mai ales, din partea nucleolilor acestor celule). În partea infiltrată a substanței cerebrale, se constată o activitate mai pronunțată decât în mijlocul tumorii, aici activitatea manifestându-se mai mult în substanța intercelulară.

Activitatea fosfatazei acide este pronunțată din partea elementelor celulare tumorale și mai ales în părțile dense, bogate în elemente celulare. Celulele mari, cu plasmă spumoasă și celulele mici, rotunde, arată o activitate mai intensă. În general, nucleii celulari sînt mai pozitivi decât plasma celulară. Activitatea substanței intercelulare este scăzută, iar în peretele vaselor activitatea lipsește. În partea infiltrată, adică în părțile marginale ale tumorii, se observă în contrast cu activitatea fosfatazei alcaline o activitate mai scăzută decât în partea centrală a tumorii, cu alte cuvinte pe măsură ce ne îndepărtăm de partea centrală a tumorii, în aceeași măsură scade activitatea fosfatazei acide. În unele părți se pot recunoaște și celule piramidale, care arată o activitate slabă.

Glicogen de abia se găsește în partea centrală a tumorii în formă de mici granulații între celule, sau uneori și în celule în cantitate foarte mică. În părțile infiltrate, adică marginale, ale tumorii cantitatea glicogenului este mărită și se plasează insular mai ales în părțile cu puține celule și cu substanța intercelulară bogată. După digestie cu diastază (digestia glicogenului), glicogen nu se găsește nicăieri, iar glicoprotezii și mucopolizaharizii care rezistă digestiei apar în formă de colorație difuză roză-roșiatică, intensitatea colorației fiind mai pronunțată în părțile marginale ale tumorii (partea infiltrată) decât în părțile pur tumorale. Plasma celulelor mari și părțile perivascularare prezintă o colorație mai accentuată. Substanța intercelulară arată o colorație difuză.

După cum se știe cu reacția Feulgen se colorează numai nucleii celulelor (deoarece ADN) în cantitate ce poate fi pusă în evidență se găsește numai în nucleii. În părțile marginale ale tumorii, reacția este ceva mai puternică decât în mijlocul tumorii. Cea mai puternică reacție există în nucleii celulelor mici, în timp ce nucleii celulelor mari arată o colorație cu mult mai slabă. În mijlocul tumorii reacția este mai scăzută. Ținînd seamă de desimea celulelor, e firesc ca în general acest teritoriu să se coloreze mai intens.

(Controlurile efectuate au dat rezultate corespunzătoare.)

2. Bolnavul A. I. în vîrstă de 26 ani, funcționar, a fost internat în serviciul gstru de patru ori, între august 1956 și aprilie 1958.

Primele semne ale bolii au apărut cu patru cinci luni înaintea primei intervenții chirurgicale (septembrie 1956), în urma unui traumatism cranian; bolnavul a fost lovit la cap cu o bucată de lemn, pierzîndu-și pentru cîteva minute conștiința. După aceasta s-a simțit bine timp de două săptămîni, cînd a apărut o criză jacksoniană în partea dreaptă. Crizele au devenit tot mai dese. La examen se constată stază papilară fără alte semne neurologice obiective. La operație (*Simó-Nagy-Szücs*) se îndepărtează o tumoră parietală stînga de mărimea unui măr, destul de circumscrisă. Efectuîndu-se examenul histologic, se găsește un astrocitom cu semne de malignizare (*Komjatszegi*). După această intervenție, bolnavul se simte bine timp de un an și jumătate, fiind fără simptome neurologice. Trecînd acest interval de timp, apar din nou crize epileptice, ceciale și mai tirziu slăbiciunea membrului superior drept. La examen se observă o

humianopsie omonima dreaptă, pareza membrului superior drept, astereognozie și agrafie. La a doua intervenție (aprilie 1958), adică după 19 luni de la prima intervenție, se constată recidiva tumorii, care infiltrază lobul parietal sting, are o culoare galbenă-brună, și o substanță în parte gelatinoasă. Tumoarea se îndepărtează numai parțial (*Nagy—Komjatszegi—Szabó*).

S-a prelucrat histologic și histochimic o parte din mijlocul tumorii, o parte marginală a ei (adică o parte infiltrată a țesutului cerebral) și o parte a durei mater infiltrată.

Examenul histologic confirmă existența unui glioblastom multiform.

Activitatea de fosfatază alcalină se găsește în mod pronunțat numai în perețele vaselor sanguine (tumoarea este bine vascularizată). Celulele tumorale manifestă o ușoară activitate din partea nucleilor și mai ales a membranei nucleare. Plasma celulelor și substanța intercelulară sînt negative. În părțile marginale ale tumorii activitate pronunțată se găsește numai în perețele vascular (această parte însă nu este atât de vascularizată), dar activitatea nucleilor celulari este mai pronunțată decît în mijlocul tumorii. Substanța intercelulară arată o activitate mai intensă aici, pe alocuri în insule, chiar pînă la o colorație neagră. În dura mater activitate pronunțată de fosfatază alcalină se vede numai în pereții vasculari, și într-o mică măsură în nucleii celulelor conjunctive. Nucleii celulelor tumorale manifestă o activitate accentuată.

Metoda de punere în evidență a fosfatazei acide nu a fost satisfăcătoare și de aceea nici interpretarea nu a fost posibilă. În unele locuri se vede că în mijlocul tumorii activitatea fosfatazei acide este mărită, în părțile marginale (infiltrate cu celule tumorale) activitatea este și mai pronunțată, dar numai în elementele celulare, substanța intercelulară fiind negativă. Elementele conjunctive ale durei mater sînt negative, iar elementele tumorale, care se lipsesc de dura mater, sînt intens pozitive.

În mijlocul tumorii nu se găsește deloc glicogen, în părțile marginale cantitatea de glicogen este foarte scăzută și se află pe teritoriile care par a fi cele mai normale (adică în părțile puțin infiltrate ale creierului). În fibrele de collagen ale durei mater, glicogenul se găsește în cantitate mare în formă de granulații mari, iar în partea tumorală a durei cantitatea de glicogen este foarte redusă. După digestia cu diastază se observă o colorație difuză, mai accentuată în pereții vaselor. Celulele tumorale se colorează foarte slab, în comparație cu substanța cerebrală normală. În părțile marginale ale tumorii colorația este de asemenea slabă, însă ceva mai intensă decît în mijlocul tumorii. În dura mater colorația este mai intensă, cu excepția părților conjunctive.

În nucleii celulari cantitatea de ADN este variabilă: în nucleii celulelor mari e scăzută, aceștia arătînd o colorație spumoasă, în nucleii celulelor mici cantitatea e mai mare, colorația fiind mai densă. Aceași situație este în părțile marginale ale tumorii și în elementele tumorale, care infiltrază dura. În celulele conjunctive cantitatea de ADN este mai mare decît în cele tumorale.

(Controalele au dat rezultate corespunzătoare.)

3 Bolnavul J. J. în vîrstă de 49 ani, miner, a fost internat în serviciul nostru în luna mai 1958. Primele simptome ale bolii au apărut cu două luni și jumătate înainte de a se electua intervenția chirurgicală (mai 1958) prin crize epileptice. La examenul

neurologic s-a constatat o hemipareză stângă, pareza de privire la stînga, tulburări psihice de tip frontal (lipsa de inițiativă, încetinire, dezinteres). Cu ocazia operației (*Komjatszegi—Nagy—Gáspár*) se îndepărtează parțial o tumoare frontală de culoare cenușie-brună, care prezintă infiltrații în toate direcțiile.

Am prelucrat o bucată de țesut cerebral normal, o bucată din marginea tumorii (țesut cerebral infiltrat) și o parte din mijlocul tumorii. Histologic tumoarea s-a dovedit a fi un glioblastom multiform.

Fosfatasa alcalină prezintă activitate pronunțată numai în pereții vasculari, însă și celulele tumorale prezintă o activitate ușor mărită față de țesutul normal. În partea tumorală se constată pe alocuri, insular, o activitate pronunțată, iar în părțile necrotice activitatea lipsește. În partea infiltrată activitatea este similară cu aceea din mijlocul tumorii. Activitatea fosfatazei alcaline se vede mai ales în nucleii celulari, care se colorează în negru. În insulele mai active se observă activitate și în plasma celulară. În partea normală a creierului examinat se constată o activitate enzimatică redusă arătînd o cantitate aproape normală și fiind mai puțin pozitivă ca în țesuturile tumorale.

Fosfatasa acidă prezintă activitate pronunțată atît în nucleii celulari cît și în plasma celulară. Cu cît înaintăm spre teritoriile necrotizate activitatea fosfatazei scade treptat, ajungînd în acestea la o completă dispariție. În unele locuri, unde celulele tumorale se situează în forma de rozete, celulele din jurul cavității arată o activitate mai pronunțată. Uneori și aici tot insular activitatea devine și mai pronunțată. Activitatea celulelor uriașe pare să fie intensă. În partea infiltrată a creierului activitatea fosfatazei acide este aceeași ca și în mijlocul tumorii, iar activitatea teritoriului normal este mai mică decît în părțile patologice și corespunde cantității normale.

Activitatea se poate observa atît în substanța intercelulară cît și în celule și în unele prelungiri ale celulelor, dar aceasta nu e intensă.

În interiorul tumorii, activitatea de glicogen este mult mărită, în forme de granulații mici și mari, situîndu-se atît între celulele tumorale, cît și intracelular. În partea infiltrată cantitatea de glicogen este mai mică decît în mijlocul tumorii, avînd totuși o valoare destul de mare. Aici, glicogenul se plasează dispersat sub forme de mici granulații, în toată secțiunea, în substanța intercelulară, iar uneori se găsește și în pereții vasculari. În țesutul aparent normal (edematos) cantitatea de glicogen este foarte mică atît în substanța intercelulară, cît și pe alocuri în plasma celulelor piramidale. După digestia cu diastază, granulații de glicogen nu se mai găsesc nicăieri, iar colorația difuză roșiatică, indicînd prezența unor glicoproteizi și mucopolizaharizi este aproape de aceeași intensitate în toate locurile (poate puțin mai intensă în părțile tumorale).

Reacția Feulgen este mai pronunțată în părțile tumorale și mai ales în nucleii celulelor mici, rotunde. Evident, din cauza densității celulare, cantitatea de ADN este mult mărită în partea tumorală.



Pe baza acestor trei cazuri ar fi prematur și chiar imposibil de a trage concluzii ferme deși am găsit unele caracteristici comune, ca de

pildă activitatea mărită a fosfatazei acide în părțile tumorale (și în măsură mai mică a fosfatazei alcaline). În primele două cazuri, în părțile infiltrate ale creierului, activitatea fosfatazei alcaline a fost mai intensă decât în părțile mai dense ale tumorii. În ceea ce privește cantitatea de ADN, aceasta a fost crescută în toate cazurile noastre, luând în considerare mai ales totalitatea celulelor. Glicogenul, a prezentat o cantitate scăzută în primele două cazuri în mijlocul tumorii (practic glicogenul a lipsit aici), iar în al treilea caz, cantitatea de glicogen a fost mărită. Poate că în acest caz e vorba despre așa-numitul „glicogen de disimilație“. Din punct de vedere clinic aceasta a fost probabil cea mai malignă tumoră, însă trebuie amintit că în timp ce primele două au fost tumori recidivante, cea de a treia a fost primară.

Activitatea enzimatică mărită indică în cazurile noastre existența unor procese metabolice intense, și a unei fosforilizări intense, care necesită o cantitate mai mare de enzime, adică o activitate enzimatică mărită. *Micheeva* crede că activitatea de fosfatază mărită ar fi factorul care ușurează degradarea compușilor fosforici, aceasta fiind premiza creșterii infiltrative.

Aceste ipoteze și rezultate sînt deocamdată fenomene și criterii izolate. Sarcina noastră este să studiem în continuare pe un material mai amplu aceste fenomene histochemice, formulînd pe baza lor concluzii unitare.

Sosit la redacție: 23 septembrie 1958.

Bibliografie

1. A. BUTENANDT, H. DANNENBERG. Die Biochemie der Geschwülsten. Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Vol. VI, partea III. Springer Verlag Berlin—Göttingen — Heidelberg 1956. Pag. 157.;
2. G. DOMAGK: Die experimentelle Geschwülstforschung. VI. Cytologie und Cytochemie der bösartigen Tumoren. Handbuch der Allgemeinen Pathologie etc. vezi mai sus.;
3. J. P. GREENSTEIN: Biochemistry of Cancer. Academic Press Inc. New York 1954. Pag. 394—405.;
4. A. E. GOSEVA: K voprosu o soderzhanii glicoghena v opucholiah neuroektodermalnoi prirodi. Voprosi Neurochirurgii 1951, Nr. 5.;
5. E. V. MICHEEVA: Fosfataza opucholei mozga u detei. Voprosi Neurochirurgii 1951, Nr. 5.;
6. G. SIEBERT: Biochemie der normalen und der malignen Zellen. Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung—Zweites Freiburger Symposium. Springer Verlag Berlin Göttingen—Heidelberg — 1954.

РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ОБСЛЕДОВАНИЙ В НЕСКОЛЬКИХ СЛУЧАЯХ МНОГООБРАЗНОГО ГЛИОБЛАСТОМА

Г. Пот

Автор излагает результаты, полученные при гистохимическом обследовании (кислотный и щелочный фосфатаза, гликоген и дезоксирибонуклеиновая кислота) в 3 случаях многообразного глиобластома. С этой точки зрения были исследованы как центральная, так и периферическая часть опухоли, а также, по мере возможности, и здоровая часть нормальной мозговой ткани вокруг опухоли. Во всех 3 случаях активность кислотной фосфатазы была увеличенной в центре опухоли, а в двух случаях

— активність щелочної фосфатази була збільшеною на периферії опухолі. В 2 випадках глікоген відсутствовав в центрі опухолі. Кількість ADN було збільшеною во всіх випадках во всіх клітках.

RESULTATS DE CERTAINS EXAMENS HISTOCHIMIQUES DANS QUELQUES CAS DE GLIO-BLASTOME

György Rotb

L'auteur présente les résultats obtenus à la suite de certains examens histo-chimiques (phosphatase acide et alcaline, glycogène et acide dés-oxi-ribo-nucléinique) dans trois cas de glio-blastome multiforme. Il a examiné, de ce point de vue, la partie moyenne et la partie marginale de la tumeur et dans certains cas, le tissu cérébral normal du voisinage de la tumeur. Dans les trois cas, l'activité de la phosphatase acide était accrue au milieu de la tumeur, tandis que l'activité de la phosphatase alcaline ne l'était que dans deux cas, dans la partie marginale de la tumeur. Le glycogène manquait au milieu de la tumeur dans deux cas. La quantité d'ADN était augmentée dans chaque cas et dans la totalité des cellules.
