



Det här verket har digitaliserats vid Göteborgs universitetsbibliotek och är fritt att använda. Alla tryckta texter är OCR-tolkade till maskinläsbar text. Det betyder att du kan söka och kopiera texten från dokumentet. Vissa äldre dokument med dåligt tryck kan vara svåra att OCR-tolka korrekt vilket medför att den OCR-tolkade texten kan innehålla fel och därför bör man visuellt jämföra med verkets bilder för att avgöra vad som är riktigt.

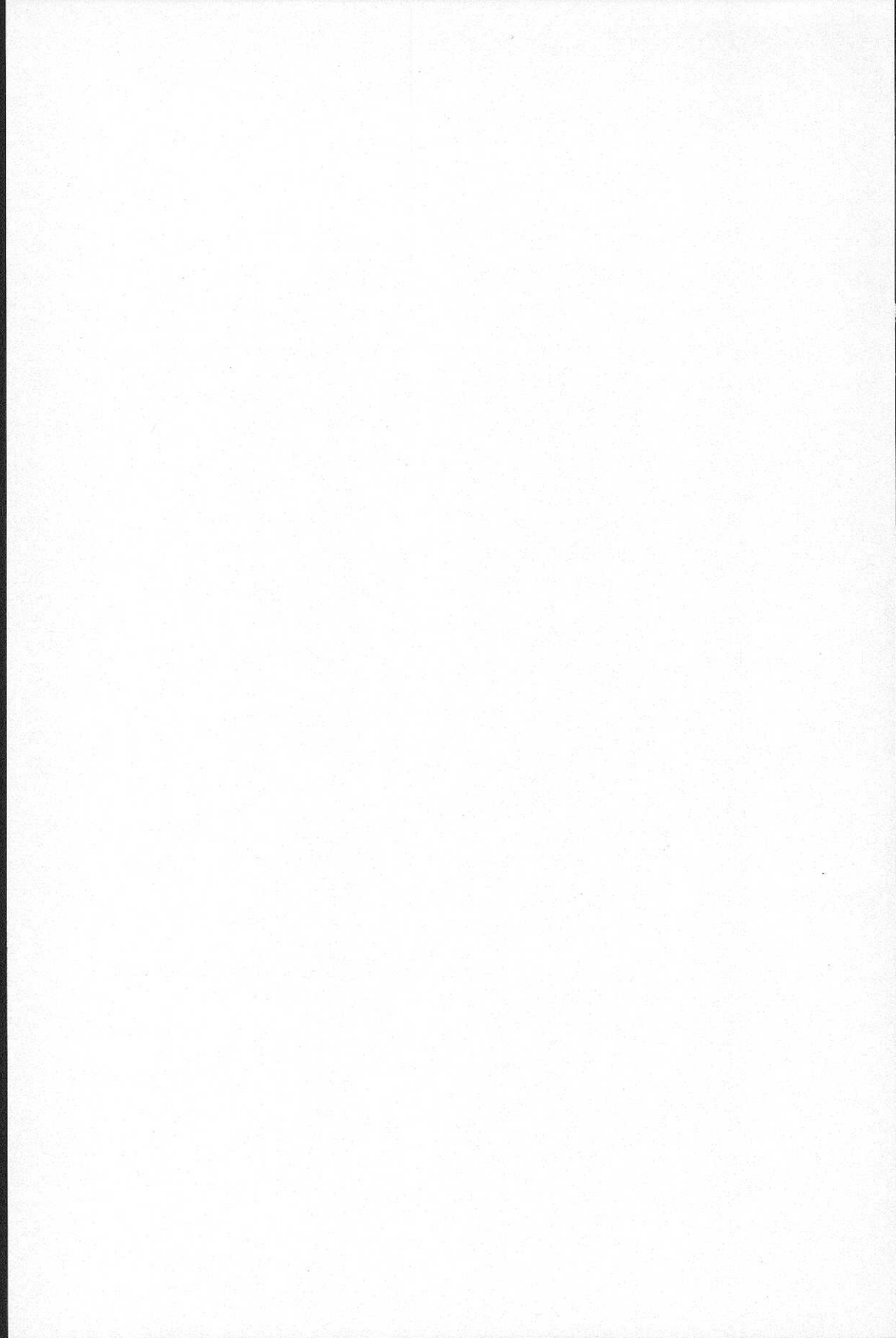
This work has been digitized at Gothenburg University Library and is free to use. All printed texts have been OCR-processed and converted to machine readable text. This means that you can search and copy text from the document. Some early printed books are hard to OCR-process correctly and the text may contain errors, so one should always visually compare it with the images to determine what is correct.



Experimentella  
studier av  
retinakulturer

---

Av  
Hans-Arne Hansson  
med. kand.



Från Neurobiologiska Institutionen och Neuropatologiska Laboratoriet,  
Patologiska Institutionen I, Göteborgs Universitet, Göteborg

# Experimentella studier av retinakulturer

## AKADEMISK AVHANDLING

som för vinnande av medicine doktorsgrad med  
vederbörligt tillstånd av Kanslern för  
Rikets Universitet offentligen försvaras  
i anatomiska institutionens föreläsningssal  
onsdagen den 7 december 1966 kl. 9 f. m.

---

Av  
Hans-Arne Hansson  
med. kand.



Från Neurobiologiska Institutionen och Neuropatologiska Laboratoriet,  
Patologiska Institutionen I, Göteborgs Universitet, Göteborg

# Experimentella studier av retinakulturer

---

Av  
Hans-Arne Hansson  
med. kand.

Till grund för denna sammanfattning ligger följande artiklar:

- I. Hansson, H.-A. and P. Sourander, Studies on cultures of mammalian retina. *Z. Zellforsch.* 62, 26—47, 1964
- II. Hansson, H.-A., The distribution of acetylcholine esterase and other hydrolytic enzymes in retinal cultures. *Acta physiol. Scand.* 70, Suppl. 288, 1966
- III. Hansson, H.-A., A tissue culture study of inherited dystrophy of the retina in mice. *Virchows Arch.path.Anat.* 340, 69—83, 1965
- IV. Hansson, H.-A., Selective effects of metabolic inhibitors on retinal cultures. *Exptl. Eye Res.* 5, 335—354, 1966
- V. Hansson, H.-A. and P. Sourander, *Toxoplasma gondii* in cell cultures from rat retina. *Virchows Arch.path.Anat.* 338, 224—236, 1965
- VI. Sourander, P., H.-A. Hansson, Y. Olsson and L. Svennerholm, Experimental studies on the pathogenesis of leucodystrophies.  
II. The effect of sphingolipids on various cell types in cultures from the nervous system. *Acta Neuropath.* 6, 231—242, 1966

Vid referens till dessa artiklar användes beteckningarna Arbete I—VI. Arbete I och V dokumenteras av filmer:

- Ia. Hansson, H.-A. and P. Sourander, Cultures of cells from rat retina. Göteborg 1964
- Va. Hansson, H.-A. and P. Sourander, *Toxoplasma gondii* in cell cultures from rat retina, Göteborg 1965.

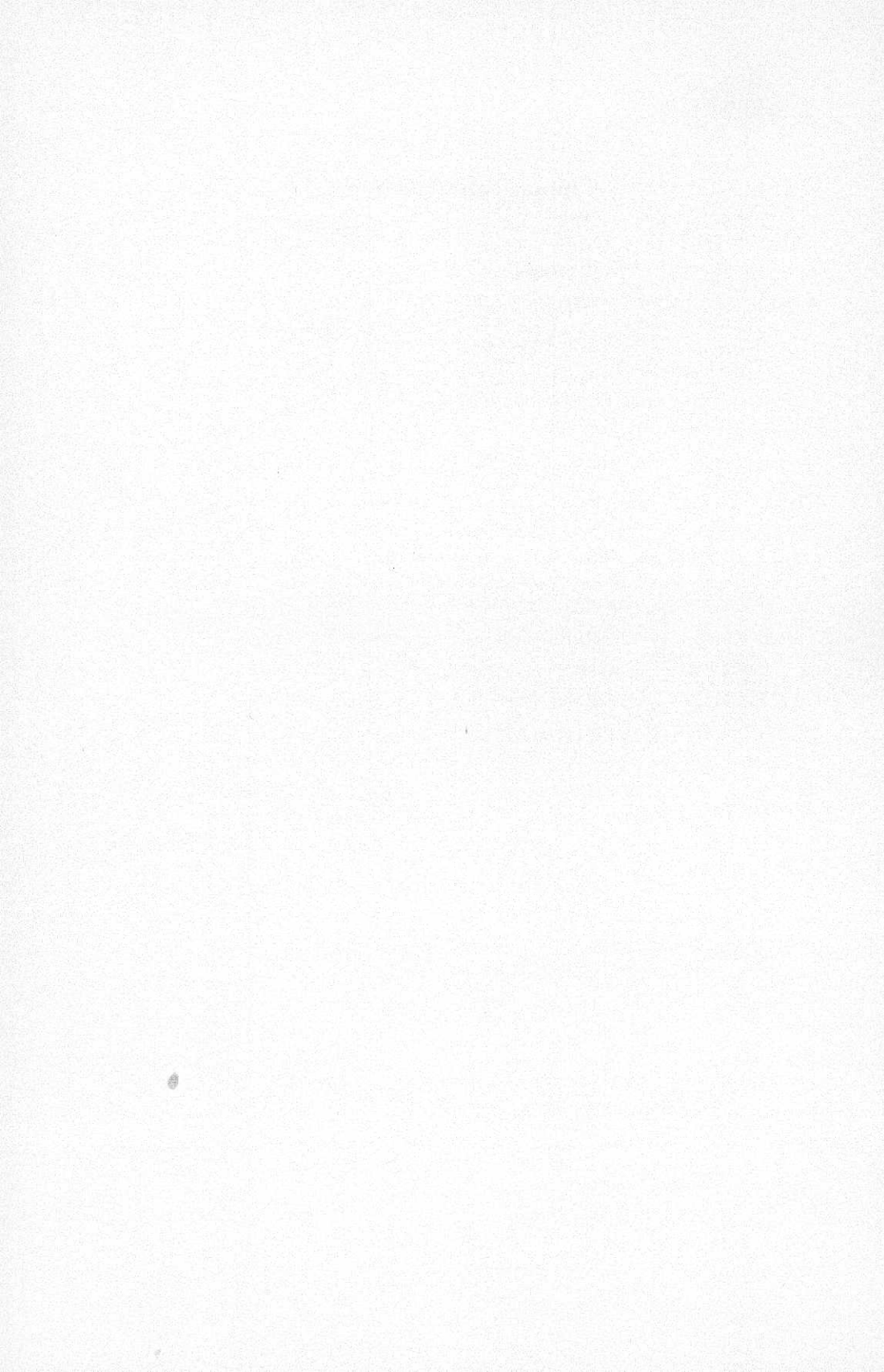
De båda 16 mm svart-vita filmerna med optiskt ljud finns deponerade på Societas Medica Scandinavica's filmarkiv i Göteborg.



## Innehållsförteckning

INLEDNING .....	5
MATERIAL OCH METODER .....	7
RESULTAT OCH KOMMENTARER .....	9
I. Studier av retinakulturer under normala betingelser .....	9
1. Explantatens utväxt .....	9
2. Identifiering av de odlade retinacellerna .....	9
3. Cytokemisk karakteristik .....	13
II. Studier av retinakulturer under patologiska betingelser .....	13
1. Genetiskt betingad och experimentellt inducerad retinadystrofi .....	13
A. Genetiskt betingad retinadystrofi .....	13
B. Experimentellt inducerad retinadystrofi .....	14
C. Jämförelse mellan genetiskt betingad och experimentellt inducerad retinadystrofi .....	16
2. Effekten av <i>Toxoplasma gondii</i> på retinakulturer .....	17
3. Effekten av sfingolipider på retinakulturer .....	18
SAMMANFATTANDE KOMMENTARER .....	20
LITTERATURANVISNINGAR .....	23





## INLEDNING

Vävnadsodlingstekniken erbjuder vid experimentella studier vissa fördelar, vilka inte kan erhållas vid försök in vivo. Olika kemiska och infektiösa ämnens effekter kan direkt studeras på enskilda celler av bestämd typ under hela försökets gång utan att man behöver taga hänsyn till de modifierande faktorer, som förekommer in vivo. Samma cell kan studeras först morfologiskt i faskontrastmikroskop under hög förstoring och därefter ljustmikroskopiskt efter behandling med histokemiska metoder. Cellen kan studeras i sin helhet utan föregående bäddning och snittning.

Vid infektionspatologiska och toxikologiska försök på centrala nervsystemet på levande djur kan ett flertal faktorer påverka det cellulära reaktionsmönstret. Detta kan sålunda modifieras av avgiftande effekter i extraneurala vävnader, av utbytet av substanser genom blodkärlsväggen och av cellulära försvarsmekanismer.

Förutsättningen för experimentella studier av nervvävnadskulturer på cellulär nivå är att ett väldefinierat utgångsmaterial användes och att den utnyttjade odlingstekniken ger reproducerbara resultat. Kulturerna bör vara sådana, att de uppbygges av väldefinierade celler, som i så stor utsträckning som möjligt överensstämmer med motsvarande celler in vivo.

De tidigare använda metoderna för odling av vävnad från centrala nervsystemet har flera nackdelar. De stora explantaten utvecklar ofta centrala nekrosor på grund av dålig nutrition (Bunge, Bunge and Peterson 1965) och är inte transparenta, vilket minskar de optiska möjligheterna att studera dem under kontrollerade betingelser. Trots centrifugal migration av cellerna förblir explantaten så tjocka, att endast enstaka neuroektodermala celler kan observeras (Murray 1965, Hild 1966) och först efter ungefär två veckor in vitro. Därtill har vid odlingen använts plasma-coagel eller kollagen, vilket dels ger tjockare explantat, dels försvårar farmakologiska, toxikologiska och histokemiska studier till följd av närvaron av äggviteämnen.

De här sammanfattade studierna bygger på användning av näthinnan, som utgör en del av centrala nervsystemet. Den består av ett tunt lager av nervvävnad anordnad i ett regelbundet mönster i flera skikt med väldefinierade neuroektodermala celler. Det fanns därför skäl att förvänta sig, att explantat av retinan skulle erbjuda bättre optiska betingelser än andra typer av nervvävnadskulturer. Ett mindre antal studier av vävnads-

odlingar och av organkulturer på näthinnan har publicerats (Lucas 1965). Det för denna studie mest relevanta arbetet om vävnadsodlingar är det av Tansley (1933), vilken lyckades odla råttretina i plasmakoagel upp till två veckor och även beskrev förekomsten av rosetter. Det finns inte någon utarbetad vävnadsodlingsteknik för näthinnan, som uppfyller de ovan ställda kraven på optimal odlingsmetod. De möjligheter, som retinakulturerna erbjuder för studium av olika sjukdomstillstånd in vitro, har tidigare utnyttjats endast i några få arbeten (Lucas 1965).

I de här presenterade undersökningarna över retinakulturer har:

1. en metod utarbetats för odling av näthinnan, som uppfyller de inledningsvis ställda kraven på nervvävnadskulturer,
2. de i retinakulturerna ingående cellerna identifierats med avseende på morfologiska och cytokemiska egenskaper,
3. möjligheterna undersökts att använda retinakulturerna som modellsystem för studium av syncellerna vid genetiskt betingad och experimentellt inducerad retinadystrofi,
4. möjligheterna undersökts att använda retinakulturerna som modellsystem vid experimentella infektioner med speciellt avseende på nervcellernas och neuroglia-cellernas cellulära reaktioner, för vilken undersökning användes den obligat intracellulära parasiten *Toxoplasma gondii*,
5. de neuroektodermala och de mesenkymala cellernas reaktionsmönster i retinakulturer undersökts i vad avser effekten av tillsats av cerebro-sider och sulfatid, isolerade från humant material.

## MATERIAL OCH METODER

Här redovisas kortfattat det använda materialet och de tillämpade metoderna. En detaljerad beskrivning finns i de olika delarbetena. De histokemiska metoderna för påvisande av enzymaktivitet redovisas i arbete II och IV.

*Försöksmaterial.* 1—2 dagar gamla rättungar av inavlad Sprague-Dawley stam användes. I ett mindre antal försök studerades retinavävnad från albino kaninungar av motsvarande ålder. I arbete III användes inavlade möss av C3H stammen med genetiskt betingad näthinne dystrofi.

*Vävnadsodlingsteknik.* Försöksdjurets öga enukleerades snabbt och öppnades i ekvatorialplanet, varefter näthinnan utdissekerades och explantat av lämplig storlek överfördes till odlingskammare. Explantatens storlek var vanligen cirka 1 mm<sup>3</sup> men varierades i vissa fall till att omfatta från enskilda celler till hel retina. Som odlingskammare användes dels Gey's kammare, som är speciellt lämplig för långtidsobservationer av enskilda celler under hög förstoring, dels Leighton rör, som möjliggör odling av ett större antal celler i ett tekniskt lätthanterligt system.

Under arbetets gång har den i arbete I beskrivna metoden modifierats. I arbete I, III och V explanterades retinabitarna i ett plasmakoagel på täckglaset i odlingskammarna. I de andra delarbetena II, IV och VI, explanterades bitar av näthinnan direkt på täckglaset. Denna modifikation var en förutsättning för de histokemiska och toxikologiska studierna och förändrade inte de neuroektodermala och mesenkymala cellernas utväxt, utveckling och överlevnad (Arbete IV).

*Näringslösning.* Näringslösningen utgjordes till största delen av en modifikation av Hank's saltlösning, som främst hade en högre glukoshalt, motsvarande 500—600 mg per 100 ml näringslösning. Dessutom ingick i det flytande odlingsmediet kalvserum och en tillsats av penicillin och streptomycin. I arbete I, III och V ingick även humant navelsträngsserum. Då ingen skillnad kunde iakttas mellan kulturer med och kulturer utan navelsträngsserum i näringslösningen, befanns denna tillsats onödig och uteslöts i arbetena II, IV och VI.

*Observationsteknik.* Vävnadsodlingarna observerades dagligen i ett inverterat mikroskop. Lämpliga explantat och celler fotograferades i faskontrastmikroskop, dels såsom stillbilder, dels genom filmning med "time



lapse" teknik. Intervallet mellan två exponeringar varierades mellan 1 sekund och 1 timme. Vid de flesta filmupptagningarna var exponeringsintervallet  $7\frac{1}{2}$  sekund. Filmupptagningarna gjordes i ett termostatreglerat rum vid  $37^{\circ}$  C. Därvid användes Zeiss mikro-cine-kamera med faskontrast-optik, vilket gav möjlighet till förstoring upp till 1250 gånger. Ljuskällan var en lågvoltslampa, som gav vitt ljus.

*Histologiska metoder.* För att identifiera och studera förekomsten av Nissl substans i nervcellerna färgades formalinfixerade kulturer med toluidinblått-erythrosin eller metylenblått. För påvisande av neurofibriller användes silverfärgning enligt Holmes. Fördelningen av glykolipider studerades efter färgning med perjodsyra-Schiff enligt McManus före och efter lipidextraktion med kloroform och metanol. (Arbete VI). De histokemiska metoderna för påvisande av enzymer med hydrolytisk aktivitet beskrivs närmare i arbete II och IV.

## RESULTAT OCH KOMMENTARER

### I. Studier av retinakulturer under normala betingelser

#### 1. *Explantatens utväxt*

De explanterade retinabitarna sedimenterades på ytan av täckglasen i odlingskamrarna. Inom loppet av några få timmar hade ett flertal mesenkymala celler växt ut och fäst de olika vävnadsbitarna vid täckglasen. Explantaten visade varken nekroser eller påtagliga degenerationstecken. Efter ett till två dygn in vitro bestod de mindre explantaten av två lager av celler. Det undre sammanhängande monolagret uppbyggdes av stora, tunna polygonala celler i ett enkelt cellskikt. På ytan av detta cellager fanns spridda bipolära och multipolära celler och cellgrupper, förenade med varandra genom ett invecklat system av utskott. De senare cellerna växte aldrig utanför monolagrets gränser. Därtill förekom ett varierande antal fritt rörliga granulerade celler.

Denna regelbundna strukturering av de tunna retinakulturerna medförde gynnsamma optiska betingelser för observationer av enskilda celler och cellförband i hög förstoring.

#### 2. *Identifiering av de odlade retinacellerna*

*Cytologisk karakteristik av utgångsmaterialet.* Histologiska undersökningar av näthinnan hos 1—2 dagar gamla råttungar, kaninungar och musungar har visat, att den består av två cellager, varav det yttre är tjockare och celltätare än det inre (Ramon y Cajal 1955, Sidman 1961, Rohen 1964). Nervcellerna i det inre kärnlagret är små och ofullständigt utvecklade i vad avser bland annat Nissl substansen (Brattgård 1952). Fotoreceptorcellerna har en omogen cellkärna, saknar de stavformade utskotten och visar mitoser (Detwiler 1932, Sidman 1961). Denna uppdelning av näthinnan i två cellager bryts ned i samband med explantationen. De skikt, som kunde påvisas i kulturerna, var av helt annat slag och bestod av ett basalt monolager och på ytan av detta bipolära och multipolära celler och cellgrupper.

*Multipolära nervceller.* På ytan av de stora, polygonala basala cellerna låg celler av växlande storlek med ett flertal långa, oftast rikligt förgrenade utskott. Kärnan var stor och sfärisk och hade i allmänhet en enda stor nukleol i den relativt homogena nukleoplasman. Kärnmembranet var myc-



ket tydligt och kunde visa inbuktningar, som varierade med tiden till form, storlek och lokalisation. Den fastäta cytoplasman innehöll en fingranulerad basofil substans, som inte kunde påvisas efter behandling med ribonukleas och sålunda utgjordes av ribonukleoproteiner. I perikaryon och i utskotten kunde fibriller påvisas med silverfärgning. Denna celltyp förekom speciellt rikligt i för hand plockade små explantat från det inre cellskiktet av näthinnan. Cellernas storlek och utskottens längd ökade under första tiden in vitro liksom färgbarheten för Nissl substansen. Histokemiska studier visade förekomst av acetylkolinesteras-aktivitet i perikaryon och i utskotten efter någon vecka in vitro (Arbete II). Analys av filmupptagningar av dessa celler visade rytmiska kontraktioner av perikaryon, ständigt pågående förändringar av utskottens antal, form och utbredning, kärnrotation och en viss begränsad migrationsförmåga (Arbete I och Ia). Sålunda fyller dessa celler i fråga om allmän morfologi, Nissl substans, neurofibriller och acetylkolinesteras-aktivitet kriterierna för nervceller.

*Bipolära nervceller.* I retinakulturerna förekom ytterligare en celltyp med Nissl substans och neurofibriller. Dessa celler, vilkas diameter uppgick till 7—9  $\mu$ , hade i regel polära utskott. Cellen utfylldes till större delen av en rund till njurformad kärna med homogen nukleoplasma. I explantat behandlade med akridonen M 223 visade cellerna en blå fluorescens av kärnstrukturer. Detsamma har tidigare påvisats in vivo för nervceller i det inre retinala kärncellslagret (Mayer and Bain 1956). Med stöd av detta förhållande och av cellernas ovan angivna morfologiska och tinktoriella karakteristika klassificerades dessa celler såsom motsvarande de bipolära nervcellerna in vivo.

De odlade nervcellerna uppfyller sålunda utom för dessa celler vedertagna morfologiska kriterier även flera histokemiska kriterier (Polyak 1941, Ramon y Cajal 1955, Hild 1959, Murray 1965).

Polyak (1941) har i detalj beskrivit ett flertal olika nervcellstyper i retina. Eftersom perikaryon och utskotten ständigt förändras i kulturerna förefaller det inte motiverat att försöka klassificera de odlade retinanervcellerna i mer än två grupper, multipolära nervceller och små bipolära nervceller (Arbete I).

*Neurogliaceller.* En sparsamt förekommande celltyp utgjordes av multipolära celler med en lätt till måttligt granulerad cytoplasma med en diameter om 15 till 20  $\mu$  (Arbete I). Kärnan var oval till njurformad. Nukleoplasman var oftast svår att säkert avgränsa från cytoplasman på grund av den ringa skillnaden i fastäthet och det ofta oskarpt framträdande kärnmembranet. Utskotten var oregelbundna till formen och visade membra-

nösa bildningar mellan utskotten, så kallad webbing, vid bifurkationerna. Cellerna saknade Nissl substans och med silver färgbara fibriller. Histo-kemiskt saknade de acetylkolinesteras-aktivitet (Arbete II). Rytmska kontraktioner av cellkroppen liksom bildning av membranösa veck från de fibrillära utskotten kunde påvisas med time lapse cinematografi (Arbete I och Ia). På grund av sin morfologi och sitt rörelsemönster klassificerades dessa celler som motsvarande neurogliaceller i den intakta näthinnan.

Neurogliacellernas identitet är mycket svårare att fastställa in vitro än nervcellernas.

De ovan beskrivna kriterierna för neurogliaceller avviker i viss mån från de, som angivits i andra odlingsstudier av vävnad från centrala nervsystemet (Pomerat och Costero 1955, Hild 1957, Varon, Raiborn, Seto, and Pomerat 1963, Nakai and Okamoto 1963, Murray 1965). Dessa skillnader kan bero på att olika utgångsmaterial använts och att cellernas miljö in vitro inte har varit lika. I vissa fall förefaller det emellertid som om celler av mesenkymalt ursprung även klassificerats såsom neurogliaceller (Kuhlenbeck and Wiener Kirber 1959, Nakai and Okamoto 1963). I fråga om retinakulturerna skiljer sig neurogliacellerna klart ifrån de mesenkymala cellerna. Neurogliacellernas aktivitetsmönster var in vitro karaktäristiskt, vilket påvisades genom filmning (Arbete Ia). Den metoden var den bästa för cellernas identifiering.

*Fotoreceptorceller.* De oftast förekommande cellerna var små och av uniform storlek. Deras utseende växlade något med tiden in vitro. Cellerna var under de första dagarna i kultur spöformade och hade en oval, ljus kärna med fina kromatinkorn. Cytoplasman reducerades successivt till ett tunt bräm omkring den sfäriska kärnan, vars kromatinkorn aggregerades till några få stora klumpar. Nissl substans eller neurofibriller kunde inte påvisas. I regel iakttogs efter några dygn in vitro två polära utskott, ett tunt förgrenat och ett tjockare oförgrenat. Cellerna visade rytmiska kontraktioner och degenererade efter kortvarig exponering för vitt ljus i motsats till de övriga retinacellerna (Arbete I och Ia). Cellerna bildade under första dygnet in vitro rosetter, vilkas lumen begränsades av en membranliknande struktur (Arbete I och IV). De jämntjocka, stavformade utskotten från dessa celler radierade in i rosetternas lumen. De proximala delarna av de stavformade utskotten visade histokemiskt hög aktivitet av ett flertal hydrolytiska enzymer, speciellt efter någon vecka in vitro (Arbete II och IV). Rosetterna upplöstes successivt efter ett tiotal dagar in vitro genom cellernas centrifugala migration. Dessa celler förekom speciellt rikligt i explantat plockade för hand ur näthinnans yttre delar (Arbete I). På

grund av sina morfologiska och histokemiska egenskaper, ljuskänslighet och tendens att bilda rosetter klassificerades dessa celler såsom motsvarande fotoreceptorcellerna *in vivo*.

I fråga om fotoreceptorcellerna saknas adekvat jämförelsematerial från andra studier *in vitro*. De överensstämmer med de av Katharine Tansley i grova drag beskrivna syncellerna (1933) i vävnadsodlingar av råttretina. De odlade cellerna visar därtill en för denna celltyp så karakteristisk morfologi och utveckling av kärna och utskott, att man kan anse deras identitet säkerställd. Fotoreceptorcellerna skadades irreversibelt av ljusmängder, som inte föreföll att påverka de andra retinacellerna (Arbete I och Ia). Den observationen på retinakulturer förefaller vara paradoxal med hänsyn till att syncellerna *in vivo* exponeras för ljus av hög intensitet under ganska lång tid utan funktionell störning. I ett flertal studier *in vivo* har det emellertid nyligen iakttagits, att långvarig ljusexponering kan ge selektiv destruktion av fotoreceptorcellerna (Noell 1965, Hansson and Sourander 1965).

*Mesenkymala celler.* I det basala monolagret, som bestod av tunna, stora, polygonala celler av ganska uniform typ, oftast med en enda excentriskt belägen cellkärna med flera nukleoler, iaktogs mitoser. Särskilt i äldre kulturer kunde amitotiska delningar observeras. Dessa celler bildade retikulintrådar, som kunde påvisas med Gomori's silverfärgningsmetod (Arbete III).

För att undersöka, om dessa celler härstammade från kärnväggarna, behandlades bitar av retina kortvarigt med trypsin (Arbete III). Under behandlingen lossnade de flesta neuroektodermala cellerna. Det återstod ett kärlnätverk, som efter explantation växte ut till ett monolager av samma typ som beskrivits ovan. För att ytterligare fastställa cellernas ursprung explanterades bitar av avaskulär näthinna från tidiga stadier av kycklingfoster. Härvid erhöles inte något basalt cellager i motsats till vad förhållandet var efter explantation av retina från den vaskulariserade pektenregionen av retina från äldre kycklingfoster. Dessa resultat stöder starkt uppfattningen, att det basala monolagret bestod av celler av mesenkymalt ursprung, väsentligen härstammade från kärnen i explanterade näthinor.

I retinakulturerna iaktogs ett växlande antal polygonala till sfäriska celler med granulerad cytoplasma. De uppstod ur celler i det basala monolagret och förekom inte i explantat från avaskulär kycklingfosternäthinna. De flesta cellerna visade uttalad pinocytos och fagocytos. Cellernas granula visade hög aktivitet av hydrolytiska enzymer, påvisade med histokemisk teknik (Arbete II). Av dessa granulerade celler uppfyllde flera kriterierna för mastceller (Olsson, Hansson och Sourander 1965).



De erhållna resultaten i fråga om de granulerade, fritt rörliga mesenky-mala cellerna överensstämmer med dem som angivits av Jablonski och Meyer (1938), vilka inte kunde påvisa fagocyter i explantat från avaskulär retina från unga kycklingfoster. De fagocyterande cellernas morfologiska och histokemiska egenskaper överensstämmer med dem som beskrivits för dessa celler in vitro (Jacoby 1965).

### 3. Cytokemisk karakteristik

Tidigare undersökningar in vivo av näthinnan har visat, att de olika celltyperna utvecklas snabbt både morfologiskt och histokemiskt under de första veckorna efter födelsen, speciellt under dagarna innan ögonlocken öppnas (Sidman 1961, Karczmer 1963, Rohen 1964).

Med histokemiska metoder påvisades i retinakulturerna acetylkolinesteras i nervcellerna efter någon vecka (Arbete II). I ett annat avseende var emellertid nervcellerna cellkemiskt omogna. Den histokemiskt påvisbara aktiviteten av pyrofosfatas och dinukleotidaser, det vill säga enzymer, som är lokaliserade till Golgi komplexet (Novikoff and Goldfischer 1961), framträdde endast som en diffus cytoplasmatisk färgning och inte som för mogna nervceller kännetecknande distinkta trådliska perinukleära precipitat (Arbete II). Dessa observationer överensstämmer med Hild's (1959) iakttagelser, att histologisk färgning av odlade nervceller inte avslöjar något välutvecklat Golgi komplex.

Den proximala delen av fotoreceptorcellernas utskott i rosetterna visade under de första dagarna in vitro en ökande aktivitet av flera hydrolytiska enzymer (Arbete II). I tidigare histokemiska undersökningar in vivo har i de inre segmenten av syncellerna konstaterats hög aktivitet av dessa enzymsystem (Eichner 1958, Esilä 1963, Rohen 1964).

## II. Studier av retinakulturer under patologiska betingelser

### 1. Genetiskt betingad och experimentellt inducerad retinadystrofi

#### A. Genetiskt betingad retinadystrofi

Med användning av retinakulturer som modellsystem studerades fotoreceptorcellernas reaktioner dels i kulturer av potentiellt dystrofisk näthinna, dels i normala näthinnekulturer efter behandling med metaboliska inhibitorer.

Det recessiva autosomala anlaget för nähinnedystrofi förekommer hos vissa djurslag, bland annat hos C3H möss. Det kan erhållas i homozygot

form genom inavel och medför in vivo en tidsmässigt mycket lagbunden degeneration av alla stavarna (Karli 1963, Noell 1965, Lucas 1965). Stavceller med pyknotiska kärnor kan iakttagas i de centrala delarna av näthinnan hos C3H musungar 10 till 11 dagar efter födelsen, och inom ytterligare 10 dagar är samtliga stavceller degenererade (Karli 1963, Noell 1965, Lucas 1965).

Retinaexplantat från ett dygn gamla C3H möss visade under de 9 till 10 första dygnen in vitro samma utväxtmönster och utveckling som kontrollkulturerna. Därefter degenererade selektivt inom 5 dagar samtliga stavceller i kulturer av potentiellt dystrofisk näthinna. Under denna tid kunde ingen påverkan på nervcellerna, neurogliacellerna eller de mesenkymala cellerna konstateras. Efter ytterligare någon vecka, då celltätheten i kulturerna starkt hade minskat på grund av stavcellsdegenerationen, iaktogs ett mindre antal hypertrofiska neurogliaceller. Trots den massiva stavcellsdestruktionen observerades endast en obetydlig ökning av antalet fritt rörliga, granulerade mesenkymala celler. Den selektiva stavcellsdegenerationen var inte påverkbar genom samtidig odling av normal retina eller annan vävnad i samma kammare. Stavarna visade redan före degenerationen tecken på cellskada i form av nedsatt migrationsförmåga och minskad rörlighet av cellorganeller. Rosettbildningarna var ofta ofullständiga, speciellt i explantat från 5 till 10 dagar gamla C3H möss.

Det är sedan lång tid känt, att vissa stammar av C3H möss har defekter i enzymssystem i bland annat levern, vilket förhållande skulle kunna betinga retinadystrofin (Noell 1965). Försöken med vävnadsodlingar av potentiellt dystrofisk näthinna stöder uppfattningen, att stavcellerna har en genetiskt betingad cellskada, som inte är påverkbar genom samtidig odling av normal retinavävnad eller annan vävnad från normala möss. Denna uppfattning överensstämmer med de slutsatser, som dragits i tidigare arbeten på organokulturer av näthinna från C3H möss (Sidman 1961, Lucas 1965). Stavdegenerationen började vid ungefär samma tidpunkt i vävnadsodlingarna av näthinna som in vivo men ledde till total upplösning av stavarna dubbelt så fort. Motsatta förhållandet har rapporterats i studier av organokulturer av potentiellt dystrofisk näthinna, där en utebliven eller ofullständig och fördröjd stavcellsdestruktion observerades (Sidman 1961, Noell 1965, Lucas 1965). Retardationen antogs bero på att de neuroektodermala cellerna utvecklades långsammare in vitro än in vivo. Förhåller det sig så, bör den i detta arbete använda vävnadsodlingsmetoden ge en bättre utveckling av stavcellerna än de tidigare använda organokulturmetoderna — detta baseras på att stavcellerna, såsom beskrivs närmare i arbete I och III, visade tecken på utveckling och degenererade fullständigt.

### B. Experimentellt inducerad retinadystrofi

Det är välkänt från kliniska och experimentella undersökningar, att vissa arsenik- och jodföreningar ibland kan ge selektiva skador på fotoreceptorcellerna i näthinnan hos människor och djur (Ashton 1957, Karli 1963, Noell 1965). Vävnadsodlingsstudier ger möjlighet att undersöka, om det rör sig om en direkt selektiv cytotoxisk effekt på cellerna eller ej. Med retinakulturer som modellsystem undersöktes därför under standardiserade betingelser de olika retinacellerna, speciellt fotoreceptorcellerna, med avseende på eventuella selektiva cytotoxiska effekter av metaboliska inhibitorer (Arbete IV).

Sulfhydrylinhibitorer, såsom kvicksilverföreningar, arsenikföreningar, arylerande, alkylerande och oxiderande ämnen, gav i mycket låga koncentrationer en selektiv destruktion av samtliga stavceller i retinaexplantat, som odlats under minst 8 till 10 dagar. Först en tiofaldig koncentrationsökning orsakade degeneration av samtliga celler. Ekvimolära koncentrationer av thiodonatorer och antioxidantia eller användning av plasma-koagel eller hög serumkoncentration i näringslösningen i de behandlade retinakulturerna förhindrade den selektiva stavcellsdegenerationen. Med känsliga semikvantitativa histokemiska metoder kunde inte någon säker skillnad i färgreaktionens intensitet, betingad av stavcellernas thiolgrupper, mellan kulturer, behandlade med sulfhydrylinhibitorer, och kontrollkulturer påvisas.

Dessa resultat tolkades så, att för stavarna essentiella sulfhydrylgrupper blockerades av inhibitorerna, vilka användes i ytterst låga koncentrationer, och resulterade i irreversibla cellskador. Det är möjligt, att dessutom även andra grupper, såsom karboxyler, blockerades, men det skedde i så fall endast i mindre omfattning, eftersom de olika typerna av mer eller mindre specifika sulfhydrylinhibitorer gav selektiv stavcellsdegeneration i samma omfattning i de behandlade retinakulturerna.

Ett undantag var den specifika thiolinhibitorn N-ethylmaleimid (Webb 1966), som inte framkallade någon selektiv stavcellsdestruktion utan orsakade degeneration av alla celltyper. Det finns ett flertal tänkbara orsaker därtill: blockeringen skedde långsamt, penetrationen av levande celler var dålig, eller de cellulära metaboliska systemen påverkades på ett annat sätt än då de övriga thiolinhibitorerna användes.

Natriumazid gav en selektiv stavcellsdegeneration i motsats till sådana ämnen som natrium cyanid, natrium fluorid och fluorättiksyra.

Stavcellernas selektiva känslighet för sulfhydrylinhibitorer ökade under de första 8 till 10 dagarna *in vitro* för att därefter inte märkbart för-



ändras. Noell (1958) och De Berardinis et al. (1964) har påvisat en liknande ökning av fotoreceptorcellernas känslighet in vivo för jodättiksyra och för natriumjodat med stigande ålder hos försöksdjur. Noell (1958) behandlade med jodättiksyra och erhöll selektiv degeneration av alla stavceller först hos 2 månader gamla kaniner. De Berardinis et al. (1964) kunde efter jodatbehandling påvisa motsvarande retinaskada hos några få veckor gamla kaninungar. Den med stigande ålder ökande selektiva känsligheten för sulfhydrylinhibitorer hos kaniner antogs bero på en mognad av fotoreceptorcellerna. I retinakulturerna iaktogs morfologiska och histokemiska tecken på utveckling av de neuroektodermala cellerna (Arbete I, II och III). Den parallellt förlöpande stegrade selektiva känsligheten för sulfhydrylblockerare talar för en samtidig biokemisk mognad.

De flesta använda thiolinhibitorerna ger inga retinotoxiska effekter in vivo. Tänkbara orsaker därtill är en ojämn fördelning av substanserna in vivo, metabolisk nedbrytning eller de testade ämnenas oförmåga att penetrera fotoreceptorcellerna i den intakta näthinnan. Stavarna och tapparna skyddas in vivo dels av omgivande neuroglia-celler, dels av blodretina-barriären (Ashton and Cunha-Vaz 1965) och barriärer mellan chorioidea och retina. I vävnadsodlingarna däremot exponeras stavcellerna liksom de övriga cellerna direkt för de i näringslösningen förekommande inhibitorerna i känd koncentration.

Det är inte möjligt att draga några slutsatser om vilket eller vilka metaboliska system som betingar de odlade stavcellernas selektiva känslighet för sulfhydrylinhibitorer. Det är av intresse att konstatera, att de i retinakulturer använda koncentrationerna av inhibitorer, som orsakade selektiv stavcellsdegeneration, var ytterst låga och utan påtaglig effekt i biokemiska försök, som kräver mycket högre koncentrationer (Webb 1966).

### *C. Jämförelse mellan genetiskt betingad och experimentellt inducerad retinadystrofi*

Stavcellerna degenererade både vid den genetiskt betingade och vid den experimentellt inducerade retinadystrofin, medan däremot ingen effekt kunde påvisas på de övriga neuroektodermala och mesenkymala cellerna. I båda fallen visade stavarna progredierande degenerationstecken såsom minskad motilitet, upphörande av cellkropparnas rytmiska kontraktioner och av kärnrotationen, vakuolisering och fragmentering av de stavformade utskotten och slutligen tecken på grav cellskada i form av kärnpyknos och cytolys. Även tidsmässigt var förloppet likartat.

Man har gjort ett flertal försök in vivo att korrelera biokemiska förändringar vid dessa två degenerationstillstånd för att finna en gemensam

kausalt metabolisk rubbning — dock utan entydiga resultat (Noell 1965, Lucas 1965, Webb 1966).

Det finns emellertid en väsentlig skillnad mellan dessa två former av selektiv stavcellsdegeneration. I samband med stavcellsdegenerationen i kulturer av potentiellt dystrofisk näthinna observerades endast en obetydlig ökning av antalet fritt rörliga, granulerade mesenkymala celler i motsats till det explosivt ökade antalet sådana celler vid experimentellt inducerad retinaskada in vitro. Denna skillnad är anmärkningsvärd med hänsyn till att till synes samma antal stavceller destruerades under samma tidsperiod i båda fallen.

## 2. Effekten av *Toxoplasma gondii* på retinakulturer

Det är välkänt, att retinochorioidit och encefalit präglar den kliniska bilden vid kongenital toxoplasmos och att oftalmopatin börjar i näthinnan. De obligat intracellulära *Toxoplasma* parasiterna har emellertid sällan kunnat påvisas intracellulärt i nervceller i histologiska preparat.

För att undersöka, i vad mån parasiterna kan penetrera de olika i retinakulturerna förekommande celltyperna omfattande nervceller, neuroglia-celler, fotoreceptorceller och mesenkymala celler, och multipliceras i dessa och hur de olika värdcellerna påverkas av det intracellulära infektionsförloppet, inokulerades kulturer med RH-stammen av *Toxoplasma gondii*. Parasitmultiplikation åtföljd av destruktion av värdcellen påvisades i multipolära och bipolära nervceller, neuroglia-celler, fotoreceptorceller och i celler av mesenkymalt ursprung. Protozoerna trängde in i nervcellerna på två olika sätt, dels direkt in i perikaryon, dels i undantagsfall in i en dendrit och inom denna vidare in i cellkroppen. Efter ett fåtal binära delningar av parasiterna visade de neuroektodermala cellerna degenerativa tecken, såsom minskad och omedelbart före den terminala cytolysen upphävd cellmotilitet. De vid cellsprängningen frisläppta parasiterna var aktivt rörliga och trängde snabbt in i närliggande celler. De flesta nervcellerna och neuroglia-cellerna visade en kraftig terminal cellansvällning (Arbete Va), som kunde mångdubbla cellvolymen. Parasiterna bildade perinukleära "cloner". De små nervcellerna och fotoreceptorcellerna destruerades av endast en till två parasiter. De neuroektodermala cellernas "cloner" upptog blott en mindre del av cellvolymen, medan de mera resistent mesenkymala cellerna däremot var helt fyllda med parasiter, innan de upplöstes. Dessa resultat kan delvis förklara det motsägande förhållandet, att trots att de kliniska symtomen hos barn domineras av skador i centrala nervsystemet, inkluderande näthinnan, endast i enstaka fall nervceller med intracellulära parasiter kan observeras.

Retinakulturerna har sålunda visat sig lämpliga som modellsystem för studier av det intracellulära infektionsförloppet hos nervceller, gliaceller och fotoreceptorceller och hos mesenkymala celler. Förändringarna i en viss bestämd cell kunde filmas med "time lapse" teknik i faskonstrastmikroskop (Arbete Va). Möjlighet till motsvarande undersökning av hela infektionsförloppet i exempelvis en nervcell in vivo saknas. Vill man studera detta, måste man bygga på observationer av ett flertal fixerade, snittade och färgade preparat från olika djur, som avlivats vid skilda tidpunkter.

### 3. Effekten av sfingolipider på retinakulturer

Bland genetiskt betingade sjukdomar med symtom huvudsakligen från nervsystemet har Krabbe's sjukdom (globoidcellsleukodystrofi) och metakromatisk leukodystrofi (sulfatidos) på senare år tilldragit sig stort intresse. Dessa sjukdomar, som företrädesvis drabbar barn, är kemiskt och histologiskt väl definierade. Vid Krabbe's sjukdom förekommer en utbredd demyelinisering av den vita substansen med en relativ ökning av de i hjärna normalt förekommande cerebrosiderna, som blir ansamlade i PAS-positiva celler, bland vilka ett stort antal flerkärniga så kallade globoidkroppar förekommer. Vid metakromatisk leukodystrofi, som också karakteriseras av en utbredd demyelinisering, har en kraftig ökning av i hjärnan normalt förekommande sulfatider påvisats liksom en motsvarande reduktion av mängden cerebrosider (Svennerholm 1964). De cellulära reaktionerna varierar med sjukdomens duration. Särskilt i adulta fall förekommer en stark proliferation av celler innehållande stora mängder av metakromatiskt färgbar granulär substans. Denna substans, som utlöses med lipidextraktion, ger den för cerebrosidsvavelsyra typiska bruna metakromasin efter färgning med kresylviolett-ättiksyra enligt v. Hirsch och Peiffer. Det är inte känt, om samma celltyp ackumulerar respektive lipider vid dessa två sjukdomar och om cellen är av neuroektodermalt eller mesenky-malt ursprung.

Retinakulturer erbjuder möjlighet att direkt studera effekten av cerebrosid- och sulfatid tillsats på neuroektodermala och mesenkymala celler och att undersöka vilka celler som med tiden in vitro kommer att ackumulera de tillsatta lipiderna.

Galakto- och glukocerebrosid sattes i form av emulsion eller suspension, 0,01 mg per ml näringslösning, till retinakulturer. Inom loppet av ett dygn uppträdde mono- och multinukleära celler, som färgades med perjodsyra-Schiff enligt McManus metod. Dessa fagocyterande celler uppkom ur stora, tunna, polygonala celler i det basala monolagret. Cellerna, som initialt endast hade enstaka PAS-positiva granula ökade snabbt i storlek och blev



inom loppet av 2 till 3 dagar fyllda med PAS-positivt granulärt material. Cellerna blev från att ha varit spolformade eller polygonala sfäriska. De lossnade vid den tidpunkten ofta från explantaten och flöt omkring i näringslösningen. De var svagt PAS-positiva efter lipidextraktion och omfärgning. I de neuroektodermala cellerna kunde inte något upptag av cerebrosiderna påvisas. Dessa resultat tolkades så, att de fagocyterande cellerna, som kom från monolagret, var av mesenkymalt ursprung och tog upp och lagrade cerebrosiderna. Eftersom deras morfologi och färgbarhet överensstämmer med motsvarande egenskaper hos de för Krabbe's sjukdom patognomona globoidcellerna och globoidkropparna, utgör resultaten ett starkt stöd för uppfattningen, att de två celltyperna härstammar ur mesenkymet.

Sulfatid, tillsatt som beskrivits ovan, togs inom några dygn upp av fagocyterande mesenkymala celler med ökande granulering. Kristalloida partiklar av sulfatiden kunde ses här och var, omgivna av ett bräm av fagocyterande celler. Cellernas volym ökade kraftigt samtidigt som de blev sfäriska. Den fagocyterade substansen uppträdde i form av kraftigt metakromatiskt bruna granula, som även var PAS-positiva. Metakromasin försvann efter lipidextraktion. Varken cellernas form och storlek eller färgbarheten av de brunt metakromatiska granula ändrades påvisbart under de tre veckor försöken pågick. Den iakttagelsen överensstämmer med biokemiska studier, vilka visat att sulfatiden omsätts långsamt in vivo (Davison and Gregson 1962).

Enstaka med kresylviolett-ättiksyra metakromatiskt färgade korn observerades i neurogliaceller och i ett fåtal nervceller.

Retinacellernas reaktion in vitro på cerebrosid och sulfatid visade, att det framför allt är mesenkymala celler som har förmåga att upptaga och lagra glykolipiderna vilka därmed transformeras till celler, som överensstämmer med globoidceller och globoidkroppar vid Krabbe's sjukdom och med granulerade celler innehållande sulfatid vid metakromatisk leukodystrofi. Galakto- och glukocerebrosiderna inducerade mono- och multinukleära celler medan sulfatiden gav mononukleär cellreaktion. Dessa två från kemisk synpunkt nära relaterade substanser framkallade alltså helt olika cellulära reaktioner.

## SAMMANFATTANDE KOMMENTARER

Den här beskrivna odlingstekniken för retinavävnad erbjuder fördelar framför tidigare använda metoder för odling av nervvävnad. Den väsentligaste är, att explantaten snabbt växer direkt på en glasyta till ett enhetligt mesenkymalt cellager, på vars yta isolerade celler och grupper av celler av neuroektodermalt ursprung kan observeras med högförstorande optik redan efter 1 till 2 dygn *in vitro*. Vid tidigare använda odlingsmetoder med tjocka explantat av vävnad från centrala nervsystemet i plasmakoagel eller på kollagen har ofta centrala nekroser erhållits. Dessa explantat erbjuder begränsade möjligheter att observera de olika celltyperna i hög förstoring, utom i explantatens periferi eller i mera centralt belägna, genom upplösning av plasmakoaglet uppkomna hålrum. Den här utarbetade metoden erbjuder fördelen, att både cellkroppen och de från samma cell utgående utskotten av olika dimensioner och inte endast delar därav kan observeras i detalj under lång tid. Förbindelserna mellan olika utskott maskeras i regel inte av omgivande celler. En annan viktig fördel är, att i lösning befintliga ämnen kommer i direkt kontakt med de odlade retinacellerna, vilket möjliggör ett detaljstudium av framför allt nervcellernas acetylkolinesteras-aktivitet med histokemisk teknik och även undersökningar av retinacellernas reaktioner på kemiska och infektiösa agentia.

De olika celltypernas morfologi, aktivitetsmönster och inbördes relationer har studerats. *Nervceller, neuroglia-celler och fotoreceptorceller har identifierats i kulturerna.* Dessa celler utvecklas *in vitro* både morfologiskt och kemiskt. För nervcellernas del yttrade den kemiska utvecklingen sig främst som påvisbar *acetylkolinesteras-aktivitet* efter en vecka *in vitro*. Acetylkolinesteras-aktivitet har inte tidigare på ett invändningsfritt sätt påvisats i nervvävnadskulturer från däggdjur.

De olika typerna av neuroektodermala och mesenkymala celler studerades i det etablerade modellsystemet under varierande experimentella betingelser.

Stavcellernas reaktioner studerades i kulturer av potentiellt dystrofisk näthinna från C3H möss med hereditär näthinnydystrofi. Vid denna sjukdom degenererar fotoreceptorcellerna *in vivo* selektivt mellan 11:e och 21:a dagen efter födelsen. *I vävnadsodlingar av potentiellt dystrofisk näthinna började stavcellerna degenerera vid ungefär samma tidpunkt in vitro som in vivo.* Destruktionen av cellerna förlöpte emellertid dubbelt så

snabbt i odlingarna. Den selektiva degenerationen av stavcellerna föregicks av morfologiskt påvisbara tecken på nedsatt cellulär aktivitet.

Experimentellt kunde en *selektiv stavcellsdegeneration induceras med hjälp av ytterst låga koncentrationer av sulfhydrylinhibitorer*. Med thiol-donatorer och antioxidantia i ekvimolära koncentrationer kunde stavcellsdestruktionen förebyggas.

Stavcellerna degenererade i de båda ovan relaterade tillstånden selektivt, medan nervcellerna och neuroglia-cellerna visade ringa eller inga tecken på påverkan. I fråga om de granulerade mesekymala cellerna rådde däremot det motsatta förhållandet. Vid genetiskt betingad retinadystrofi observerades in vitro i samband med den selektiva stavcellsdegenerationen endast en lätt ökning av antalet granulerade mesenkymala celler. Efter experimentellt inducerad stavcellsdestruktion visade däremot de fritt rörliga, granulerade cellerna en explosionsartad ökning.

De neuroektodermala cellernas reaktioner studerades i retinakulturer efter experimentell infektion med den intracellulärt multiplicerande, obligata parasiten *Toxoplasma gondii*. Parasiten trängde in i alla retinaceller, förökade sig och gav en terminal cytolys. De neuroektodermala cellerna visade tidigt degenerationstecken och destruerades i regel av ett relativt litet antal parasiter. De mesenkymala cellerna var mera motståndskraftiga och var helt fyllda av parasiter vid cytolysen. *Toxoplasma gondii* multipliceras alltså även i neuroektodermala celler, vilka snabbt destrueras, vilket kan förklara förhållandet, att parasiterna ytterst sällan in vivo kan observeras intracellulärt i dessa celltyper.

Efter tillsats av *galakto- och glukocerebrosid*, isolerade från humant material, till retinakulturer kunde efter något dygn stora mono- och multinukleära PAS-positiva celler av mesekymalt ursprung påvisas. Morfologiskt och histokemiskt motsvaras de av globoidceller och globoidkroppar, vilka kan iakttagas i humana fall av Krabbe's sjukdom. De neuroektodermala cellerna tog inte påvisbart upp någondera av de två cerebrosiderna.

Tillsats av *cerebrosidsvavelsyra* till retinakulturer gav väsentligen stora mononukleära celler, vilka var av mesekymalt ursprung och färgades brunt metakromatiskt med kresylviolett-ättiksyra enligt v. Hirsch och Peiffer. I neuroglia-cellerna och i några få nervceller påvisades enstaka metakromatiskt färgbara korn. Dessa resultat överensstämmer med den histologiska bilden vid humana fall av metakromatisk leukodystrofi.

De beskrivna tillämpningarna av den för näthinna utarbetade vävnadsodlingstekniken har berört samtliga i kulturerna förekommande celltyper och belyst deras morfologiska och kemiska reaktioner under varierande



experimentella betingelser. De erhållna resultaten har visat, att de odlade retinacellernas reaktioner kan relateras til den som beskrivits för motsvarande tillstånd in vivo. Vävnadsodlingar av näthinnan ger väl definierade neuroektodermala och mesenkymala celler och erbjuder alltså möjligheter till experimentella modellstudier.

## LITTERATURANVISNINGAR

- ASHTON, N.: *J. Path. Bact.* 74, 103, 1957.
- ASHTON, N. and J. C. CUNHA-VAZ: *Arch. Ophthal.* 73, 211, 1965.
- BRATTGÅRD, S.-O.: *Acta radiol. Suppl.* 96, 1952.
- BUNGE, R. P., M. B. BUNGE and E. R. PETERSON: *J. Cell. Biol.* 24, 163, 1965.
- DAVISON, A. N. and N. A. GREGSON: *Biochem. J.* 85, 558, 1962.
- DE BERARDINIS, E., L. VECCHIONE and O. TIERI: *Acta Ophthal.* 42, 713, 1964.
- DETWILER, S. R.: *J. comp. Neurol.* 55, 473, 1932.
- EICHNER, D.: *Z. Zellforsch.* 48, 137, 1958.
- ESILÄ, R.: *Acta Ophthal. Suppl.* 77, 1963.
- HANSSON, H.-A. and P. SOURANDER: I "The structure of the eye". Utg. av J. Rohen Vol. 2, s. 145. Stuttgart: F. K. Schattauer Verlag 1965.
- HILD, W.: *Z. Zellforsch.* 47, 127, 1957.
- I "Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen". Utg. av W. v. Möllendorff und W. Bargmann. Vol. 4, del 4, s. 1. Berlin: Springer Verlag 1959.
- *Z. Zellforsch.* 69, 155, 1966.
- JABLONSKI, W. and H. MEYER: *J. Anat.* 73, 130, 1938.
- JACOBY, F.: I "Cells and tissues in culture". Utg. av E. N. Willmer Vol. 2, s. 1. London: Academic Press 1965.
- KARCZMAR, A. G.: I „Handbuch der experimentellen Pharmakologie”. Utg. av A. Heffter und W. Heubner. Vol. 15, s. 129. Berlin: Springer Verlag 1963.
- KARLI, P.: *Adv. Ophthal.* 14, 51, 1963.
- KUHLENBECK, H. and M. WIENER KIRBER: *Conf. Neurol.* 19, 65, 1959.
- LUCAS, D. R.: I "Cells and tissues in culture". Utg. av E. N. Willmer. Vol. 2, s. 457. London Academic Press 1965.
- MAYER, S. E. and J. A. BAIN: *J. Pharmacol. exp. Ther.* 118, 1, 1956.
- MURRAY, M. R.: I „Cells and tissues in culture”. Utg. av E. N. Willmer. Vol. 2, s. 373. London: Academic Press 1965.
- NAKAI, J. and M. OKAMOTO: I "Morphology of neuroglia". Utg. av J. Nakai. s. 65. Tokyo: Igaku Shoin Ltd 1963.
- NOELL, W. K.: *Arch. Ophthal.* 60, 702, 1958.
- I "Biochemistry of the retina". Utg. av C. N. Graymore. s. 51. London: Academic Press 1965.
- OLSSON, Y., H.-A. HANSSON and P. SOURANDER: *Acta Neuropath.* 5, 307, 1965.
- POLYAK, S. L.: *The retina.* Chicago: Chicago Univ. Press 1941.
- POMERAT, C. M. and I. COSTERO: *Amer. J. Anat.* 99, 211, 1955.
- RAMON Y CAJAL, S.: *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* Madrid: Instituto Ramon y Cajal 1955.
- ROHEN, J. W.: I „Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen”. Utg. av W. v. Möllendorff und W. Bargmann. Vol. 3, del 4, s. 26. Berlin: Springer Verlag 1964.
- SIDMAN, R. L.: I "Diseases of the nervous system". Monograf Suppl. 22, 14, 1961.
- I "The structure of the eye". Utg. av G. K. Smelser. Vol. 1, s. 89. New York: Academic Press 1961.
- TANSLEY, K.: *Brit. J. Ophthal.* 17, 321, 1933.
- SVENNERHOLM, L.: I "Metabolism and physiological significance of lipids". Utg. av R. M. C. Dawson and D. N. Rodes. S. 553. London: J. Wiley & Sons Ltd. 1964.
- VARON, S. S., C. W. RAIBORN JR., T. SETO and C. M. POMERAT: *Z. Zellforsch.* 59, 35, 1963.
- WEBB, J. L.: *Enzyme and metabolic inhibitors.* Vols. 2 och 3. New York: Academic Press 1966.

Orstadius Boktryckeri Aktiebolag, Göteborg  
GÖTEBORG 1966

