

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg (Gustav-Ricker-Krankenhaus), Neuropathologische Abteilung (Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. ESSBACH)

## Histochemische und biochemische Untersuchungen beim Gargoylismus (Pfaundler-Hurler-Syndrom)

Von

**RALF SCHNABEL**

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1961)

### A. Einleitung

Die vermutlich auf einer genbedingten Enzymopathie beruhende generalisierte Thesauropathie bildet ein wesentliches Merkmal des Gargoylismus (Pfaundler-Hurler-Syndrom, Dysostosis multiplex, dysostotische Idiotie). Über die chemische Natur der gespeicherten Stoffe herrschten die verschiedensten Meinungen [vgl. die monographischen Darstellungen von LINDSAY u. Mitarb., HENDERSON u. Mitarb., HALLERVORDEN, SCHETTLER, DIEZEL (3), PETERS und HIENZ (2)]. Aus der Vielzahl von Substanzen, unter denen Glykogen, Mucopolysaccharide, heparinähnliche Polysaccharide, Muco- und Glykoproteide, Glykolipoproteide, Phosphatide, Cerebroside, Ganglioside und andere Glykolipide genannt wurden, schälten sich jedoch in jüngerer Zeit zwei bedeutsame Befundgruppen heraus, die namentlich auf die Forschungsergebnisse von KLENK (2) und BRANTE (2, 3, 4) zurückgehen. Es handelt sich einmal um die Gangliosidvermehrung der Hirngrisea und zum anderen um die in mehreren Organen nachgewiesene Stapelung von teils leicht löslichen Stoffen der Mucopolysaccharid-Klasse. Trotz der zahlreichen meist kasuistischen Mitteilungen befinden sich noch viele Fragen im Fluß. Sie betreffen die Zusammensetzung der Speichergemische in den verschiedenen Zell- und Organtypen, die von Fall zu Fall variierenden *qualitativen* Verhältnisse, die Mucopolysaccharid-Anreicherung in den *Organparenchymen*, das morphologische Substrat der Hypermucopolysaccharidurie, die Beziehungen zwischen den intra- und extracellulären Speichersubstanzen des Bindegewebes, die hypothetische Enzymopathie, die verschiedenen Erbmodi u. a. m. — Die vorliegende autoptische Beobachtung umfaßt biochemische und ausgedehnte histochemische Untersuchungen.

### B. Eigene Beobachtung

#### *I. Krankengeschichte (sehr gekürzt)<sup>1</sup>*

Normale Geburt am 21. 7. 55, seit dem 2. Lebenshalbjahr dick und schwerfällig, stark verzögerte motorische und geistige Entwicklung, Sitzen mit 9 Monaten, Laufen am Ende des 2. Lebensjahres, spricht mit 3 Jahren nur einzelne Wörter, Neigung zu Nasen-Racheninfekten. — Gut entwickelte normotone Muskulatur, keine Paresen, Reflexe normal, unvollständige Streckbarkeit der Gelenke, lautes Systolikum (PM an der Herzspitze), keine Aldersche

<sup>1</sup> Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. med. habil. K. NISSLER, Direktor der Kinderklinik der Medizinischen Akademie Magdeburg, für die freundliche Erlaubnis, die Krankengeschichte auswerten zu dürfen.

Granulationsanomalie, keine Hornhauttrübung (Spaltlampen-Untersuchung!). Röntgenologisch: Kleine Femurkopfepiphyphen, mehrere kalkdichte Wachstumslinien an den Metaphysen der langen Röhrenknochen. Zuckerhutförmige Mittel- und Endphalangen, lumbale Kyphose bei Verschmälerung und anghakenartiger Deformierung des 2. Lendenwirbelkörpers. Handwurzelkerne altersgerecht entwickelt. — Im November 1958 begonnene, etwa 12monatige Prednison-Behandlung (Anfangsdosis 40 mg/die, Erhaltungsdosis 7,5 mg/die) ohne sinnfällige Verbesserung der geistigen Leistungen oder Rückbildung der Hepato-Splenomegalie. Exitus am 27. 1. 60 an Bronchopneumonie. *Klinische Diagnose:* Pfaundler-Hurler-sche Erkrankung, Vitium cordis congenitum.

## II. Sektionsbefund (G 39/60 v. 28. 1. 60)

Leiche eines 4 $\frac{1}{2}$ -jährigen Knaben. Gewicht 23 kg; Alterssoll 17,4 kg. Pfaundler-Hurler-sche Erkrankung: Kleinwuchs (Körperlänge 96 cm; Alterssoll 106,7 cm)<sup>1</sup>, Makrodolichokephalie (Kopfumfang 51 cm), vorspringende Stirnhöcker, Wasserspeiergesicht, leichter Epicanthus, anomal modellierte Ohrmuscheln, Wulstlippen, Makroglossie, Rectusdiastase, walnußgroße Nabelhernie, persistierender Processus vaginalis peritonei beiderseits, Hydrocele testis rechts. Hypoplasie des 2. und 5. Lendenwirbels mit Kyphose, Hypoplasie der Femurkopfepiphyphen, Coxa valga beiderseits, Tatzenhände, Tatzenfüße. Hepatomegalie (1170 g; Soll 650 g), Splenomegalie (200 g; Soll 50 g), Nephromegalie (160 g; Soll 100 g), Kardiomegalie (190 g; Soll 78 g), keine Hyperplasie der Lymphknoten. Endokardfibroelastose des linken Vorhofes, noduläre Sklerose der Valvula mitralis. Keine Hornhauttrübung. Makrencephalie, sulzig-fibröse Verdickung der Leptomeninx cerebialis, namentlich über der Hirnkonvexität und den Frontalpolen, je ein linsgroßer verbreiteter perivaskulärer Adventitialraum („Cyste“) in der linken Balkenhälfte und subependymal am rechten Caudatuskopf. Cerebellarer Druckkonus 1. Grades. Adipositas (Gesicht, Stamm), Hypertrichose, hochgradige symmetrische Atrophie der Nebennierenrinde (Zustand nach langdauernder Prednison-Medikation).

Eitrige Bronchitis und Bronchiolitis mit eitrigen peribronchulären Herdpneumonien, rechts stärker als links. Multiple Randatelektasen, Emphysema acutum pulmonum. Katarrhale Urocystitis. Kräftig entwickelte Muskulatur.

## III. Biochemische Untersuchung

**1. Neuraminsäuregehalt der Großhirnrinde.** Die Bestimmung wurde im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln (Prof. Dr. Dr. h. c. E. KLENK)<sup>2</sup> durch Herrn Dr. U. LIEDTKE vorgenommen. Das Rindengrau enthält danach 0,13% (normal um 0,1%) Neuraminsäure bezogen auf Trockengewicht, was einer leichten Gangliosidvermehrung entspricht.

**2. Toluidinblau-Probe der Konservierungsflüssigkeit.** Je 2 cm<sup>3</sup> einer 0,1%igen wäßrigen Toluidinblaulösung wurden mit je 3 Tropfen der Konservierungsflüssigkeit (wäßriges Formol) des Gargoylismus-Falles, mehrerer Vergleichsfälle und einer ungebrauchten Formollösung beschickt. Nur bei dem Gargoylismus-Fall trat ein lebhafter metachromatischer Farbumschlag nach violett auf. Die chromotrope Substanz war in Formol bzw. Wasser leicht löslich, aber unlöslich in Äthanol. Im Hinblick auf die Ergebnisse von BRANTE (3, 4) und UZMAN möchten wir auf das Vorkommen makromolekularer Stoffe vom Typ saurer Mucopolysaccharide schließen, die während der langdauernden wäßrigen Fixierung aus den Organen extrahiert worden sind<sup>3</sup>. Diese einfache Probe, bei der man gegebenenfalls die Konzentrationen der Farbstoff- und Testlösungen variieren müßte, ist als Suchreaktion brauchbar [vgl. auch BRANTE (4)].

<sup>1</sup> Normalmaße nach STUART u. STEVENSON (bei FANCONI u. PRADER).

<sup>2</sup> Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. KLENK danke ich sehr für die Überlassung der Befunde.

<sup>3</sup> Inzwischen teilte mir auch Herr Dr. U. LIEDTKE (Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln) mit, daß aus 250 ml des für die Konservierung benutzten Formalins 1,07 g eines Rohmucopolysaccharids mit einem Hexosamingehalt von fast 8% gewonnen werden konnte.

#### IV. Histotopochemische und histomorphologische Untersuchung

**1. Technik.** Fixierung: Sämtliche Organe in Neutralformalin, außerdem Teile der Leber, Milz, Niere, Skelettmuskulatur, des Herzmuskels und Mesenteriallymphknotens in 96%igem Äthanol. Gefrier-, Gelatine-, Paraffin- und Celloidin-schnitte.

Die technischen Einzelheiten sind, soweit im Text nicht anders vermerkt, bei LIPP, DIEZEL (3) und PEARSE (2) ersichtlich. In Abänderung des von PEARSE (2) angegebenen Verfahrens zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes („methylene blue extinction“) von Gewebsstrukturen hat sich uns bei Gefrierschnitten folgende Methodik bewährt: 1. Schnitte 15 min lang in 2mal gewechseltes Aqua dest. bringen. 2. Färben mit gepufferten Methylenblaulösungen von verschiedenem pH-Wert, 10 min. 3. Spülen in Pufferlösungen von gleichem pH-Wert, 1 min. 4. Fixierung in 5%iger Ammoniummolybdat-Lösung, 10 min. 5. Kurz abspülen in Aqua dest. 6. Einschluß in Sorbitsyrup (Karion Merck). — Für die Ribonucleaseversuche benützten wir ein nach den Angaben von BRACHET (s. LIPP) aus lebensfrischen Rinderpancreata hergestelltes Präparat, dessen Aktivität an den Nissl-Schollen von motorischen Vorderhornzellen getestet wurde. — Die histotopochemische Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins wurde nach einem eigenen Verfahren durchgeführt, welches sich auf der Schultzschen Oxy-Cholesterin-Reaktion und der Digitoninfällung aufbaut. Vergleichende quantitative histochemische und histotopochemische Untersuchungen haben uns gezeigt, daß bei der Methode von FEIGIN ein großer Teil an freiem Cholesterin verlorengeht, weil die geforderte Stabilität des Cholesterin-Digitonids nach der Äther-Alkohol-Extraktion unter den histochemischen Arbeitsbedingungen nicht gewährleistet ist.

**2. Befunde.** *Nervensystem.* Generalisierte, innerhalb der einzelnen Regionen und Zellarten jedoch unterschiedliche Speicherung der Parenchymzellen des zentralen und peripheren

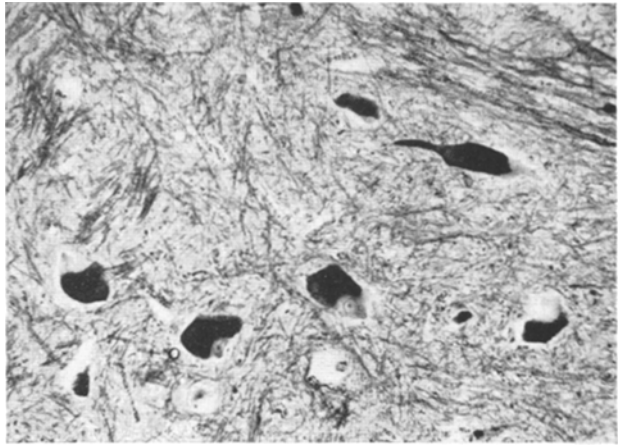


Abb. 1. *Lendenmark.* Intensive Speicherung in den motorischen Vorderhornzellen mit gelegentlichem Befall der proximalen Dendritenabschnitte (rechter oberer Bildquadrant). Gliazellen unbeteiligt. Formalin, Paraffinschnitt, Klüver-Barrera-Kernechtrot, Vergr. 100fach

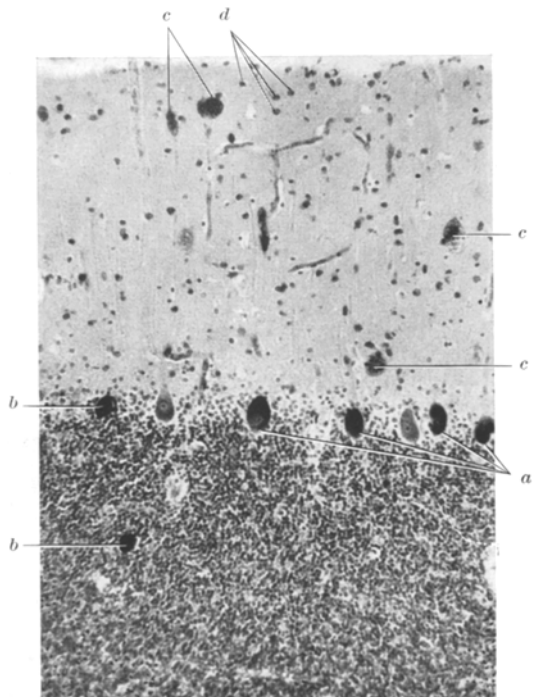


Abb. 2. *Kleinhirnrinde.* Selektive Thesauriopathie der Purkinje-Zellen (a), Golgischen Nervenzellen des Stratum granulosum (b), Purkinjezell-Dendriten (c) und Gliazellen des Stratum moleculare (d). Kleine Körnerzellen unbeteiligt. Formalin, Paraffinschnitt, Klüver-Barrera-Kernechtrot, Vergr. 100fach

Tabelle 1

Methoden *	Vor- behand- lung:	Gehirn		Leber		Milz Reticulo- histiocyten	Niere Tubuli (Mittelstücke)
		Nerven- zellen	Mark- scheiden	Kupffersche Sternzellen	Parenchym- zellen		
Feyrterische Einschlufßfärbung . . . . .	F, G	+++ M <sup>2</sup>	+++ M	+++ M	+/+++ M	+++ M	+++ M
Essigsäures Kresylviolett . . . . .	F, G	+++ meist violett	+++ <i>braun-violett</i>	+++ violett	+++ violett	+/+++ violett	+++ (violett, braunrot, braun)
Astrablau (Picroh) . . . . .	F, G	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Aldehydfuchsin ohne Voroxydation . . . . .	F, G	+++	(+)	+++	+++	+++	+++
Gepufferte Methylenblaufärbungen, relativer isoelektrischer Punkt . . . . .	F, G	pH 1,8—2,2	pH 1,2	pH 2,6—2,9	pH 1,8—2,2	pH (1,8), 2,2, (2,6)	pH unter 1,4
Jodat-Schiff-Reaktion . . . . .	F, G	∅	∅	∅	∅	+++	∅
Periodat-Schiff-Reaktion (PJS-R.) . . . . .	F, G	+++	+++	+++	+++ <sup>3</sup>	+++	+++
PJS-R. nach Acetylierung (DIEZEL) . . . . .	F, G	∅	∅	∅	∅ <sup>3</sup>	∅	∅
PJS-R. nach Acetylierung + KOH . . . . .	F, G	∅/+	(+)	+++	+++ <sup>3</sup>	+++	∅/(+)
PJS-R. nach Bromierung (wäfrig) . . . . .	F, G	+++	(+)	+++	+++ <sup>4</sup>	+++	+++
Bestsches Carmin . . . . .	A, cP	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Bestsches Carmin nach Speichelprobe . . . . .	A, cP	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Testis-Hyaluronidase . . . . .	F, G; F, P	+++	+++	∅/(+)	+++ <sup>5</sup>	+++	+++
Sudanschwarz B . . . . .	F, G	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Sudanschwarz B, rote „Metachromasie“ im polarisierten Licht . . . . .	F, G	∅	+++	∅	+++	+++	+++
Perameisensäure-Schiff-Reaktion . . . . .	F, G	∅	+++	∅	(+)	+++	+++
Perameisensäure-Schiff-Reaktion nach Bro- mierung . . . . .	F, G	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Nitblausulfat (CALN) . . . . .	F, G	+/+++ <i>blau-violett</i>	+++ blau	+++ (violett)	+++ blau	+++ <i>blau</i> (zart- rosa)	+++ dunkelblau- violett
Kupferphthalocyanin-Reaktion (CP-R.):	F, G	+/+++	+++	∅	+++	∅/(+)	(+)
Diezel, chloroformige Lösung . . . . .	F, G	∅	∅	∅	+++	+++	+++
Diezel, äthanolische Lösung . . . . .	F, P	+++	+++	∅	(+)	∅/(+)	+++
Klüver-Barrera . . . . .	F, G	+++	+++	∅	∅	+++	+++
Cholesterinreaktion (SCHULTZ) . . . . .	F, G	+++	+++ <sup>6</sup>	∅	∅	∅	∅
Cholesterinreaktion nach Digitonin . . . . .	F, G	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Cholesterinreaktion nach Digitonin + Äther/Alkoholextraktion . . . . .	F, G	∅	∅ <sup>7</sup>	∅	∅	∅	∅



Eine brillante Darstellung der Speichergranula erzielt man selbst am Paraffin- und Celloidinschnitt mit der CP-Reaktion nach KLÜVER-BARRERA [s. PEARSE (1, 2)] und der Markscheidenmethode nach HEIDENHAIN-WOELCKE, welche wohl in erster Linie Proteide bzw. Lipoprotein-Komplexe zur Darstellung bringen. Die schwach positive Tetrazonium-, Millon- und Xanthoproteinreaktion deuten auf aromatische Aminosäuren in der Proteinkomponente hin, während das Barrnett-Seligmansche Verfahren (Disulfid-, Sulfhydrylgruppen) nur eine angedeutete Farbentwicklung erkennen läßt. Das Speichermaterial ist isotrop. Auch zeigen die mit Sudanschwarz gefärbten Granula im polarisierten Licht nicht den von DIEZEL (3) erstmals beschriebenen Dichroismus nach Rot, der auf Glycerinphosphatide hinweisen kann. Allerdings sei hier zur Methode einschränkend gesagt, daß wir häufiger an isoliert liegenden Sudanschwarz-gefärbten Markfasern (z. B. Radiär- und Supraradiärgeflecht des normalen Cortex) diesen Farbwechsel im polarisierten Licht vermißt haben. Ver-

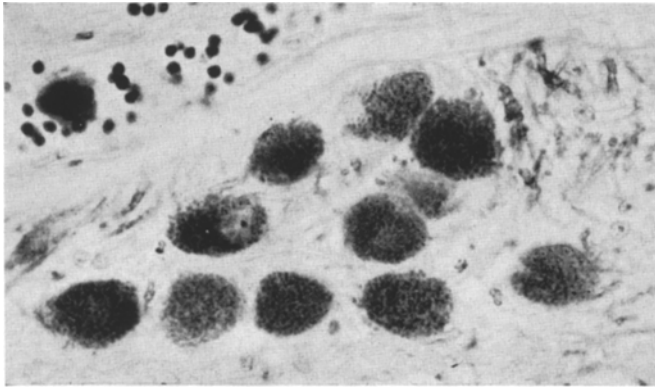


Abb. 3. *Lendenmark*. Ausschnitt aus dem Nucleus dorsalis (CLARKE). Intracytoplasmatische Speicherung in feingranulärer Form. Formalin, Paraffinschnitt, Heidenhain-Woelcke-Kernechtrot, Vergr. 400fach

mutlich sind hier physikalische Ursachen verantwortlich; denn das Fehlen der Glycerinphosphatid-Fraktion in den feinkalibrigen normalen Markscheiden besitzt wenig Wahrscheinlichkeit. Bei den Extraktionsversuchen (Tabelle 2) wird die Speichersubstanz durch Wasser, wäßriges Formol, kalte 1 n-Salzsäure, 0,1 n-Kalilauge, Aceton und Äther nicht oder nur wenig angegriffen. Dagegen vermögen Äthanol, Chloroform, Pyridin, Methanol-Chloroformgemisch und auch Eisessig sowie heiße 1 n-Salzsäure das Glykolipid aus dem Glykolipoprotein-Komplex abzutrennen. Allerdings gelingt dies selbst mit den heißen Prozeduren nicht bei allen Zellen gleichmäßig und vollständig, was zum Teil auf eine unterschiedlich feste Proteinverankerung zurückgeführt werden kann. Nach den Extraktionen bleibt die Proteinkomponente der Speichergranula in der Regel optisch nachweisbar. Bei der Kontrolle mit der PJS-Technik sind die Körnchen meist nicht, bei der Feyrterschen Einschlußmethode zart blau-grün orthochromatisch gefärbt. Natürlich besteht auch die Möglichkeit, daß durch die Fettextraktionsmittel und die heiße Salzsäureprozedur Protein- bzw. Lipoproteinteilchen gelöst werden. So lassen sich die Speichergranula am Paraffinschnitt nach dreistündiger Extraktion mit heißem Methanol-Chloroformgemisch mit der Heidenhain-Woelcke-Methode im Gegensatz zu den Markscheiden nicht mehr darstellen. — Die histochemischen Untersuchungen (Tabelle 1) und die Routinefärbungen einschließlich der großen Celloidinübersichtsschnitte haben für eine *Markscheidendystrophie* keinen Anhalt erbracht. (Auf die nach der wäßrigen Bromierung stark abfallende Perjodatreaktivität der Myelinhüllen sei hier nicht näher eingegangen.) Ausgenommen sind nur jene an die verbreiterten, perivaskulären Adventitialräume unmittelbar angrenzenden Markzonen, in denen ein Myelinscheiden- und Axonuntergang stattfindet. Im übrigen erhält man mit den Silberimprägnationen (BODIAN) eine normale Darstellung der Achsenzylinder. — In den perivaskulären Körnchenzellen und Gefäßwandhistiocyten des Marklagers herrschen nicht Glykolipide, sondern aus Triglyceriden, sauren Fettstoffen, freiem und verestertem Cholesterin bestehende, CP-negative Lipidgemische vor.

Tabelle 2. *Extraktionen an formolfixierten Gefrierschnitten*

Testfärbungen: PJS-Reaktion Thionin (FEYRTER) <sup>1</sup>		Gehirn		Leber		Milz Reticulo- histio- cyten	Niere Tubuli (Mittel- stücke)
		Nerven- zellen	Mark- scheiden	Kupffer- sche Stern- zellen	Par- enchym- zellen		
Aceton . . . . .	K <sup>2</sup>	Ø	±	Ø	Ø	Ø/±	±
	H	±/+	+	Ø	+	+	+/+ +
Äther . . . . .	K	Ø	±	Ø	Ø	Ø/±	±
	H	±	+	Ø	+	+	++
Äthanol abs. . . . .	K	+	++	±	++	±	+/+ +
	H	+/+ +	++	+	++	+/+ +	++
Chloroform . . . . .	K	+	++	±	+	+/+ +	+
	H	+/+ +	++	±	++	+/+ +	+/+ +
Pyridin . . . . .	K	+	+	±	++	+/+ +	++
	H	+/+ +	++	±	++	+/+ +	++
Methanol-Chloroform (3:1) . . . . .	K	+	++	±	++	+/+ +	++
	H	+/+ +	++	+	++	+/+ +	++
Äthanol, Aceton, Äther, Pyridin, Methanol- Chloroform (succe- dan), 20 Std . . . . .	H			+/+ +			
Eisessig . . . . .	K	+	+	±	++	±	+/+ +
	H	+/+ +	++	+	++	+	++
n-HCl . . . . .	K	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø/±	Ø
	H	+/+ +	±	<sup>3</sup>	<sup>3</sup>	Ø/±	<sup>3</sup>
Wasser . . . . .	H	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

<sup>1</sup> Ø ungelöst, ± wenig gelöst, + stärker gelöst, ++ vollständig gelöst.<sup>2</sup> K Kalte Extraktion, 24 Std, 4°, H heiße Extraktion, 6 Std, 60°.<sup>3</sup> Schnitte zerstört.

Die für den Gargoylismus charakteristischen „cystisch“ verbreiterten Adventitialräume der Markgefäße (Windungsmark, Balken, Hirnstamm) enthalten ein lockeres Geflecht feinsten Bindegewebsfasern. In den Fibrocyten, abgerundeten schaumzellartigen Histiocyten und in der Grundsubstanz herrschen saure Mucopolysaccharide und Glykoproteide<sup>1</sup> vor, die auch nach heißer Methanol-Chloroformextraktion eine positive Astrablaufärbung und Toluidinblau-Metachromasie geben. Leider stand uns hier nur formol- und kein äthanolfixiertes Material zur Verfügung. Da besonders die ungeformte Interzellulärschubstanz und viele Histiocyten optisch leer erscheinen und zudem bei den Fettfärbemethoden negativ sind, muß angenommen werden, daß sich ein Teil der leicht wasser- bzw. formollöslichen Stoffe (wahrscheinlich Mucopolysaccharide) dem Nachweis entzogen hat. Ähnliche Verhältnisse begegnen uns am Plexus chorioideus und an der sulzig-fibrös veränderten cerebralen Leptomeninx. Das Plexusstroma enthält kleinste umschriebene Herde mit erhöht metachromatisch anfärbbarer Interzellulärschubstanz und reichlichen, durchweg lipidfreien Schaumzellen (Abb. 4 und 5). In der Leptomeninx treten neben den noch nachweisbaren sauren Mucopolysaccharidstoffen, Glykoproteiden und Glykolipoprotein-Komplexen auch diffuse oder gruppierte mit Neutralfetten

<sup>1</sup> Eine zuverlässige histochemische Differenzierung zwischen Mucoproteiden und Glykoproteiden, die gemäß der Definition von K. MEYER durch ihren prozentualen Gehalt an Amino-hexosen unterschieden werden, ist nicht möglich [HALE, PEARSE (2)]. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung „Glykoprotein“ gleichbedeutend mit „Carbohydrat-Protein-Komplex“ gebraucht. Vergleiche auch den jüngst erschienenen Aufsatz von JEANLOZ zur Nomenklaturfrage der Mucopolysaccharide.

beladene Körnchenzellen auf. Die Schädigung des Fasciculus opticus (Abb. 6) kann den perivaskulären Fibrosen im Hirnmark an die Seite gestellt werden. Man trifft eine Wucherung der bindegewebigen Septen, geblähte Fibrocytenformen und Schaumzellen. Die Opticus-faserbündel sind auseinandergewichen und zeigen an den Kontaktflächen wiederum diskrete Entmarkungsvorgänge. — In den Schwannschen Zellen der markhaltigen Nervenfasern

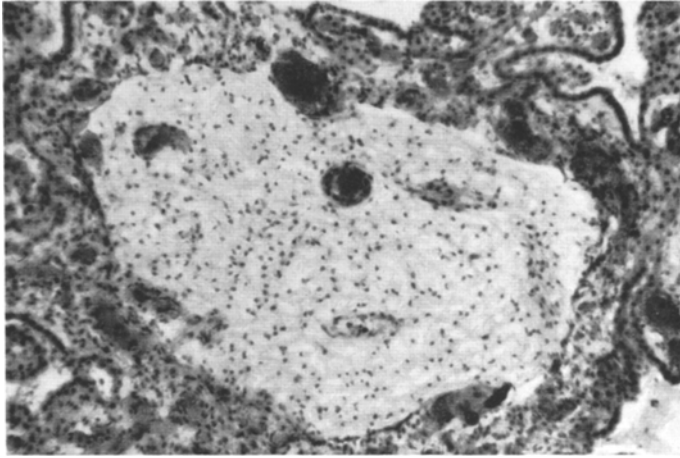


Abb. 4. *Plexus chorioideus*. Scharf begrenzter, faserarmer Stromaherd mit zahlreichen Schaumzellen und Übergangsformen zwischen Fibrocyten und Schaumzellen. Formalin, Celloidinschnitt, HE, Vergr. 100fach

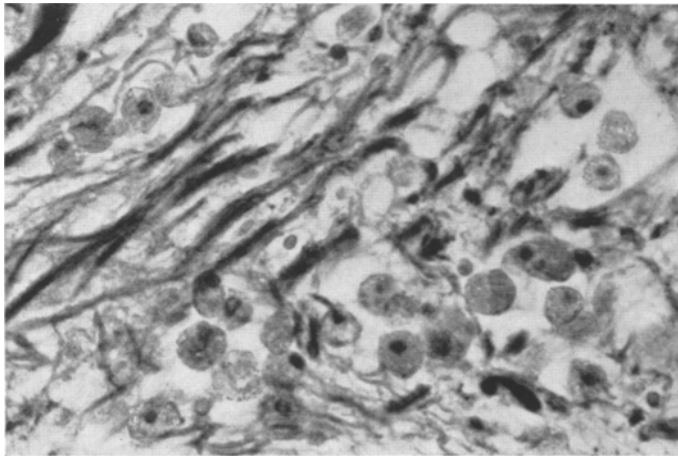


Abb. 5. *Plexus chorioideus*. Proliferation lipidfreier Schaumzellen und ödemartige Auflockerung des Plexusstromas. Formalin, Paraffinschnitt, Azan, Vergr. 400fach

(N. hypoglossus, Spinalwurzeln) sind die aus cerebrosidartigen sauren Glykolipiden (NOBACK, SCHNABEL u. SIR) aufgebauten Reichschen  $\pi$ -Granula in einer der Altersnorm entsprechenden Menge nachweisbar. *Leber*: Vermehrung des periportal Bindegewebes mit unvollständigem pseudolobulärem Umbau. In den Kupfferschen Sternzellen fast ausschließlich (Tabelle 1) ein stark metachromatisches, relativ schwer extrahierbares (Tabelle 2), gegen Testis-Hyaluronidase resistentes, Bial-negatives, saures Glykolipid, welches nach längerer Formalinkonservierung in negativ doppeltbrechenden Nadelbüscheln auskristallisierte. Gegen das Vorliegen von Fettsäuren sprechen hier die Lösungsverhältnisse. Das Parenchym (Tabelle 1) speichert



ebenfalls dieses Glykolipid. Außerdem in diffuser Verteilung mittel- bis grobtropfige Neutralfette und in den zentralen Läppchenzonen Glykogen (Plasma- und Kernglykogen). Kein sicherer Nachweis von Mucopolysacchariden im *Leberparenchym* (äthanolfixiertes Material). *Milz*: Die proliferierten Reticulohistiocyten (Schaumzellen) der roten Pulpa stapeln vorwiegend ein relativ leicht mit Fettlösungsmitteln extrahierbares (Tabelle 2) Bial-negatives,

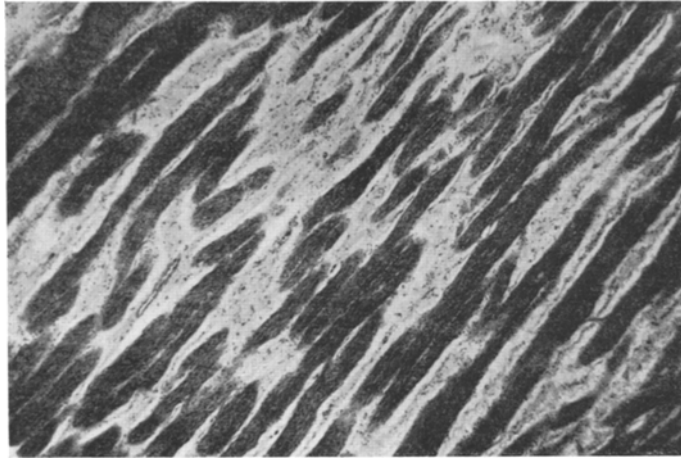


Abb. 6. *Fasciculus opticus*, Längsschnitt. Verbreiterung der bindegewebigen Septen mit Dissoziation der Opticusfaserbündel. Formalin, Paraffinschnitt, van Gieson, Vergr. 30fach

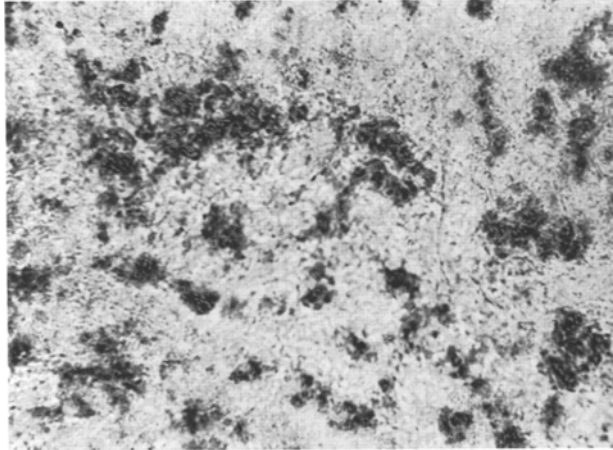


Abb. 7. *Milz*. Cholesterin-Ablagerung in den Reticulohistiocyten (Schaumzellen) der roten Pulpa. Formalin, Gefrierschnitt, Schultzsche Reaktion, Vergr. 100fach

saures Glykolipid (Tabelle 1). Daneben reichlich freies Cholesterin (Abb. 7) und Triglyceride. In den Schaumzellen und Sinusendothelien auch saure Mucopolysaccharide und PJS-positive Glykoproteide einwandfrei nachweisbar. *Niere*: Ausgeprägte Speicherungsnephrose mit elektivem Befall bestimmter Tubulusabschnitte. Henlesche Schleifen (dünne descendierende Teile), Schaltstücke und distale Sammelrohre besonders betroffen. Vorwiegende Ablagerung eines mit Fettlösungsmitteln leicht extrahierbaren (Tabelle 2), aber gegenüber Salzsäure und Kalilauge resistenten, Bial-negativen, stark Perjodat-reaktiven, sauren Glykolipids mit unterschiedlich fester Proteinbindung (Tabelle 1). Deutliche maximal bis  $1\text{ }\mu$  große Speichergranula. Ihr Methylenblau-Bindungsvermögen (isoelektrischer Punkt) in den dünnen Teilen

der Henleschen Schleifen bei  $pH$  unter 1,4, dann folgen die Schaltstücke ( $pH$  2,6—2,9) und Sammelrohre ( $pH$  3,2—4,1). Mucopolysaccharidspeicherung in den Tubuli und die von KOBAYASHI<sup>1</sup> in den „epithelial cells“ der Glomerula beschriebenen Granula auch am äthanolfixierten Material und unter strenger Vermeidung von Wasserkontakt nicht nachweisbar. — Einige intratubuläre PJS-positive, neutrale Glykoproteidzylinder. In den dünnen Teilen der Henleschen Schleifen spärliche PJS-negative Lipopigmente von fahl gelblicher Eigenfarbe, die mit essigsauerm Kresylviolett eine braune bis rotbraune Metachromasie geben.

*Epiphysenknorpel (Femur)*<sup>2</sup>: Histochemisch an der Grundsubstanz pathologische Veränderungen nicht faßbar. Starke unspezifische Anfärbung des „Chondroproteids“ bei der CP-Reaktion nach KLÜVER-BARRERA. Die etwas vergrößerten Knorpelzellen enthalten keine Glykolipide, sondern hauptsächlich Glykogen (relativ neutraler isoelektrischer Punkt, Diastase-Labilität, stark positive Chromsäure- und Perjodat-Schiff-Reaktion, reversible

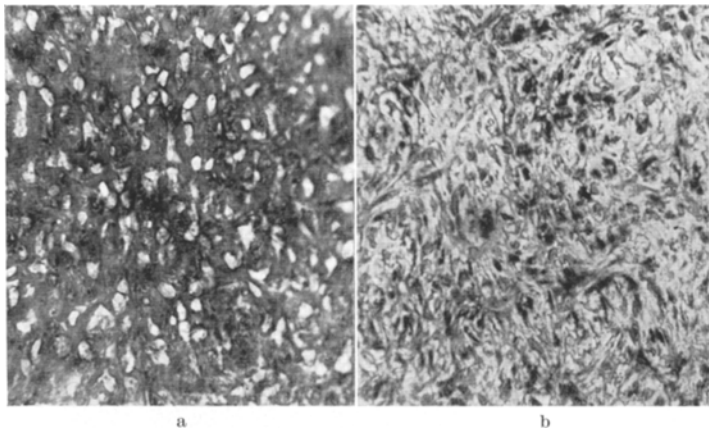


Abb. 8 a u. b. Noduläre Sklerose der *Valvula mitralis*. Unterschiedliches Verhalten der Schaumzellen und Intercellulärsubstanz (Grundsubstanz) nach Extraktion (24 Std, Zimmertemperatur) a mit Methanol/Chloroform oder b 1 n-Salzsäure. In den Zellen vorherrschende Ablagerung von Glykolipiden, in der Intercellulärsubstanz von Mucopolysacchariden und Glykoprotein-Komplexen.

Formalin, Gefrierschnitte, wäßrige PJS-Technik. Vergr. 100fach

Acetylierbarkeit, völlige Resistenz gegen Fettlösungsmittel). Nicht pathologisch sind die vereinzelt paranucleären Neutralfetttröpfchen (negative Cholesterin-, Perameisensäure-Schiff- und CP-Reaktion) und ein geringer Gehalt an Mucopolysacchariden. Die innerhalb der Knorpelgefäßkanäle reichlich anzutreffenden Schaumzellen speichern neben Neutralfetten hauptsächlich Glykoproteide und durch Testis-Hyaluronidase teilweise entfernbare saure Mucopolysaccharide. In den geblähten Bindegewebszellen des Perichondrium und der fibrösen Gelenkkapsel Glykolipide mit teils positiver Bial-Reaktion (Ganglioside). *Valvula mitralis*: Noduläre bis diffuse Sklerosierung des bindegewebigen Skelets. Diese Herde enthalten einerseits geblähte Fibrocyten und Histiocyten, andererseits eine faserreiche verdichtete Intercellulärsubstanz. In den Bindegewebszellen vorherrschend schwach saure, leicht metachromatisch anfärbbare, teils Bial-positive Glykolipid-Granula (gangliosidhaltig), die sich mit Methanol-Chloroform-Gemisch, nicht aber mit n-Salzsäure, Hyaluronidase oder Diastase extrahieren lassen. Vergesellschaftung mit Neutralfetten sowie freiem und verestertem Cholesterin, während die celluläre Stapelung von Mucopolysaccharidstoffen zurücktritt. In der Intercellulärsubstanz dagegen Gemische von teilweise Hyaluronidase-labilen sauren Mucopolysacchariden und stark PJS-positiven Glykoproteiden in verschiedenem Grade der Polymerisation und Proteinbindung. Das unterschiedliche Verhalten der cellulären und inter-

<sup>1</sup> Diese Alcianblue-positiven, nicht acetylierbaren (!) Granula werden trotz starker PJS-Reaktion vom Autor als saure Mucopolysaccharide bezeichnet.

<sup>2</sup> Die ausführliche Tabelle über die histochemischen Reaktionen der mesenchymalen Organe kann Interessenten zur Verfügung gestellt werden.

cellulären Speichersubstanzen kommt klar zum Ausdruck, wenn man die Wirkung der n-Salzsäure- und Methanol-Chloroform-Extraktion mit der PJS- oder kombinierten PJS-Astrablau-Färbung überprüft (Abb. 8). *Aorta*: Exzentrische Intimahyperplasie der Pars abdominalis. — Bindegewebige Zellformen der Intima und Media an der Speicherung beteiligt. Bei einigen histochemischen Verfahren, welche die Gewebe stärker angreifen, Muskelzellen nicht mit Sicherheit von den fibrocytären Elementen der Media unterscheidbar. Im Zellapparat, ähnlich wie bei der Atrioventricularklappe, ein in Methanol-Chloroform und Pyridin vollkommen lösliches, teils Bial-positives Glykolipid, in den Intercellularsubstanzen reichlich Hyaluronidase-labile saure Mucopolysaccharide. Außerdem einige Lipidflecken der Intima, deren Histiocyten Triglyceride, freies und verestertes Cholesterin enthalten. *Knochen* (*Femur*<sup>1</sup>): Schonende Entkalkung nach SCHAFFER (Paraffin- und Gelatineeinbettung). An den morphologisch unauffälligen Osteoblasten, Osteocyten und Osteoclasten weder mit der PJS-, Feyrterischen Einschluß- und Astrablau-Färbung noch mit der Ceresrot- und Sudanschwarz-Färbung eine Speicherung feststellbar. In den Osteocyten gelegentlich stark Perjodat-reaktive Granula (normale Glykogenspuren). *Skelettmuskulatur*: Am Speicherungsprozeß nicht beteiligt. Keine Faseratrophien. Spärlicher Glykogengehalt der Q-Streifen. *Herzmuskulatur*: unbeteiligt. Keine nennenswerte Fettinfiltration oder Glykogenose.

Eine Reihe weiterer Organe, bei denen wir keine detaillierte histochemische Untersuchung vorgenommen haben, ist ebenfalls in geringerem Grade an der Thesaurierung beteiligt. Die makroskopisch nicht vergrößerten Lymphknoten fallen durch eine mäßige, vor allem an den Intermediärsinus hervortretende Proliferation von Schaumzellen auf, welche ein mit Sudan-schwarz nicht tief-, sondern mehr blauschwarz angefärbtes Lipid enthalten. Dies trifft auch für einzelne Reticulohistiocyten der Tonsilla palatina und des Knochenmarks sowie für die spärlich auffindbaren intraalveolären Schaumzellnester der Lunge zu. Das lockere Bindegewebe des Hodeninterstitium enthält zahlreiche fettfreie Schaumzellen, deren Material sich offenbar bereits bei der Fixierung mit wäßrigem Formalin gelöst hat. Aus Mangel an geeignet fixiertem Material konnte nicht festgestellt werden, welche Substanzen in den stark vacuolisierten chromophoben Zellen der Adenohypophyse eingelagert sind. — In den Endstücken der Glandula parotis und submandibularis ungewöhnlich viele basophile Zymogenkörnchen.

## C. Besprechung

### I. Zur Topik des Speicherungsprozesses

An der generalisierten Thesauropathie unseres Falles sind die Derivate sämtlicher drei Keimblätter beteiligt. Die Stoffstapelung vollzieht sich vorwiegend intracytoplasmatisch, jedoch werden auch die Intercellularsubstanzen (Grundsubstanzen) der bindegewebigen Strukturen betroffen. Im Vordergrund stehen die Parenchymzellen der schon makroskopisch weit über die Norm hinaus vergrößerten Organe wie Gehirn, Leber, Milz und Nieren. Das reticulohistiocytäre System ist ferner in der Leber (v. Kupffersche Sternzellen) und in den Lymphknoten, aber nur gering in den Tonsillen und im Knochenmark befallen. Abgesehen von den interstitiellen Bindegewebslagern der Parenchymorgane haben wir eine intra- und extracelluläre Speicherung auch an der cerebralen Leptomeninx, den verbreiterten Adventitialräumen der intracerebralen Gefäße, dem Plexus chorioideus, dem Fasciculus opticus, der Aorta, dem Vorhofsendokard, der Valvula mitralis, dem Perichondrium, den Gelenkkapseln und dem Hodeninterstitium beobachtet. Die von uns nachgewiesene Opticusschädigung (Abb. 6) hat auch DELONG gesehen. Dagegen wird hier erstmalig, wie auch der zusammenfassenden Darstellung von PETERS zu entnehmen ist, eine Mitbeteiligung des Stromas der Plexus chorioidei (Abb. 4 und 5) näher beschrieben.

Das intracelluläre Speichermaterial lagert sich häufig (Nervenzellen, Nierentubuli, Bindegewebszellen) in feingranulärer Form ab (Abb. 3). DIEZEL (3) und KOBAYASHI haben die

<sup>1</sup> Die epi- und metaphysären Ossifikationsstörungen sind nicht berücksichtigt.

Vermutung geäußert, daß die Speichergranula geschwollene Mitochondrien darstellen könnten. Elektronenoptische Untersuchungen über diese, für die Thesauropathien grundsätzliche Frage, liegen meines Wissens noch nicht vor. Man wird jedoch zurückhaltend sein müssen, die Mitochondrien generell als Speicherorganellen der Zelle zu betrachten (MILLER). In diesem Zusammenhang sei betont, daß in unserem Falle wie auch in den Beobachtungen der Literatur die Nervenzellfortsätze (mit Ausnahme der Purkinjezell-Dendriten) jedwede Speicherung vermissen lassen, obwohl sie physiologischerweise ebenso wie die Perikarya reichlich Mitochondrien enthalten (HILD). Auch der kürzlich von ROSSIER u. Mitarb. bei der Glykogenose erhobene elektronenmikroskopische Leberbefund erlaubt keinen sicheren Schluß auf eine intramitochondriale Stapelung des Polysaccharids.

Wir wenden uns nun der Qualität der thesaurierten Substanzen zu. Die eingehende histochemische Analyse dieses Falles zeigt erneut, daß nicht ein einziger makromolekularer Stoff, sondern komplizierte Stoffgemische abgelagert werden, wie es auch von anderen Lipid-Speicherkrankheiten [DIEZEL (1, 3), PETERS] bekannt ist. Dabei prägen die organ- und zellspezifischen Stoffwechselbedingungen eine von Standort zu Standort wechselnde Zusammensetzung der Gemische (Tabelle 1 und 2).

## II. Zur Histochemie der gespeicherten Lipide

Saure, unterschiedlich an Protein gebundene *Glykolipide* wurden in den Nervenzellen, den Kupfferschen Sternzellen, dem Leberparenchym, der Milzpulpa, den Nierentubuli, der Aortenwand, der Atrioventricularklappe, dem Perichondrium und der Gelenkkapsel festgestellt. Den offenbar vom Prozeßalter und Prozeßtempo abhängigen Proteinträger erachten wir als relativ unspezifische Komponente des Speicherkomplexes, da er nach DIEZEL (3) auch bei den primären Lipidosen (Morbus Gaucher, Niemann-Pick, Tay-Sachs) vorkommt. Allerdings ist die Proteinbindung für die wechselvolle Löslichkeit und Extrahierbarkeit mit von Bedeutung. Ein „saures Glykolipid“ muß deshalb angenommen werden, weil einmal Affinität zu Sudanschwarz besteht und zum anderen das elektronegative und stark perjodatreaktive Verhalten einem fettlöslichen Substrat angehört (Tabelle 2). Ferner weisen die relative reversible Acetylierbarkeit [pyridinfreie Methodik nach DIEZEL (3)] und der negative Ausfall der Jodat-Schiff-, Perameisensäure-Schiff- und Bromierungs-Reaktion darauf hin, daß in erster Linie  $\alpha$ -Glykolgruppen den Angriffsort der Perjodsäure-Oxydation darstellen. Bei der üblichen Technik reagieren die Sphingomyeline praktisch PJS-negativ, sofern nicht die Acidität der Perjodsäure erhöht oder ihre Einwirkungszeit verlängert wird (WOLMAN). Die von DIEZEL (2) modifizierte Bial-Reaktion gestattet den histotopochemischen Nachweis der Neuraminsäure. Diese Polyoxyaminosäure stellt einen biologisch bedeutsamen Baustein der Ganglioside [KLENK (1, 3, 4), KLENK u. GIEHLEN] und Glykoproteide (BÖHM) dar. — Beim Gargoylismus wurde am Cerebrum (Cortex) und einigen Körperorganen ein erhöhter Gangliosidgehalt durch histochemische [DIEZEL (3)] oder biochemische Untersuchungen<sup>1</sup> mehrfach bestätigt [KUTZIM, EDGAR, KLENK u. LÖHR, BRANTE (2, 4), SEITELBERGER (2)]. — Bial-positive saure Glykolipide vom Gangliosidtyp stellten wir lediglich in den mesenchymalen Zellen der Herzklappe, der Aortenwand, der Gelenkkapsel und des Perichondrium fest. Die intracellulären Glykolipide des Nervensystems, der Leber, Milz und Nieren verhielten sich dagegen

<sup>1</sup> Die häufig zitierte Beobachtung von JERVIS läßt sich, wie auch HIENZ (1) betont, nicht mit Sicherheit als Gargoylismus-Fall einordnen.

Bial-negativ (Tabelle 1). Hier erhebt sich die bedeutsame Frage, ob das Vorkommen dieser Bial-negativen — offenbar neuraminsäurefreien — Glykolipide tatsächlichen intravitalen Verhältnissen entspricht. Zweifellos muß bei längerer wäßriger Formolkonservierung mit einer langsamen hydrolytischen Abspaltung der Neuraminsäure aus Gangliosiden gerechnet werden, so daß künstliche Sekundärprodukte entstehen, die eine Mittelstellung zwischen Cerebrosiden und Gangliosiden einnehmen und dem im Erythrocytenstroma des Menschen und einiger Tierespecies natürlicherweise vorkommenden Glykolipiden [KLENK u. LAUENSTEIN (1, 2), KLENK (3, 4)] verwandt sind. Die Abspaltung geht aber im allgemeinen recht langsam vonstatten. So stellten KLENK, VATER und BARTSCH bei einem Tay-Sachs-Fall nach 6jähriger Formolkonservierung nur eine um 25—35% unter dem Ausgangswert liegende Abnahme des Gangliosidgehalts des Cortex fest. — Es gibt aber auch einwandfreie Gargoylismus-Fälle, bei denen ein normaler Gangliosidgehalt des Hirns (SARTORI u. BARUFFALDI, BISHTON u. Mitarb.) oder eine negative histochemische Bial-Reaktion der intraneuronalen Ablagerungen [MÁTHYUS u. JOBST, DIEZEL (4)] gefunden wurden. Mit den wichtigen von SEITELBERGER (2) mitgeteilten Fällen zeigt unsere Beobachtung, soweit es die Glykolipidstapelung betrifft, weitgehende Übereinstimmung<sup>1</sup>. Trotz der mäßigen Gangliosidvermehrung der Rinde (2,2%), die noch höher als der gleichfalls im Klenkschen Institut bestimmte Wert unseres Falles (0,65%) liegt, sieht SEITELBERGER (1, 2) die Hauptspeicherkomponente in *Intermediärprodukten* der Sphingolipid-Stoffwechselkette, die eine Mittelstellung zwischen Cerebrosiden und Gangliosiden einnehmen könnten. Tatsächlich wurde in seinem Fall 2 auch ein Cerebrodihexosid aus der Niere isoliert. Es besteht keine Veranlassung beim Gargoylismus, eine Thesaurierung von Cerebrosiden („Monohexose-Sphingolipide“) anzunehmen. Die biochemische Analyse einschlägiger Fälle erbrachte keine Erhöhung dieser Fraktion. Von ASHBY u. Mitarb. und BRANTE (2) sind sogar bemerkenswerte Erniedrigungen im Cerebrosidgehalt des Cortex festgestellt worden. Auch kennt man beim Morbus Gaucher als klassischen Vertreter der Cerebrosidose keine spezifische Thesauropathie der Nervenzellen und Organparenchyme [DIEZEL (3), PETERS]. Zusammenschauend sind wir mit SEITELBERGER (1, 2) der Auffassung, daß in *manchen Gargoylismusfällen* bei wechselnder Organbeteiligung intracellulär nicht Ganglioside, sondern hauptsächlich *neuraminsäurefreie* zuckerreiche *Sphingoglykolipide* gespeichert werden, die eine Mittelstellung zwischen Gangliosiden und Cerebrosiden einnehmen<sup>2</sup>.

Der *Acidität* des Glykolipids entspricht die gute Färbbarkeit mit Astrablau (Alcian blue), Aldehydfuchsin (ohne Voroxydation), Nilblausulfat (blaue Färbung), die kräftige  $\gamma$ -Metachromasie bei der Feyrterischen Thionin-Einschlußfärbung und die hohe Methylenblau-Bindfähigkeit.

In der positiven CP-Reaktion [chloroformige Technik nach DIEZEL (3)] erblicken wir einen Hinweis für die zusätzliche celluläre Einlagerung von cholinphosphorhaltigen Lipiden. Diese sind wahrscheinlich *mit* für das chromotrope

<sup>1</sup> Auffällig ist nur, daß trotz hoher Chromotropie, positiver Alcian blue- und Hale-Reaktion ein zwischen  $p_H$  6,4 und 7,0 schwankender isoelektrischer Punkt der Speichersubstanz angegeben wird. Vielleicht sind diese von unseren Ergebnissen abweichenden Befunde auf Unterschiede in der Methodik zurückzuführen (vgl. obigen Abschnitt IV, 1).

<sup>2</sup> Siehe Nachtrag während der Korrektur am Schluß der Arbeit.

Tabelle 3

Autor <sup>1</sup>	Alter Geschlecht	Gehirn (Cortex)				Leber				Milz			
		Gargoylismus		Norm		Gargoylismus		Norm		Gargoylismus		Norm	
		T. C.	F. C.	T. C.	F. C.	T. C.	F. C.	T. C.	F. C.	T. C.	F. C.	T. C.	F. C.
HOLDEN u. THANNHAUSER *	6 Jahre, ♂					1,2	1,1			1,8	1,7		
BRANTE * <sup>2</sup>	3 Jahre,	5,9	5,1	5,1		1,0	0,7					0,6	0,5
SMITH u. Mitarb. *	29 Jahre, ♂					0,18	0,1 <sup>2</sup>						
Eigener Fall **	4 Jahre, ♂	1,92	1,24	0,77 <sup>3</sup>				0,24—0,4	0,2—0,25	0,96	0,88		

\* Cholesteringehalt in Prozent des Trockengewichtes. T. C. Totales Cholesterin, F. C. Freies Cholesterin.

\*\* Cholesteringehalt in Prozent des Feuchtgewichtes.

<sup>1</sup> Die Befunde von STRAUSS u. Mitarb. (Gehirn, Leber, Milz), und BRITTON u. Mitarb. (Gehirncortex, Leber) sind nicht mit aufgeführt, weil sie nur das Gesamtcholesterin berücksichtigen.

<sup>2</sup> Leberbiopsie. <sup>3</sup> Nach BRANTE (1).

Verhalten des Speicherkomplexes am formfixierten Material verantwortlich. — Für das natürliche Vorkommen der hin und wieder diskutierten Phospho-Sulfatide erbrachten die neuen Untersuchungen von JATZKEWITZ keinen schlüssigen Hinweis. Auch wurde bislang nicht bekannt, ob normalerweise Schwefelsäureester von Cerebrodi- bzw. -oligohexosiden existieren.

Unsere Cholesterinbefunde seien ausführlicher dargestellt, weil sich hier Analogien zu anderen primären Lipidosen ergeben und weil bislang, soweit wir die Literatur übersehen, nur an der Leber eines einzigen Gargoylismusfalles (MÁTTYUS u. JOBST) eine positive Schultzsche Reaktion festgestellt wurde.

**Die Beteiligung von Cholesterin im cellular gespeicherten Lipidgemisch.** Die wenigen Autoren wie DAWSON, DELONG, SARTORI u. BARUFFALDI, die histochemische Untersuchungen auf Cholesterin ausführten, berichteten durchweg über negative Ergebnisse. Nur MÁTTYUS u. JOBST gelang der positive Nachweis an der Leber, wobei allerdings nicht geprüft wurde, ob das Steroid in freier oder veresterter Form vorlag. — Der Schultzsche Test verhielt sich in unserem Falle an den Nervenzellen, den Schaumzellen der Milz, den Nierentubuli und den mesenchymalen Zellen der Herzklappe und der Aortenintima positiv. Die nähere Differenzierung ergab, daß es sich bei den *Nervenzellen*, der *Milz* und den *Nierentubuli* um *freies Cholesterin* und bei der Herzklappe und Aortenintima um Gemische von freiem und verestertem Cholesterin handelte, wobei in der Herzklappe die nichtveresterte Form offensichtlich überwog. — Die in der Literatur verstreuten und die eigenen Resultate<sup>1</sup> der quantitativen Cholesterinbestimmung sind der nebenstehenden Tabelle 3 zu entnehmen. Diese Zahlenwerte bestätigen unsere Auffassung, daß die Organparenchyme in erster Linie *freies* und nicht

<sup>1</sup> Die Cholesterinbestimmungen verdanke ich Herrn Apotheker und Lebensmittelchemiker H. J. BAUER (Bezirks-Hygiene-Institut Magdeburg).

verestertes *Cholesterin* enthalten. Die intracelluläre Cholesterinstapelung ist sicher sekundär. Sie kann als Folge einer — über die (hypothetische) primäre Enzymopathie — hinausgreifenden allgemeinen Zelldystrophie im Sinne LETTERERS gewertet werden. Ein Überangebot von Cholesterin aus dem Blut liegt diesem Vorgang offenbar nicht zugrunde. Fast durchweg wurde beim Gargoylismus Normocholesterinämie festgestellt [SCHETTLER (2)]. Nur in wenigen Beobachtungen bestand eine deutliche, überdies nicht immer konstante Erhöhung des Serum-Cholesterins (ULLRICH). Wir halten es im Hinblick auf die biochemischen Organanalysen für möglich, daß der schwach positiven cytochemischen Reaktion der Hirngrisea und der Tubulusepithelien nicht nur eine Cholesterinerhöhung, sondern auch eine veränderte Reaktionsform, mithin eine Art von „Cholesterinphanerose“, zugrunde liegt. Da DIEZEL (3) bei der infantilen Tay-Sachsschen und Niemann-Pickschen Erkrankung *Cholesterinester* als Bestandteile des cellulären Lipidgemisches angab, erscheinen weitere vergleichende histochemische und biochemische Untersuchungen unter Berücksichtigung sämtlicher Neurolipidosen notwendig.

### III. Zur Histochemie der gespeicherten Polysaccharide

Den richtungsweisenden Arbeiten von BRANTE (3, 4) folgten weitere biochemische und histochemische Untersuchungen [Zusammenstellung der Literatur bei DIEZEL (3) und HIENZ (2)] über die Beteiligung von Polysacchariden am Speicherungsprozeß. Neben Chondroitinsulfat B, Heparinsulfat und Hyaluronsäure wurden noch weitere, im einzelnen näher zu erforschende Hexuronsäure- und Hexosamin-haltige saure Mucopolysaccharide von unterschiedlichem Sulfatierungsgrad genannt, darunter auch Heptasaccharide (BROWN). Während über die vorwiegend celluläre, aber auch extracelluläre Anhäufung der teilweise sehr leicht löslichen Mucopolysaccharide in den Mesenchymabkömmlingen kaum noch ernstliche Zweifel bestehen, ist die Frage durchaus strittig, inwieweit sich auch die Organparenchyme, insbesondere die Nervenzellen, Leberzellen und Nierentubuli an der Thesaurierung dieser Stoffklasse beteiligen [vgl. BRANTE (3, 4), DIEZEL (3), SEITELBERGER (2), PETERS, HORVÁTH u. BILICZKI]. In Übereinstimmung mit den beiden Beobachtungen SEITELBERGERS (2) stellten wir außer der Carbohydratkomponente des Glykolipid(Protein)-Komplexes keine zusätzliche *Speicherung* von Mucopolysacchariden in den Nerven- und Gliazellen, Kupfferschen Sternzellen und den Tubulusepithelien der Niere fest. Auch die Stapelung von Mucopolysacchariden in den *Leberparenchymzellen* ließ sich nicht einwandfrei sichern. Dagegen wurden in den Schaumzellen und Sinusendothelien der Milzpulpa sowie in den Fibrohistiocyten der Herzklappe, der Leptomeninx, des Plexus chorioideus, der verbreiterten Virchow-Robinschen Räume und des Fasciculus opticus teils gegen Testis-Hyaluronidase labile Mucopolysaccharide und Glykoproteide (neben Glykolipiden) einwandfrei nachgewiesen. Die Intercellularsubstanzen (Grundsubstanzen) des Mesenchyms zeichneten sich durch das fast ausschließliche Vorkommen von Mucopolysaccharidstoffen aus (vgl. Abb. 8). HORVÁTH u. BILICZKI beschrieben in den Nervenzellen des Rückenmarks neben einem „Lipoid-Glykoprotein-Komplex“ auch Mucopolysaccharide, die erst nach dreistündiger Pepsinverdauung (der Gefrierschnitte) sichtbar wurden<sup>1</sup>. Dabei

<sup>1</sup> An den speichernden Nervenzellen der Hirnrinde, die in gleicher Weise mit einer Pepsinlösung behandelt wurde, konnten wir die Befunde der ungarischen Autoren nicht bestätigen.

blieb jedoch unberücksichtigt, daß die verwendeten Alcianblue- und Toluidinblau-Färbungen auch saure Lipide darstellen können. — Im Gegensatz zu dem Perichondrium fanden wir in den leicht vergrößerten Knorpelzellen der Femurepiphyse lediglich Glykogen und die normalen paranucleären Triglycerid-Tröpfchen. Auch die morphologisch unauffälligen Osteoblasten, Osteocyten und Osteoclasten (decalciniertes Material) enthielten keine pathologischen Substanz-einlagerungen [vgl. HIENZ (1)]. Die relativ spärliche Glykogenose der Leber, wie sie auch von BRANTE (4), DIEZEL (3) und SEITELBERGER (2) beobachtet wurde, rechnen wir ebenso wie die Neutralfettinfiltration nicht der primären Stoffwechsel-anomalie des Gargoylismus zu.

#### IV. Zur Beteiligung des Nervensystems beim Gargoylismus

Im Hinblick auf frühere Untersucher (DE LANGE u. Mitarb., L. STRAUSS, LINDSAY u. Mitarb.), die sich für die Stapelung eines glykogenartigen Stoffes aussprachen, muß bei unserer Beobachtung erneut betont werden, daß die Topik des cellulären Speicherungsprozesses dem *Typ einer Neurolipidose* entspricht. Wenn man von den charakteristischen mesenchymalen Veränderungen (Meningen, Adventitialräume, Plexusstroma, Fasciculus opticus) absieht, gleicht das neurohistologische Bild weitgehend der amaurotischen Idiotie (vgl. die Erstbeschreibung von TUTHILL). In diesem Zusammenhang sei, ohne Vollständigkeit anzustreben, auf einige bemerkenswerte Unterschiede der Prozeßlokalisation hingewiesen, die sich beim Vergleich des vorliegenden Falles mit einer früheren Beobachtung von generalisierter (neuromuskulärer) Glykogenose (SCHNABEL) ergaben. Man kann vier Zellkategorien herauschälen: Zellarten, die *nur beim Gargoylismus* (Purkinje-Zellen, Pyramidenzellen des Cortex) oder *nur bei der Glykogenose* (Gliazellen des Marklagers, Ependym) erkrankt sind und Zellarten, die *bei beiden Thesauropathien befallen* (motorische Vorderhorn-, große Spinalganglienzellen) oder *verschont* werden (Körnerzellen der Fascia dentata und des Kleinhirncortex). Die Thesauropathien vermögen hier, von Zufälligkeiten der Einzelbeobachtung abgesehen, wertvolle Erkenntnisse über die *Chemoarchitektur* des Nervensystems zu vermitteln, um deren Erforschung heute die verschiedensten Arbeitsrichtungen bemüht sind. — Ferner ergibt die eingehende morphologische und histochemische Prüfung unseres Falles keine allgemeine Markscheidendystrophie, sondern nur eine leichte umschriebene perivaskuläre Markscheiden- und Axonschädigung, die wir in formalgenetischer Hinsicht wie DIEZEL (3) deuten. Der für die Speicherung der Perikarya verantwortliche Stoffwechselblock müßte also so lokalisiert sein, daß das dynamische Gleichgewicht des physiologischen Myelinan- und -abbaues nicht alteriert wird. Unsere Befunde lassen sich daher schwerlich mit der Klenkschen (3) Vorstellung in Einklang bringen, nach der die Markscheiden-Sphingolipide (Cerebroside, Sphingomyeline) aus den Gangliosiden des Nervenzellplasmas unter Vermittlung des Achsenzyllinders entstehen. — Nähere Einzelheiten über die beim Gargoylismus vermutete Enzymopathie sind — wie bei allen Formen der Neurolipidosen — nicht bekannt. Doch darf angenommen werden, daß ein kongenitaler Enzymdefekt („inborn error of metabolism“), somit eine durch mangelhaften Abbau bedingte Stoffstapelung, vorliegt<sup>1</sup>. Neuerdings

<sup>1</sup> Neue biochemische Untersuchungen von TRAMS u. BRADY sprechen auch dafür, daß die Cerebroside Speicherung beim M. Gaucher *nicht* auf einer gesteigerten Synthese beruht.



neigt man dazu, den primären Stoffwechselfehler im Bereich der strukturellen Polysaccharide oder der Hexosamine als gemeinsame Bausteine der Mucopolysaccharide und Ganglioside zu sehen [BRANTE (2), HIENZ (2)]. Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse und abschließender Beurteilung dieses Falles möchten wir lediglich von der Kombination einer generalisierten, vorwiegend cellulären Störung des Sphingoglykolipid-<sup>1</sup> und Polysaccharid-Stoffwechsels sprechen, die dem Gargoylismus eine Mittelstellung zwischen den primären Lipidosen und Glykogenosen einräumt.

### Zusammenfassung

Die Organe eines 4 $\frac{1}{2}$  Jahre alten Knaben mit den typischen Merkmalen des Gargoylismus wurden histochemisch und biochemisch untersucht. Neben Gangliosiden, Phospholipiden, sauren (teils gegen Testis-Hyaluronidase labilen) Mucopolysacchariden und Glykoproteiden waren auch *stark PJS-positive, Bial-negative saure Glykolipide* beteiligt. Der Gangliosidgehalt der Hirnrinde betrug nur 0,65% (bezogen auf Trockengewicht). Erstmals wurde Cholesterin, vorwiegend in freier Form, im Lipidkomplex der Nervenzellen, Schaumzellen der Milz und Nierentubuli nachgewiesen. Die Zusammensetzung der Speichergemische unterlag organ- und zellspezifischen Schwankungen. Die histologischen Veränderungen der cerebro-spinalen und vegetativen Ganglienzellen, der Fasciculi optici und der Plexus chorioidei waren ungewöhnlich. Die Erkrankung wird als Folge einer genbedingten generalisierten Störung des Sphingoglykolipid- und Polysaccharid-Stoffwechsels angesehen.

### Summary

The organs of a 4 $\frac{1}{2}$  year old boy with the typical signs of gargoyism were studied histochemically and biochemically. Besides gangliosides, phospholipids, acid mucopolysaccharides (in part labile to testicular hyaluronidase) and glycoproteins, *strongly PAS positive Bial-negative acid glycolipids* were also determined. The ganglioside content of the cerebral cortex was only 0.65% (dry weight). Cholesterol was demonstrated for the first time, chiefly in the free form, in the lipid complex of nerve cells and foam cells of the spleen and renal tubuli. The composition of the stored substances was dependent upon fluctuations associated with organs and certain cells. The histologic changes of the cerebrospinal and autonomic ganglionic cells, the fasciculi optici, and the plexus chorioidei were unusual. The disease is regarded as a consequence of a gene regulated generalized disturbance of the sphingoglycolipid and polysaccharide metabolism.

*Nachtrag während der Korrektur.* Erst kürzlich konnten S. GATT u. E. R. BERMAN [Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 9—13 (1961)] bei der Tay-Sachsschen Krankheit ein *neues Neuraminsäure-freies Glykolipid* in ziemlich großer Menge aus dem Hirn isolieren. Die im normalen menschlichen Gehirn fehlende Verbindung soll sich aus Sphingosin, Fettsäure, Hexose und Hexosamin im molaren Verhältnis 1:1:3:1 zusammensetzen. In diesem Zusammenhang gewinnen die früheren von DIEZEL (3) beim frühinfantilen Typ der amaurotischen Idiotie erhobenen histochemischen Befunde erhöhte Bedeutung. Ähnlich wie bei unserem Gargoylismus-Fall waren nämlich in den Nervenzellen Glykolipide mit negativer Bial-Reaktion festgestellt worden.

<sup>1</sup> „Sphingoglykolipide“ als Sammelbegriff für alle Sphingosin- und Hexose-haltigen (Neuraminsäure-freien oder Neuraminsäure-haltigen) Lipide gebraucht.

## Literatur

- ASHBY, W. R., R. M. STEWART and J. H. WATKIN: Chondroosteodystrophy of the Hurler type (gargoylism). A pathological study. *Brain* **60**, 149 (1937).
- BISHTON, R. L., M. NORMAN and A. TINGEY: The pathology and chemistry of a case of gargoylism. *J. clin. Path.* **9**, 305 (1956).
- BÖHM, P.: Die Neuraminsäure (Biochemie, Biologie und Klinik). *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr.* **19**, 65, 129, 177 (1959).
- BRANTE, G.: (1) Studies on lipids in the nervous system with special reference to quantitative chemical determination and topical distribution. *Acta physiol. scand.* **18**, Suppl. 63 (1949).  
 — (2) Gargoylismus als Lipoidose. *Fette u. Seifen* **53**, 457 (1951).  
 — (3) Gargoylism — a mucopolysaccharidosis. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **4**, 43 (1952).  
 — (4) Chemical pathology in gargoylism. In: *Cerebral lipidoses*, p. 164. Oxford: Blackwell scientific publications 1957.
- BROWN, D. H.: Tissue storage of mucopolysaccharides in Hurler-Pfaundler's disease. *Proc. nat. Acad. Sci.* **43**, 783 (1957).
- DAWSON, J. M. P.: The histology and histochemistry of gargoylism. *J. Path. Bact.* **67**, 587 (1954).
- DELONG, V.: Gargoylismus. *Schweiz. Z. Path.* **18**, 318 (1955).
- DIEZEL, P. B.: (1) Histochemische Untersuchungen an primären Lipoidosen: Amaurotische Idiotie, Gargoylismus, Niemann-Picksche Krankheit, Gauchersche Krankheit, mit besonderer Berücksichtigung des Zentralnervensystems. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 89 (1954).  
 — (2) Bestimmungen der Neuraminsäure im histologischen Schnittpräparat. *Naturwissenschaften* **42**, 487 (1955).  
 — (3) Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipoide. Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie, H. 80. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.  
 — (4) Persönliche Mitteilung 13. 6. 1960.
- EDGAR, G. W. F.: Approche biochimique des lipidoses et des leucodystrophies (1). *Rev. neurol.* **92**, 277 (1955).
- FANCONI, G., u. A. PRADER: Pathologie des Wachstums und der endokrinen Drüsen. In: FANCONI-WALLGREN, Lehrbuch der Pädiatrie, 6. Aufl. Basel u. Stuttgart: Benno Schwabe 1961.
- FEIGIN, I.: A method for the histochemical differentiation of cholesterol and its esters. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 213 (1956).
- HALE, A. J.: The histochemistry of polysaccharides. *Int. Rev. Cytol.* **6**, 193 (1957).
- HALLERVORDEN, J. v.: Dysostosis multiplex. In *Handbuch der inneren Medizin*, Bd. V/3, S. 979. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.
- HENDERSON, J. L., A. R. MACGREGOR, S. J. THANNHAUSER and R. HOLDEN: The pathology and biochemistry of gargoylism. A report of three cases with a review of the literature. *Arch. Dis. Childh.* **27**, 230 (1952).
- HIENZ, A. H.: (1) Beitrag zur Pathologischen Anatomie der subchondralen Dysostosen. Inaug.-Diss. Heidelberg 1953.  
 — (2) Die Pfaundler-Hurlersche Krankheit. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **40**, 1 (1960).
- HILD, W.: Das Neuron. In *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. IV/4, S. 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- HORVÁTH, E., u. F. BILICZKI: Histochemische Untersuchungen in einem Fall von Hurler-Pfaunderscher Krankheit. *Acta histochem. (Jena)* **8**, 371 (1959).
- JATZKEWITZ, H.: Cerebron- und Kerasin-schwefelsäureester als Speichersubstanzen bei der Leukodystrophie, Typ. Scholz (metachromatische Form der diffusen Sklerose). *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **320**, 134 (1960).
- JEANLOZ, R. W.: The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheumatism* **3**, 233 (1960).
- JERVIS, G. E.: Familial mental deficiency akin to amaurotic idiocy and gargoylism. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **47**, 943 (1942).
- KLENK, E.: (1) Fette, Wachse, Phosphatide und Glykolipoide. In HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und physiologisch-chemischen Analyse*, Bd. III/2, S. 895. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

- KLENK, E.: (2) The pathological chemistry of the developing brain. p. 397. In *Biochemistry of the developing nervous system*, edit. H. WAELSCH. New York: Academic Press 1955.
- (3) Die Chemie der Lipoidosen und der Entmarkungskrankheiten. *Wiener Z. Nervenheilk.* **13**, 309 (1957).
- (4) On gangliosides. *Amer. J. Dis. Child.* **97**, 711 (1959).
- , u. W. GIEHLEN: Zur Kenntnis der Ganglioside des Gehirns. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **319**, 272 (1960).
- , u. K. LAUENSTEIN: (1) Über die zuckerhaltigen Lipide der Formbestandteile des menschlichen Blutes. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **288**, 220 (1951).
- (2) Über die Glykolipide und Sphingomyeline des Stromas der Pferdeerythrocyten. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **295**, 164 (1953).
- W. VATER u. G. BARTSCH: Über die Gangliosidspeicherung im Nervengewebe bei der infantilen amaurotischen Idiotie vom Typ Tay-Sachs und die bei der Konservierung des Materials in Formalin auftretenden Veränderungen. *J. Neurochem.* **1**, 203 (1957).
- KLÜVER, H., and E. BARRERA: On the use of azaporphin derivatives (phthalocyanines) in staining nervous tissue. *J. Psychol. (Provincetown)* **37**, 199 (1954).
- KOBAYASHI, N.: Acid mucopolysaccharide granules in the glomerular epithelium in gargoylism. *Amer. J. Path.* **35**, 591 (1959).
- KUTZIM, H.: Chemische Untersuchungen des Gehirns bei zwei Fällen von Hurler-Pfaunderscher Erkrankung. Inaug.-Diss. Köln 1946.
- LANGE, C. DE, P. F. GERLINGS, A. DE KLEYN and T. W. LETTINGA: Some remarks on gargoylism. *Acta paediat. (Uppsala)* **31**, 398 (1944).
- LETTERER, E.: Speicherkrankheiten. *Dtsch. med. Wschr.* **1948**, 147.
- LINDSAY, S., W. A. REILLY, TH. J. GOTHAM and R. SKAHEN: Gargoylism. Study of pathologic lesions and clinical review of twelve cases. *Amer. J. Dis. Child.* **76**, 239 (1948).
- LIPP, W.: Histochemische Methoden. München: Oldenbourg 1954 (fortlaufend).
- MÁTTYUS, A., u. C. JOBST: Zur Histopathologie und Histochemie der Hurler-Pfaunderschen Krankheit (Gargoylismus). *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **198**, 317 (1959).
- MILLER, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **42**, 261 (1959).
- NISBET, N. W., and B. F. CUPIT: Gargoylism. Report of a case. *Brit. J. Surg.* **41**, 404 (1954).
- NOBACK, CH. R.: The protagon ( $\pi$ )granules of Reich. *J. comp. Neur.* **99**, 91 (1953).
- PEARSE, A. G. E.: (1) Copper phthalocyanins as phospholipid stains. *J. Path. Bact.* **70**, 554 (1955).
- (2) Histochemistry. Theoretical and applied, 2nd edit. London: J. & A. Churchill 1960.
- PETERS, G.: Die Störungen des Lipid-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsels. In *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. XIII/2, B, S. 1831. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- ROSSIER, A., R. CALDERA, S. SARRUT et L. HOULLEMARE: Les glycogénoses néonatales. *Arch. franç. Pédiat.* **17**, 886 (1960).
- SARTORI, E., e O. BARUFFALDI: Contributo anatomopatologico e biochimico allo studio del «gargoilismo». *Riv. Anat. pat.* **7**, 153 (1953).
- SCHETTLER, G.: Lipidosen, b) Pfaundler-Hurlersche Krankheit. In *Handbuch der inneren Medizin*, Bd. VII/2, S. 660. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- SCHNABEL, R.: Über die neuromuskuläre Form der Glykogenspeicherkkrankheit. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 287 (1958).
- , u. G. SIR: Histochemische Untersuchungen über die  $\pi$ -Granula (REICH) der peripheren markhaltigen Nerven. *Z. Zellf. (im Druck)*.
- SEITELBERGER, F.: (1) Histochemische Befunde bei Gargoylismus. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 292 (1956).
- (2) The position of gargoylism amongst the sphingolipidoses on the basis of the histochemistry of cellular storage substances. In *Cerebral lipidoses*, p. 77. Oxford: Blackwell scientific publications 1957.
- SMITH, E. B., T. C. HAMPELMANN, S. MOORE and D. P. BARR: Gargoylism (Dysostosis multiplex): Two adult cases with one autopsy. *Ann. intern. Med.* **36**, 652 (1952).
- STRAUSS, L.: The pathology of gargoylism. Report of a case and review of the literature. *Amer. J. Path.* **24**, 855 (1948).

THANNHAUSER, S. J.: Lipidoses, diseases of the cellular lipid metabolism, edit. H. A. CHRISTIAN. New York: Oxford University Press 1950.

TRAMS, E. G., and R. O. BRADY: Cerebroside synthesis in Gaucher's disease. J. clin. Invest. **39**, 1546 (1960).

ULLRICH, O.: Die Pfaundler-Hurlersche Krankheit. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **63**, 929 (1943).

UZMAN, L. L.: Chemical nature of the storage substance in gargoylism (Hurler-Pfaundler's disease). Arch. Path. (Chicago) **60**, 308 (1955).

WOLMAN, M.: The lipids stained by the periodic acid-Schiff-technic. Stain Technol. **31**, 241 (1956).

Dr. med. RALF SCHNABEL

Oberarzt am Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie  
Magdeburg, Leipziger Straße 44