

Die Feinstruktur markloser (Remakscher) Nervenfasern bei der Isoniazid-Neuropathie

J. M. SCHRÖDER

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Neuropathologische Abteilung und Neurologisches
Institut (Edinger-Institut) der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. W. Krücke)

Eingegangen am 25. September 1969

Ultrastructure of Unmyelinated (Remak) Nerve Fibers in INH-Neuropathy

Summary. In sciatic nerves of rats, there are more than twice as much unmyelinated than myelinated axons. Their ratio varies in a wide range from one area to the other. Some regressive changes are seen already in unmyelinated axons of normal controls (loss of structural components, axonal beading). Usually, these alterations can be distinguished from early experimental lesions by the lack of characteristic Schwann cell reactions.

In the beginning of INH-neuropathy, fewer unmyelinated than myelinated nerve fibers are degenerating. Some of the unmyelinated axons may become irregularly folded, swollen, or shrunken while there is a progressive loss of tubules, filaments, normal mitochondria, and sometimes an increase in the thickness of the axolemma.

The axonal changes are accompanied by a disturbance of the normal axon-Schwann cell relation. Initially, some Schwann cells may become extremely irregular; later they lose their surface differentiation while their cross sectional contour becomes rather rounded.

In general, unmyelinated axons in INH-neuropathy show similar alterations and disturbances of the axon-Schwann cell relation as seen in Wallerian degeneration. Yet extremely deformed unmyelinated nerve fibers, axons as well as Schwann cells, and mitochondrial granules were only observed in INH-neuropathy.

Zusammenfassung. Im N. ischiadicus der Ratte kommen etwa doppelt so viele marklose als markhaltige Nervenfasern vor. Das normale zahlenmäßige Verhältnis dieser beiden Fasertypen schwankt in weiten Grenzen. Schon im ungeschädigten Nerven lassen sich bereits an einzelnen marklosen Nervenfasern verschiedenartige regressive Veränderungen wie Strukturverlust und perlschnurförmige Auftreibungen nachweisen; sie sind in der Regel von akuten, toxisch bedingten Veränderungen durch das Fehlen charakteristischer Schwann-Zellreaktionen zu differenzieren.

Bei der INH-Neuropathie degenerieren anfangs im Verhältnis zu den markhaltigen nur wenige marklose Nervenfasern. Einige marklose Axone können unregelmäßig konturiert, geschwollen oder geschrumpft erscheinen; dabei lösen sich die Tubuli und Filamente auf; in manchen Fällen verdichtet sich auch das Axolemma.

Die Axonveränderungen werden von Störungen der normalen Axon-Schwann-Zellrelation begleitet. In den Anfangsstadien können manche Schwann-Zellen hochgradig deformiert sein; später verlieren sie ihre Oberflächendifferenzierung und runden sich (auf dem Querschnitt) ab.

In der Regel zeigen die marklosen Nervenfasern bei der INH-Neuropathie die gleichen Veränderungen und Störungen der Axon-Schwann-Zellrelation wie bei der Wallerschen Degeneration. Extreme prolapsartige Verformungen von Axonen und Schwann-Zellen sowie mitochondriale Granula haben wir jedoch nur bei der INH-Neuropathie, nicht aber bei der Wallerschen Degeneration beobachtet.

Key-Words: Peripheral Nerve — Nerve Degeneration — Axon — Mitochondria — Isoniazid.

Im Gegensatz zur Wallerschen Degeneration ist das Bild der Nervenfaserdegeneration bei der INH-Neuropathie (Pegum, 1952; Klinghardt, 1954) elektronenmikroskopisch viel weniger genau untersucht, obwohl die eigentümlich distale Akzentuation der Nervenschäden (Klinghardt, 1965; Cavanagh, 1967; Schröder, 1968) einen andersartigen Pathomechanismus als bei der einfachen Wallerschen Degeneration vermuten läßt. Die Untersuchungen von Schlaepfer und Hager (1964a, b, c) haben keine Differenzierung gegenüber der Wallerschen Degeneration ergeben. So erhob sich die Frage, ob mit inzwischen verbesserter elektronenmikroskopischer Technik und bei höherer INH-Dosis doch bestimmte Veränderungen bei der INH-bedingten Nervenfaserschädigung nachweisbar sind, die weder bei der Triorthokresylphosphatvergiftung (Bischoff, 1967) noch bei der Wallerschen Degeneration (Engström u. Wersäll, 1958; Vial, 1958; Taxi, 1959; Terry u. Harkin, 1959; Honjin, 1959; Glimstedt u. Wohlfahrt, 1960a, b; Ohmi, 1961; Webster, 1962; Wechsler u. Hager 1962; Nathaniel u. Pease, 1963a, b, c; Blümcke, 1963a, b; Lee, 1963; Thomas, 1964a, b; Blümcke et al., 1965, 1966; Blümcke u. Niedorf, 1966; Zelená et al., 1968) noch bei anderen Schädigungsformen peripherer Nervenfasern auftreten.

Im folgenden werden die Veränderungen an den marklosen Nervenfasern dargestellt, da sie einfacher gebaut sind und spezifische Veränderungen möglicherweise leichter erkennen lassen als die komplizierteren markhaltigen Nervenfasern. Außerdem ist eine Degeneration markloser Nervenfasern bei der INH-Neuropathie im Experiment bisher nicht reproduziert worden, obwohl Ochoa u. Vial (1967) bestimmte Spätveränderungen an den marklosen Nervenfasern von Patienten mit INH-Neuropathien zwar gefunden, aber nicht ausdrücklich auf die INH-Medikation zurückgeführt haben.

Material und Methoden¹

1. Tierversuche mit INH

Zur Untersuchung der INH-Neuropathie wurden in 15 verschiedenen Gruppen insgesamt 110 Ratten des Sprague-Dawley-Stammes verwendet (vgl. Schröder, 1968), die INH jeweils in unterschiedlichen Dosen, in verschiedenen Abständen und über verschieden lange Zeiträume erhielten. Die täglich mit einer Magensonde applizierte INH-Menge betrug 250 bis 2 · 650 mg/kg, wobei die extrem hohen Dosen nur kurzfristig getragen wurden, zum Krampftod der Tiere führten oder durch reduzierte Dosen fortgesetzt werden mußten. Die Dauer der Versuche reichte von 1 Tag bis zu 2 Jahren. Die längste Zeit der regelmäßigen INH-Applikation betrug 6 Monate. Je 2 Tiere wurden nach 24 Std, 5 nach 48, 3 nach 3 und 4 Tagen, 3 nach 5, 2 nach 9, 1 nach 13 und 14 Tagen, 1 nach 2, 3, 4 und 6 Wochen, 3 nach 2 Monaten, 2 nach 3, 4 nach 6 und 2 nach 24 Monaten untersucht. Die beiden nach 2 Jahren und 3 weitere nach $\frac{1}{2}$ Jahr untersuchten Ratten stammen aus zwei verschiedenen Gruppen, von denen die erste über 14, die zweite über 6 Tage INH in hohen Dosen erhalten hatten. Insgesamt wurden 37 Tiere, welche die Intoxikation überlebt hatten und besonders ausgeprägte Symptome aufwiesen, für die phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchung ausgewählt und durch Perfusion fixiert.

2. Kontrollen

a) *Normale Tiere.* Zur Kontrolle dienten 12 weitere Ratten vom gleichen Stamm und teilweise auch vom gleichen Wurf wie die Experimentaltiere, außerdem 4 mindestens 2 Jahre

¹ Fräulein H. Frenk und Frau D. Schilling danke ich für ihre Mitarbeit.

alte Ratten und die nicht operierte kontralaterale Seite der zur Untersuchung der Wallerschen Degeneration verwendeten Tiere.

b) *Tierversuche zur Untersuchung der Wallerschen Degeneration.* Der N. ischiadicus von 10 verschiedenen 220—450 g schweren Wistar-Ratten wurde unter Äther-Chloralhydrat-Narkose freigelegt und ca. 3 cm distal vom Austritt aus dem Spinalkanal scharf durchtrennt. Nach 2, 3, 5, 7, 9, 10, 13, 16, 20 und 25 Tagen wurden die Tiere wie bei den INH-Versuchen durch Perfusion fixiert.

Sämtliche Ratten wurden mit Altromin R (Brock u. Wilk, 1961), zusätzlichen Gaben an Körnerfutter und Wasser ad libitum ernährt.

Fixation und Präparation

Die meisten Tiere wurden in Äther-Chloralhydrat-Narkose nach einer modifizierten Methode von Webster u. Collins durch die abdominale Aorta unterhalb des Abganges der Arteria renales und nur zwei Tiere durch die Aorta ascendens nach der Methode von Descarries u. Schröder perfundiert. In allen Fällen diente eine Lösung von 3,9% Glutaraldehyd (Schuchardt) mit 0,1 molarem Phosphatpuffer nach Sørensen als primäres Fixationsmittel (pH 7,5). Die Fixationslösung wurde mit Hilfe einer stufenlos regulierbaren Pumpe bei einem Druck von 200—250 mm Hg in die Aorta gepumpt (30—40 ml/min). Nach einer Perfusionszeit von 10 min erfolgte die Excision des N. ischiadicus beider Seiten oberhalb der Kniegelenksbeuge.

Anschließend, $\frac{1}{2}$ —1 Std nach Beginn der Perfusion, wurde die Perfusionslösung durch eine 2%ige OsO_4 -Lösung mit 0,1 molarem Phosphatpuffer nach Sørensen, ebenfalls bei Zimmertemperatur, ausgetauscht. Die Dehydratation erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe je 5 min in 25, 35, 50, 75, 95%igem und 2 · 20 min in absolutem Alkohol. Nach weiteren 20 min in einem Epon-Propylenoxydgemisch wurden die Nervenstücke in 6—24 Blöcke aufgeteilt und jeweils zu gleichen Teilen längs- und querorientiert in Epon eingebettet. 2 μ dicke Schnitte wurden an einem Sorvall-Porter-Blum-Ultramikrotom MT 1 oder MT 2 geschnitten und regelmäßig mit Toluidinblau oder Paraphenyldiamin (Estable-Puig et al., 1965) gefärbt. Dünnschnitte wurden an einem LKB-Mikrotom mit Dupont-Diamantmessern geschnitten, mit Bleicitrat (Venable u. Coggeshall, 1965) kontrastiert und mit einem Siemens Elmiskop I photographiert.

Ergebnisse

Phasenkontrastmikroskopische Befunde

Auf 25 repräsentativen Phasenkontrastaufnahmen von fünf verschiedenen normalen Nerven fanden wir bei 2000facher Vergrößerung 2058 markhaltige und 4436 marklose Nervenfasern (wobei die Bestimmung der marklosen Axone nicht ganz sicher ist). Das heißt, im N. ischiadicus der Ratte kommen etwa 2,2mal mehr marklose als markhaltige Nervenfasern vor.

Auch bei schwersten INH-Neuropathien mit Schädigung von mehr als der Hälfte der markhaltigen Nervenfasern bleibt in frühen Stadien noch ein Großteil der marklosen Axone intakt. Nach 2 und mehr Wochen scheint auch ihre Zahl reduziert zu sein.

Eine quantitative Bestimmung der geschädigten marklosen Axone ist jedoch problematisch, 1. weil phasenkontrastmikroskopisch viele präexistente marklose kaum von dünnen Büngnerschen Bändern markloser und markhaltiger Nervenfasern mit oder ohne regenerierte (marklose) Nervenfasern unterschieden werden können und 2. weil schon im normalen Nerven von Areal zu Areal ganz erhebliche Variationen der Relation von markhaltigen zu marklosen Nervenfasern vorkommen. Diese Relation schwankt pro Bild zwischen 5:1 und 1:5. Ein disseminierter Ausfall markloser Axone ist deshalb phasenkontrastmikroskopisch schwer zu objektivieren.

Elektronenmikroskopische Befunde

Zur Bestimmung der pathologischen Veränderungen an den marklosen Nervenfasern wurde eine eingehende Nachuntersuchung der Normalstruktur markloser Nervenfasern im N. ischiadicus der Ratte notwendig, da die bereits vorliegenden Untersuchungen von Gasser (1955) an Hinterwurzeln von Katzen und die von Elfvin (1958, 1961) am N. splanchnicus sowie am Truncus sympathicus von Katzen mit älteren Methoden durchgeführt wurden und nicht ausreichen, sämtliche Befunde im geschädigten Nerven von Normalbefunden abzugrenzen.

a) Marklose Nervenfasern bei Kontrolltieren

In einer einzigen Schwann-Zelle können 1—30 und mehr Axone liegen, je nachdem, ob etwas separat gelegene, von einem isolierten Schwann-Zellfortsatz umhüllte, aber von derselben Basalmembran umgebene Gruppen von Axonen noch zu der Hauptgruppe zu rechnen sind oder nicht. Die meisten Axone werden auf dem Querschnitt von 1—2 Cytoplasmazungen einer Schwannschen Zelle umhüllt (Abb. 1a); sie haben somit auch ein Mesaxon. Einige liegen tiefer, andere oberflächlicher im Cytoplasma der Schwannschen Zellen. Manche liegen in einer nur flachen Delle oder Rille an der Oberfläche der Schwann-Zelle und werden in bestimmten Schnittebenen nur von der Basalmembran gegenüber dem Endoneurium abgegrenzt (vgl. Abb. 2). Ein Mesaxon haben sie nicht. Auf Serienschnitten läßt sich jedoch gelegentlich nachweisen, daß derartige Axone in anderen Schnittebenen durchaus von Schwann-Zellfortsätzen bedeckt werden können, daß sie dort also auch ein reguläres Mesaxon haben.

Umgekehrt gibt es tiefe Dellen oder Logen an der Oberfläche einiger Schwann-Zellen, in denen anstelle eines Axons Kollagenfibrillen liegen (Gamble, 1964). Die Basalmembran zieht entlang der Schwann-Zelloberfläche, kleidet also auch die Logen aus; sie kann gleichzeitig mit einer zweiten Lamelle über die Loge hinwegziehen (Gamble, 1964). Weitere besondere Formationen der Mesaxone markloser Axone hat Ochoa (1967), Desmosomen-ähnliche Strukturen am Mesaxon markloser Axone haben Gamble (1964) sowie Gamble u. Gosset (1966) mitgeteilt.

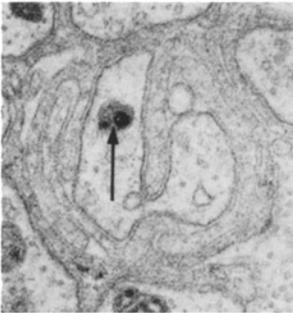
Der Abstand zwischen Axolemm und Schwann-Zellmembran beträgt nach Elfvin ca. 120 Å. Übergänge der Axone von einer Schwann-Zelle zur anderen sind in dem Schema von Elfvin (1958, seine Abb. 1) und im Atlas von Rhodin (1963, S. 47) abgebildet.

Normale Axone. Die Querschnittskontur der Axone ist in der Regel rund oder oval, seltener flach, spitz, eingedellt oder halbmondförmig gebogen (Abb. 1 b). Der Durchmesser beträgt meistens 0,25—1,25 μ (Abb. 1 a). Einzelne Axone zeigen im Längsschnitt perlchnurförmige Auftreibungen („beading“, vgl. Ochs, 1963, 1965), die einen Durchmesser von 2,5 oder 3 μ (Ochoa u. Mair, 1969) erreichen können. Die zugehörigen Schwann-Zellfortsätze sind jedoch stets schmal und vollkommen unauffällig. [Gasser (1955) fand in Wurzelnerven von Katzen Axondurchmesser zwischen 0,25—0,5 μ und nur gelegentlich bis zu 1,35 μ ; Elfvin (1958) im N. splanchnicus von Katzen Durchmesser von 0,3—1,3 μ ; die meisten seien dünner als 1 μ .]

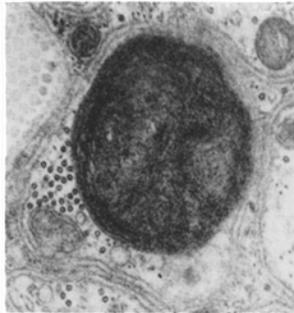
Der Gehalt an Tubuli und Filamenten schwankt beträchtlich. Manche marklosen Axone haben mehr als 60 Neurotubuli und mehr als 16 Neurofilamente. Im einzelnen fanden sich nur 2 oder 3 Tubuli und manchmal gar keine Filamente.



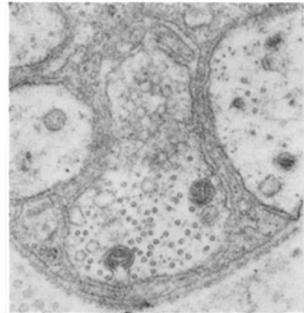
a



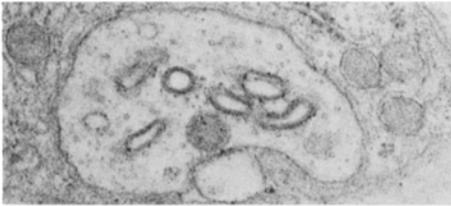
b



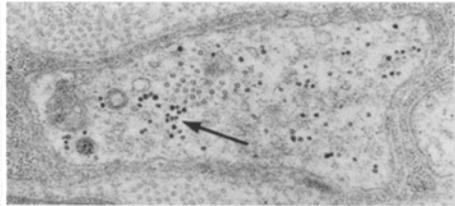
c



d



e



f

Abb. 1a—f. Uncharakteristische „Axonveränderungen“ (nach INH-Gabe) wie sie vereinzelt auch in normalen Nerven von Kontrolltieren vorkommen. a 11 verschiedene Axone mit normalem Gehalt an Tubuli und Filamenten sind hier in Höhe des Schwannschen Zellkernes getroffen. Der Pfeil oben deutet auf ein anomal dünnes Axon, der Pfeil links auf eines ohne Mesaxon. 20500 \times . b Irregulär konturiertes Axon; der Pfeil bezeichnet die mitochondrialen Granula, die wir bisher nur bei der INH-Neuropathie gefunden haben. 25500 \times . c Geschichtetes Körperchen in einem Axon mit zahlreichen Tubuli. 15500 \times . d Vesikelaggregation in einem normalen Axon. 20500 \times . e Auffällig dickwandige Vesikel. 20500 \times . f Intraaxonale Glykogengranula (Pfeil). 32400 \times

Mitochondrien kommen pro Querschnitt in unterschiedlicher Anzahl (0—5) vor. Ihr Durchmesser beträgt nach Webster (1962) 0,15—0,3 μ , ihre Länge mehrere Mikra. Sie werden von einer Doppelmembran umgeben, deren innere die meist longitudinal ausgerichteten Cristae mitochondriales bildet. Mitochondriale Granula haben wir in der Matrix normaler Mitochondrien nicht gesehen.

Das spärliche axoplasmatische Reticulum zeigt keinen Ribosomenbesatz. Umschriebene Dilatationen kommen gelegentlich vor und können bei einzelnen Tieren recht umfangreich sein. Elfvin (1958) hat außerdem bereits multivesiculäre Körperchen beschrieben und auf das Vorkommen einzelner osmiophiler Körper (vgl. Abb. 1c) hingewiesen, deren Genese ungeklärt ist. Außerdem gibt es gelegentlich Ansammlungen von Vesikeln, die einen Durchmesser von ca. 450 Å (Elfvin, 1958) haben (Abb. 1d).

Elfvin (1961) betont, daß die Axonmembran im *N. splanchnicus* stärker osmiophil sei als die Schwann-Zellmembran; doch konnte er nach einfacher OsO_4 -Fixation keine sicheren Dickenunterschiede messen. Nach der Uranylacetatkontrastierung wurde eine Dreischichtung der Membran deutlich. Die eine auf der Cytoplasmaseite gelegene Schicht sei 25—30 Å dick; die äußere etwa 20 Å, von der inneren getrennt durch einen helleren Spaltraum von etwa 20 Å. Die innere Schicht erscheine deshalb stärker opak als die äußere, wobei eine Gesamtdicke von ca. 65—70 Å resultiere. Im *Sympathicus* sei die Axonmembran etwa 50—60 Å dick, die Schwann-Zellmembran nur ca. 30—40 Å. (Bei markhaltigen Nervenfasern erschien dieser Unterschied zwischen Axon und Schwannzellmembran noch deutlicher.) Nach Bleicitrat- und Uranylacetatkontrastierung ließ sich in unseren Präparaten regelmäßig ein Dicken- und Kontrastunterschied zwischen Axon- und Schwann-Zellmembran nachweisen, der in der gleichen Größenordnung liegt.

b) Marklose Nervenfasern bei der INH-Neuropathie

Die pathologischen Veränderungen an den Axonen werden in der Regel von Reaktionen der zugehörigen Schwann-Zellen begleitet und sind dadurch bereits in den Frühstadien von einzelnen auch in Kontrollnerven vorkommenden Anomalien (Strukturverlust, Schwellungen) zu unterscheiden. Allerdings bleiben anfangs auffällig viele marklose Nervenfasern trotz schwerer Schädigung einer großen Zahl markhaltiger Nervenfasern intakt.

Axone. Selten nach 3, häufiger nach 4 und 5 Tagen ist in manchen Axonen einer einzigen Schwann-Zelle bereits eine Auflösung oder ein Verlust der Tubuli und Filamente zu erkennen (Abb. 2). Gleichzeitig verdichtet sich die Axonmembran und zeigt eine stärkere Osmiophilie. Ausnahmsweise spaltet sich das Axolemm in zwei Lamellen. Hinzu kommen Kaliberschwankungen der Axone, Auftreibungen und Schwellungen oder Verschmchtigungen (Abb. 5), Veränderungen, die vermutlich den perlsehnurförmigen Auftreibungen („beading“) auf dem Längsschnitt entsprechen. Auffällig ist das Hervortreten elektronendichter intramitochondrialer Granula, von denen im Einzelfall zwei und mehr in einem einzigen Mitochondrion nebeneinander liegen können (Abb. 3a). Derartige Mitochondriengranula sind häufig von kristalliner sternförmiger Gestalt. Sie wurden in axonalen Mitochondrien von Kontrollnerven oder bei der Wallerschen Degeneration nicht beobachtet. Allerdings sind sie nicht in allen offensichtlich geschädigten Axonen

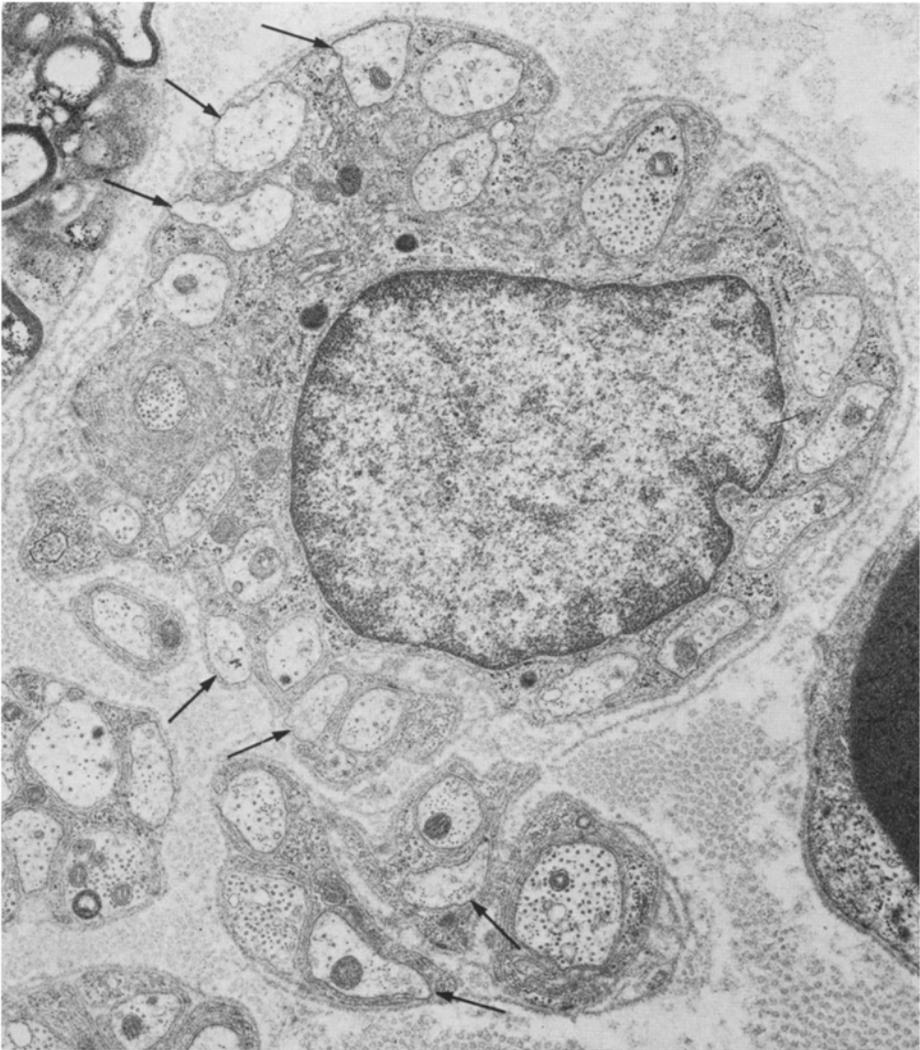


Abb. 2. 20 in einer einzigen Schwann-Zelle gelegene und 7 weitere, teilweise noch von der gleichen Basalmembran umgebene Axone zeigen geringgradige Anzeichen der Schädigung, wie sie vereinzelt auch in normalen Nerven vorkommen: einen weitgehenden Verlust der Tubuli und Filamente sowie eine leichte Konturverformung (Pfeile). Andere Axone sind noch völlig intakt. Im Bild oben links ist eine geschädigte markhaltige Nervenfasern angeschnitten. 4 Tage nach Beginn der INH-Applikation. 15 000 ×

Abb. 3a—c. 4 Tage nach Beginn der INH-Applikation. a Die vermehrten mitochondrialen Granula treten in zwei Axonen besonders deutlich hervor (*M*). Ein anderes Axon erscheint stark abgeflacht (*x*) bei gleichzeitiger Verdichtung des Axolemmis. Ein strukturarmes Axon im Bild rechts erscheint leicht geschwollen. Ein eigentümlicher keilförmiger Schwann-Zellfortsatz ist durch ein *S* markiert. 26 400 ×. b Die Axone einer annähernd abgerundeten Schwann-Zelle sind sämtlich an die Peripherie gedrängt und abgeflacht. Zwei schmale Schwann-Zellfortsätze liegen oberhalb des mittleren Axons. 26 400 ×. c Leere Axonlogen (Pfeile) an der Oberfläche einer Schwann-Zelle, die hier in Höhe des Kernes getroffen ist. 2700 ×

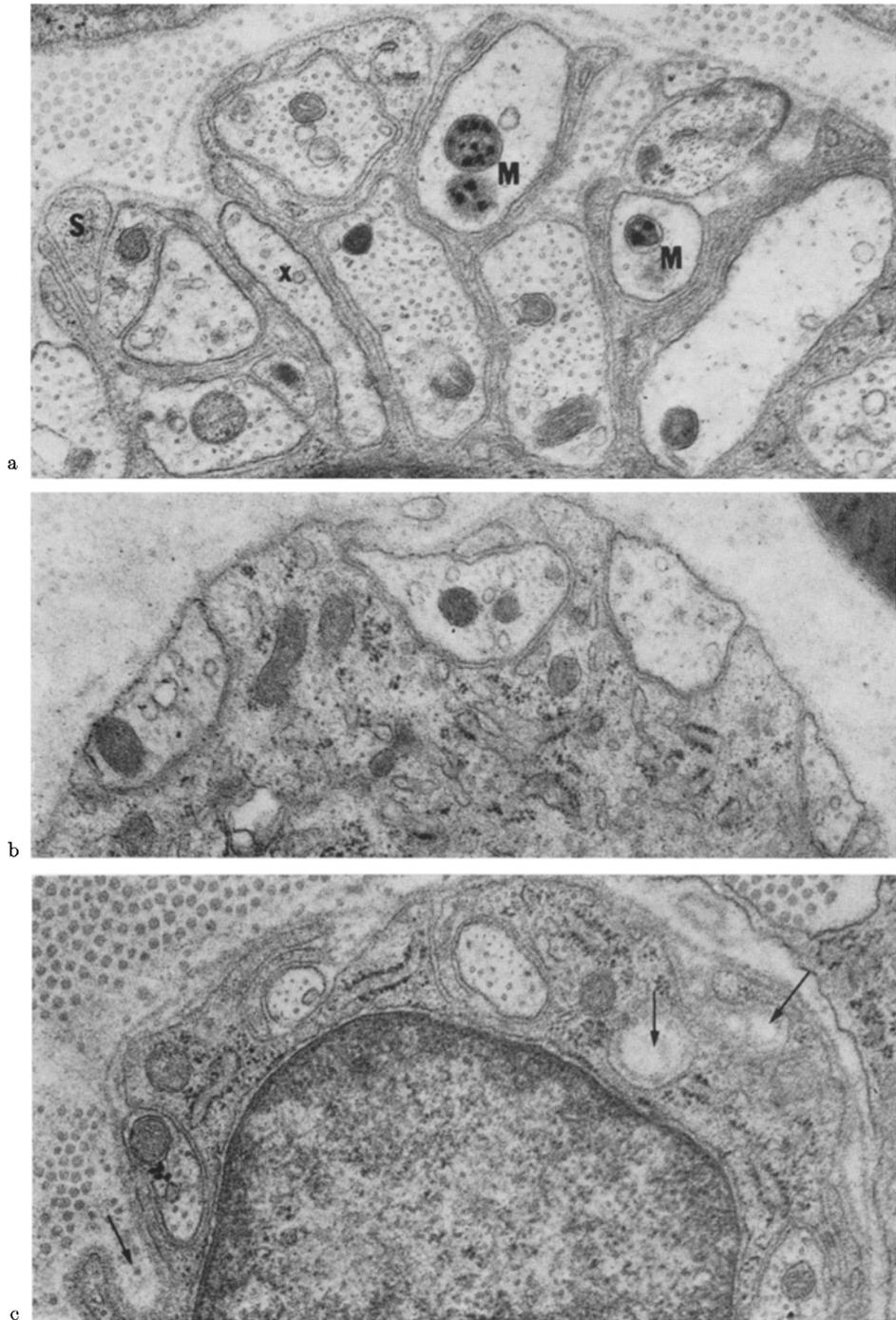


Abb.3

nachweisbar, und ausnahmsweise treten sie auch in Mitochondrien von Schwann-Zellen und Fibroblasten auf.

Einzelne Axone sind trotz erhaltener Binnenstruktur verformt, abgeflacht oder nach Art eines Prolapses verzerrt (Abb. 4). Manche Axone passen sich, an die Oberfläche der Schwannschen Zelle gerückt, der abnormen Kontur der verformten Schwann-Zelle an und erscheinen flach oder entrundet (Abb. 3 b).

Nach 5 Tagen sind viele Axone hochgradig aufgetrieben. Der Durchmesser beträgt 2—3 μ oder sogar 3,8 μ (Abb. 5), wie man es auch bei der Wallerschen Degeneration findet (Taxi, 1959). Die Tubuli und Filamente sind aufgelöst. Statt dessen findet man manchmal vesiculäre Gebilde, geschwollene Mitochondrien mit auffällig elektronendichten Membranen und einzelnen intramitochondrialen Granula. Daneben sind einzelne amorphe ungleichmäßige Substanzen von mittlerer Dichte und Osmiophilie abgelagert. Die Filamente können fast den gesamten Querschnitt des Axons ausfüllen, sofern das Axon klein und sein Kaliber geschrumpft ist (Abb. 5). Gelegentlich lassen sich auch Glykogengranula nachweisen (Abb. 1 f).

Abgesehen von der meist kontrastreicherer Membran der Axone verschwinden in späteren Stadien häufig die übrigen Unterscheidungsmerkmale zwischen den zugrunde gehenden Axonfragmenten und den proliferierten Schwann-Zellfortsätzen, deren granuläres endoplasmatisches Reticulum häufig aufgelöst ist (Abb. 6). Beide können noch einzelne Tubuli, Filamente, Mitochondrien und Glykogengranula enthalten, wenn auch meistens noch freie Ribosomen oder Ribosomenrosetten die Schwann-Zellfortsätze als solche kennzeichnen.

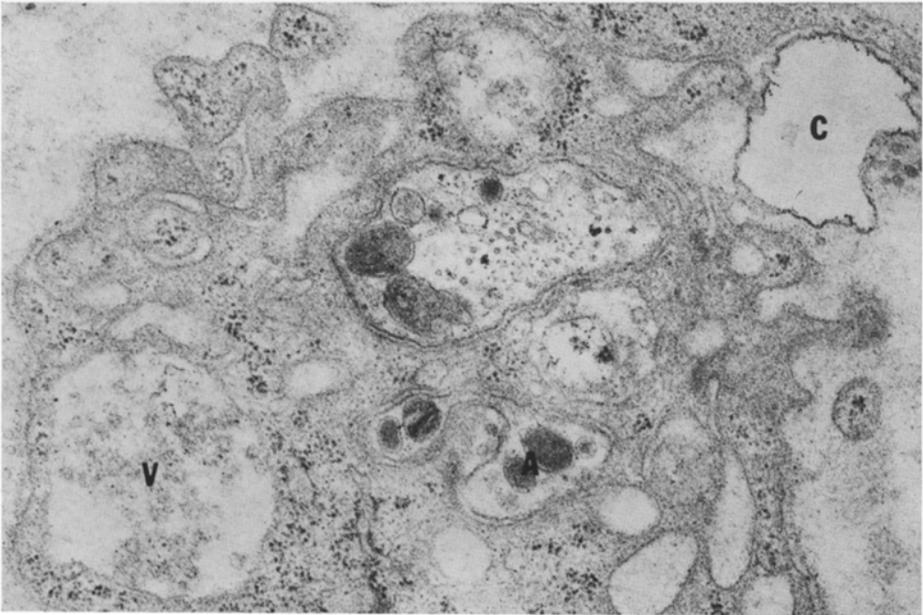
Axonfragmentationen lassen sich bei den marklosen Nervenfasern auf *Längsschnitten* nur äußerst schwierig nachweisen, da man erst auf kompletten Dünnschnittserien eine Kontinuitätsunterbrechung beweisend zur Darstellung bringen kann. Auch ist es bei der relativ geringen Anzahl geschädigter markloser Nervenfasern anfangs schwierig, überhaupt pathologische Veränderungen zu finden. In späteren Stadien beherrschen die longitudinal orientierten proliferierten Schwann-Zellfortsätze das Bild.

Schwann-Zellen. Die Cytoplasmazungen der Schwann-Zellen sind 3—5 Tage nach Beginn der INH-Intoxikation, gelegentlich aber auch noch später, zuweilen prolongiert und oft irregulär angeordnet (Abb. 4). Manche Schwann-Zellfortsätze ragen über die normale Kontur hinaus. Umgekehrt vertiefen sich auch die Rillen oder Logen, in denen normalerweise die Axone liegen, bis tief in das Cytoplasma der Schwannschen Zelle hinein (Abb. 4).

Abb. 4 a und b. 4 Tage nach Beginn der INH-Applikation. a Eine prolapsartige Axonverformung (Pfeil) wird teilweise von einem Schwann-Zellfortsatz bedeckt. Andere Axone sind noch weitgehend normal; eines enthält einzelne Glykogengranula (G), ein anderes mit nur sehr wenig normalen Tubuli und Filamenten mitochondriale Granula (M), die aus mehreren Körnern zusammengesetzt sind. Die Schwann-Zellfortsätze im Bild unten sind sehr irregulär konfiguriert, verlängert oder verzweigt. Daneben ist die Schwann-Zelloberfläche z. T. beträchtlich eingebuchtet. 19800 \times . b Noch stärkere Unregelmäßigkeiten der Schwann-Zellkontur sind in dieser Abbildung sichtbar. Eine intracelluläre autophagische Vacuole (V), ein extracellulär gelegener cystischer Fortsatz (C) und ein stark deformiertes Axon (A) mit vier Mitochondrien sind markiert. Die Basalmembran ist an manchen Stellen defekt oder schwer von dem endoneuralen Plasmaexsudat abzugrenzen. 29500 \times



a



b

Abb.4

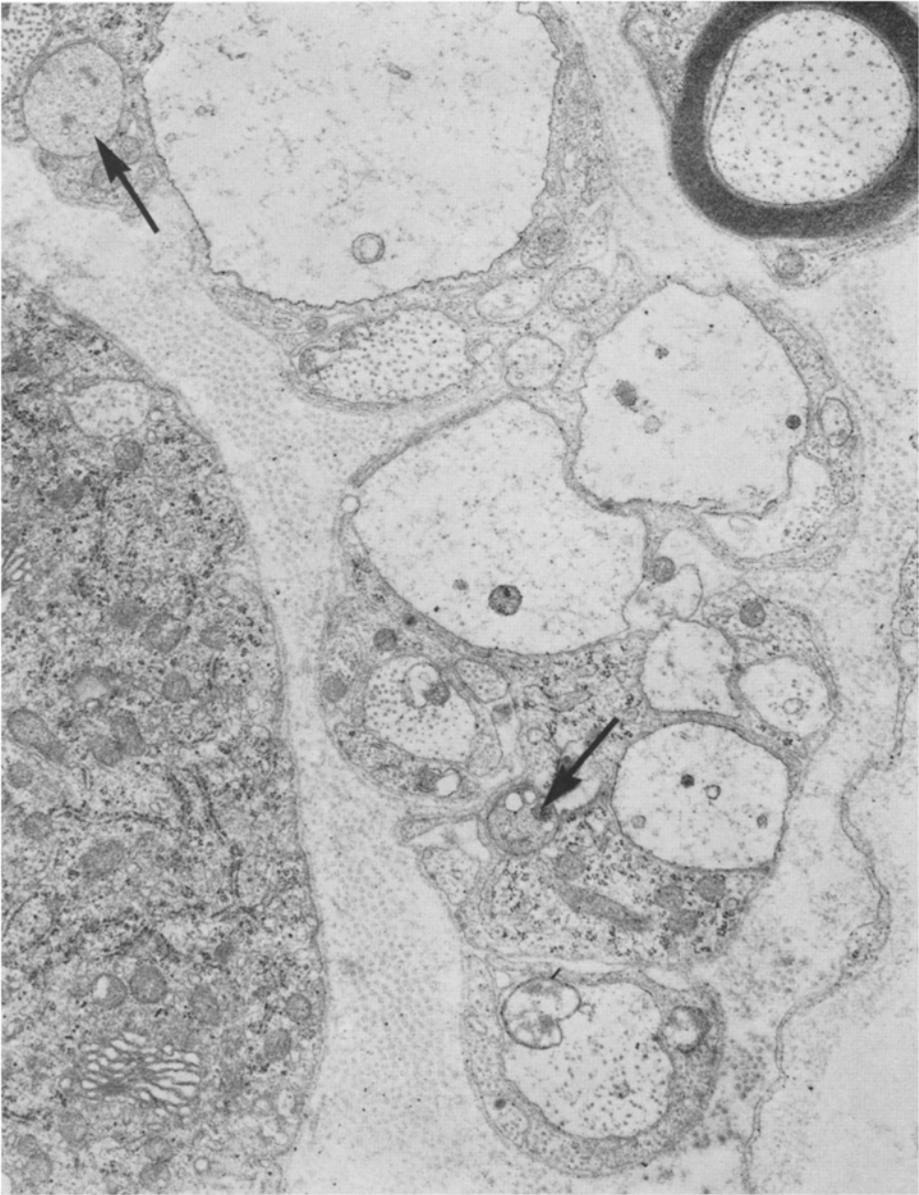


Abb. 5. Das Kaliber der Axone schwankt zwischen $0,35$ und $3,85 \mu$. Die einen enthalten reichlich geformte Bestandteile (Pfeile), die anderen erscheinen hochgradig geschwollen und strukturarm. Die Beziehung zwischen den Schwann-Zellen und den geschädigten Axonen ist nur geringfügig gestört. Im Bild oben rechts liegt eine normale, am Bildrand links die Schwann-Zelle einer geschädigten markhaltigen Nervenfasern. 6 Tage nach Beginn der INH-Applikation.

14000 \times

Derartige Unebenheiten der Oberflächenkontur werden meist noch, wenigstens andeutungsweise, von einer Basalmembran bedeckt. Manche sehr dünne fingerförmige Schwann-Zellfortsätze scheinen den Zusammenhang mit dem Zelleib zu



Abb. 6. a Die in Höhe des Kernes getroffene Schwann-Zelle ist nahezu abgerundet; an der Peripherie liegen die Schwann-Zellfortsätze (und ein fragliches Axon [A]), zusammengehalten von der gemeinsamen Basalmembran. Wegen der relativ kontrastarmen dünnen Oberflächenmembran sind die zahlreichen Fortsätze als Schwann-Zellfortsätze (und nicht als Axone!) zu identifizieren. 9 Tage nach Beginn der INH-Applikation. $20400\times$. b Ein einzelnes Axon wird von interdigitierenden Schwann-Zellfortsätzen umgeben, die z. T. frei, ohne Axone zu umschließen, in die Umgebung ragen. 3 Wochen nach Beginn der INH-Intoxikation. $14400\times$

verlieren. In aufeinanderfolgenden Schnitten läßt sich jedoch manchmal die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Perikaryon nachweisen. Wenn derartige

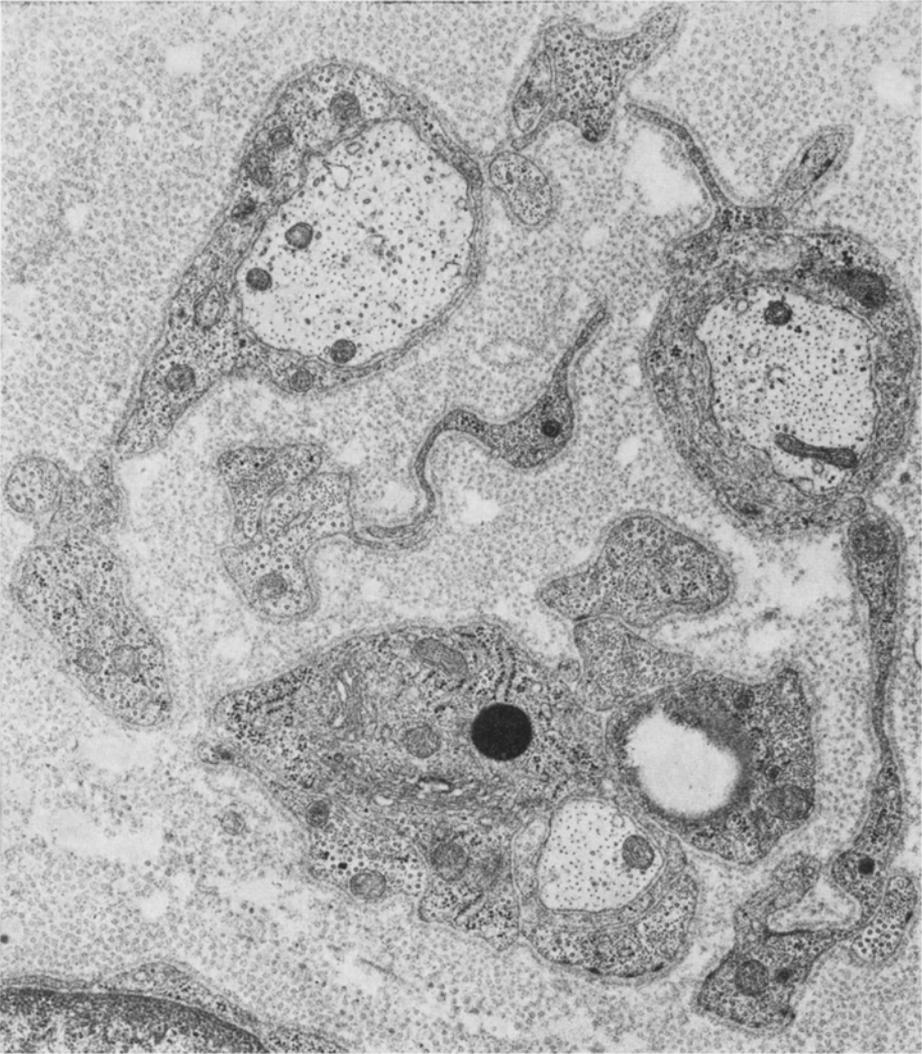


Abb.7. In einer Gruppe von Schwann-Zellfortsätzen sind nur noch drei marklose Axone übriggeblieben (oder regeneriert). Einzelne Fortsätze liegen flach und schmal ohne Beziehung zu Axonen im Endoneurium. Ihr Cytoplasma enthält an verschiedenen Stellen neben anderen regulären Cytoplasmabestandteilen besonders reichlich Tubuli und Filamente. Auffällig sind die Kollagenfasern, die im Innern der Gruppe etwas dünner sind als in der Umgebung. 3 Monate nach Beginn der INH-Applikation. 17 500 \times

Schwann-Zellfortsätze neben einem oder mehreren Axonen in einer Loge zusammenliegen, entsteht der irrtümliche Eindruck, daß sich das Axon aufgesplittert oder verzweigt hat. Meistens sind die Schwann-Zellfortsätze, wie schon erwähnt, an der unterschiedlichen Dichte ihrer Membran auch noch in fortgeschrittenen Stadien der Degeneration gut von den Axonen zu differenzieren.

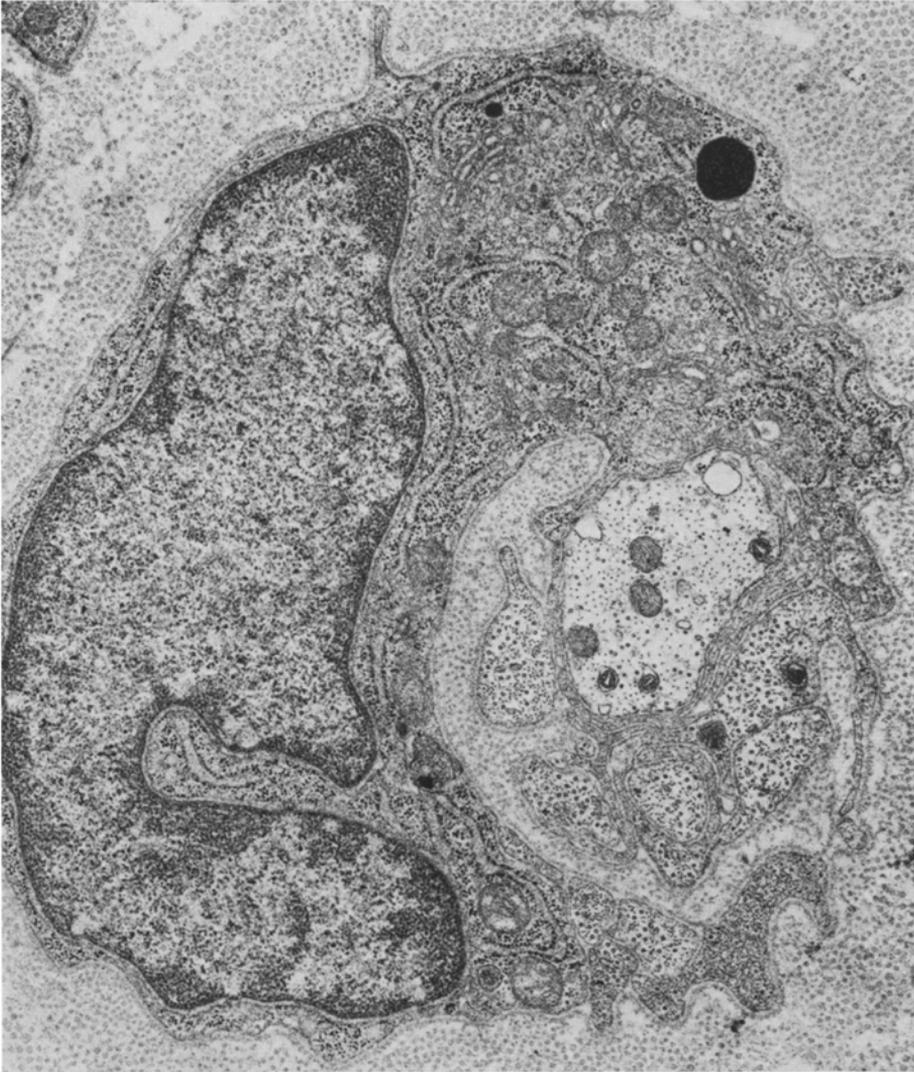


Abb. 8. Eine anomal konfigurierte Schwann-Zelle, in Höhe des Kernes geschnitten, liegt mit verschiedenen anderen Schwann-Zellfortsätzen und einem Axon, das durch die kontrastreichere bzw. dickere Oberflächenmembran gekennzeichnet ist, innerhalb einer gemeinsamen Basalmembran. Die Tubuli und Filamente im Axon und in den Schwann-Zellfortsätzen sind gleichförmig gebaut. Freie und an das endoplasmatische Reticulum gebundene Ribosomen, verschiedene Golgi-Komplexe und einzelne elektronendichte Körperchen sind außerdem im Cytoplasma der Schwann-Zelle zu erkennen. 3 Monate nach Beginn der INH-Applikation.

17500 ×

In Höhe des Perikaryons von Schwannschen Zellen mit geschädigten Nervenfasern besteht eine Tendenz des Zellkörpers, sich abzurunden (Abb. 6), was auch an den normalerweise sehr flachen oder schmalen, die Axone umgebenden kernfernen Cytoplasmafortsätzen zu beobachten ist. Die Fortsätze retrahieren sich

von den geschädigten Axonen. Später liegen oft Schwann-Zellfortsätze und mehr oder weniger geschädigte Axone beziehungslos nebeneinander, nur noch lose von der erhaltenen gemeinsamen Basalmembran gebündelt (Abb. 6).

Das *Cytoplasma* der geschädigten Schwann-Zellen zeigt nur selten gravierende Veränderungen. Das endoplasmatische Reticulum ist manchmal schon nach 4 Tagen frei von seinem regelrechten Ribosomenbesatz. Übrig bleiben flache agranuläre Cisternen oder Bläschen, die etwas aufgetrieben sein können. Nach 5 und 9 Tagen haben wir häufig freie Ribosomen oder Ribosomenrosetten im Cytoplasma gesehen, welche in diesen oder späteren Stadien auch wieder an den Cisternen des endoplasmatischen Reticulums zu beobachten sind. In späteren Stadien sind manchmal auffällig viele Filamente und Tubuli im Cytoplasma sonst weitgehend wieder normal erscheinender Schwannscher Zellen mit marklosen Nervenfasern nachweisbar (Abb. 7 und 8).

Spätstadien. Geschädigte (präexistente oder regenerierte?) marklose Nervenfasern zeigen 2, 3 und 6 Monate nach Beginn der INH-Intoxikation manchmal eine anomale Axon-Schwann-Zellrelation (Abb. 7 und 8), wie wir sie bei den jungen Kontrolltieren nie gesehen haben. Viele Schwann-Zellfortsätze bekommen jedoch keinen Kontakt mehr zu einem Axon. Sie sind häufig sehr dünn oder flach und liegen manchmal mit anderen ähnlich flachen Fortsätzen von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben im Endoneurium neben Gruppen restituerter markloser Axone (Abb. 7). Derartige Bilder sind häufig schwer von Veränderungen zu unterscheiden, die man schon normalerweise im N. ischiadicus von älteren Tieren findet.

Diskussion

Eine Degeneration von marklosen (Remaksehen) Nervenfasern ist bei der INH-Neuropathie bisher nicht beschrieben worden, obwohl mehr als doppelt so viele marklose als markhaltige Nervenfasern im N. ischiadicus der Ratte vorkommen; es wurde sogar betont, daß die marklosen Nervenfasern intakt bleiben. Tatsächlich degenerieren auch bei hochdosierter INH-Gabe anfangs nur sehr wenige marklose Axone. Viele bleiben erhalten, auch nach protrahierter INH-Applikation. Allerdings ist eine quantitative Beurteilung der Anzahl der ausgefallenen marklosen Nervenfasern sehr schwierig, da die Anzahl der in einem Areal vorkommenden marklosen Axone in weiten Grenzen variiert: Das Verhältnis der markhaltigen zu den marklosen Nervenfasern schwankt von Areal zu Areal zwischen 5:1 und 1:5, wenn man Phasenkontrastaufnahmen bei 2000facher Vergrößerung vergleicht.

Von dem beschriebenen Auftreten der intramitochondrialen Granula und prolapsartigen Verformungen mancher Axone (Abb. 3) abgesehen, ähnelt das Bild der INH-bedingten Schädigung weitgehend dem der Wallerschen Degeneration (vgl. Taxi, 1959): Im Vordergrund steht die Störung der Axon-Schwann-Zellbeziehung; die Schwann-Zellen retrahieren ihre Fortsätze von den geschädigten Axonen und liegen schließlich scheinbar beziehungslos neben den geschädigten Axonen, nur noch zusammengehalten von der gemeinsamen Basalmembran. Wie bei der Wallerschen Degeneration gehen die marklosen Axone einer einzigen Schwann-Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten zugrunde; jedenfalls findet man oft hochgradig geschädigte neben noch weitgehend intakt erscheinenden. Aus diesem

Grunde läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden, ob innerhalb einer Gruppe von marklosen Axonen einzelne Axone intakt bleiben oder ob stets sämtliche Axone einer Gruppe zugrunde gehen. In späteren Stadien findet man neben normalen Axonen häufig Gruppen, die eine anomale Axon-Schwann-Zellrelation aufweisen. Welche Axone überlebt haben und welche regeneriert sind, ist jedoch nicht sicher zu ersehen.

Als frühestes morphologisches Symptom der INH-Neuropathie findet man Veränderungen an den Axonen, denen die Reaktionen von seiten der Schwann-Zellen offensichtlich unmittelbar folgen. Den primären Angriffspunkt des INH am Axon zu bestimmen, ist jedoch schwierig, da neben den vermutlich primär toxischen Einwirkungen am Axon auch schon sekundär degenerative Veränderungen ablaufen, die sich überlagern und auf jedem Schnitt nebeneinander vorkommen.

Die Auflösung der Axontubuli und -filamente, die anfangs bei der INH-Neuropathie einsetzt, ist in ähnlicher Weise auch bei der Wallerschen Degeneration zu beobachten. Überhaupt ist die Auflösung von Mikrotubuli eine völlig unspezifische Reaktion; sie tritt schon bei einer Erniedrigung der Temperatur ein und kann auch durch verschiedenartige andere Einwirkungen, wie Änderungen des pH-Wertes oder des Druckes, hervorgerufen werden (Literatur s. Echandia u. Piezzi, 1968). Die gelegentlich auftretenden beträchtlichen Axolemmverdichtungen dürfen ebenfalls nicht als unmittelbare oder spezifische Folge der INH-Einwirkung angesehen werden, da sie auch bei der Wallerschen Degeneration vorkommen und eine völlig uncharakteristische, unspezifische Degenerationserscheinung darstellen; ähnliche Verdichtungen der Membran werden z. B. auch bei der Degeneration von Allantoiseepithelien (Danilova, 1966) und unter verschiedenen anderen Bedingungen beobachtet.

Besondere Beachtung verdienen jedoch die intramitochondrialen Granula (Abb. 3 und 4), die im akuten Stadium der Degeneration manchmal bei der INH-Neuropathie, nicht aber bei der Wallerschen Degeneration hervortreten. Sämtliche Axone, deren Mitochondrien derartige Granula enthielten, zeigten, wenn auch oft nur geringfügige, Anzeichen der Schädigung. In normalen Nervenfasern sind sie bisher nicht beschrieben worden. In den Kontrollnerven haben auch wir derartige Granula nicht gesehen. (Ausnahmsweise ließen sich bei einem Kaninchen längere Zeit nach einer experimentell-allergischen Neuritis einzelne, jedoch nicht so kontrastreiche Granula wie bei der INH-Neuropathie nachweisen.) Auch bei der stumpfnahen Anhäufung von Mitochondrien nach der Durchschneidung der Axone haben Zelená et al. (1968) keine intramitochondrialen Granula beschrieben. Allerdings lassen die paranodal angehäuften Mitochondrien in der Abb. 9 von Webster (1962) bei der Wallerschen Degeneration ganz vereinzelt, wenn auch nie in der Häufigkeit und Deutlichkeit wie in unseren Bildern, feine Granula erkennen.

Die Bedeutung der mitochondrialen Granula für die Funktion der Mitochondrien ist umstritten. Die meisten Arbeiten lassen eine Beziehung zum Calciumstoffwechsel oder allgemeiner zur Aufnahme und Abgabe divalenter Kationen vermuten (Weiss, 1955; Poche, 1959; Peachy, 1964; Greenawalt et al., 1964; Thomas u. Greenawalt, 1968). Außerdem ließ sich eine Korrelation zwischen der Vermehrung der mitochondrialen Granula, einer transversalen Orientierung der Cristae mitochondriales und einer Erhöhung der Cytochromoxydase-Aktivität

feststellen (Karnovsky, 1963). Doch sind die Zusammenhänge z. T. durch neuere Untersuchungen in den gleichen Laboratorien wieder in Frage gestellt worden (Pasquali-Ronchetti et al., 1968), so daß zumindest keine so einfache Beziehung zwischen der Inkorporation von Calcium oder Magnesium in den Mitochondrien und der elektronenmikroskopischen Dichte oder Deutlichkeit der Granula besteht, wie bis dahin angenommen worden war.

Ungewöhnlich zahlreiche mitochondriale Granula in motorischen Vorderhornzellen von Ratten wurden kürzlich nach Strychninapplikation beschrieben; sie fanden sich allerdings nur nach Calciumgabe zur Fixationslösung und in keinem Fall in normalen Nervenzellen (Yates u. Yates, 1968). Vermutlich treten die mitochondrialen Granula im Sinne eines unspezifischen Phänomens offenbar bei verschiedenartigen Schädigungen des Nervensystems hervor, ähnlich wie ja auch das Verschwinden der Axontubuli und -filamente und die Verdichtung des Axolemmes einen völlig unspezifischen Vorgang darstellen. Auch wenn wir über die Pathogenese der intramitochondrialen Granula bisher nichts Näheres wissen, ermöglichen sie in frühen Stadien an manchen Stellen immerhin eine feinstrukturelle Abgrenzung der INH-Neuropathie gegenüber der einfachen Wallerschen Degeneration.

Ein vorläufiger Versuch, mitochondriale Granula vor dem Auftreten oder auf dem Höhepunkt der peripheren Nervenschäden in den Spinalganglien nachzuweisen, führte noch zu keinem eindeutigen Resultat: Wohl fanden wir bei mehreren Tieren, die INH in hohen Dosen erhalten hatten, einzelne oder mehrere mitochondriale Granula; doch waren ähnlich viele auch in den Mitochondrien der Spinalganglienzellen von Kontrolltieren nachweisbar.

Somit muß dahingestellt bleiben, ob die Mitochondrien tatsächlich den primären Angriffspunkt der neurotoxischen Nebenwirkungen des INH darstellen oder ob die Neurotubuli und Axonfilamente oder die intraaxonalen Eiweißtransportvorgänge selbst oder das Axolemm oder gar sämtliche Organellen zugleich primär geschädigt werden. Jedenfalls dürften sich die lokalen INH-Wirkungen über die gesamte Länge des Axons summieren und so bereits Störungen verursachen, während sie in anders gebauten Zellen noch zu keiner wesentlichen oder manifesten Schädigung führen. Die vielfältigen, beim Menschen, bei Laboratoriumstieren und in Mycobakterien nachgewiesenen INH-Wirkungen auf den Vitamin B₆-Stoffwechsel (vgl. Zbinden u. Studer, 1955; Levene, 1961; Klinghardt, 1965), auf den Eiweißstoffwechsel (Tomesanyi, 1965), den Nucleinsäure- (Gangadham et al., 1963), Lipid- (Schaefer, 1960) und Kohlenhydratstoffwechsel (Krulik, 1966) bzw. auf bestimmte Fermente wie die Tryptophanase und die Decarboxylasen (Yoneda et al., 1952), Diaminooxydasen (Zeller et al., 1952), Dehydrogenasen (Schaefer, 1960), Glykohydrolasen (Bartmann et al., 1967) usw. lassen jedenfalls einen komplexen Wirkungsmechanismus vermuten.

Literatur

- Bartmann, K., Coper, H., Jütte, R.: Die NAD(P)-Glykohydrolase in Tuberkulosebakterien. Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus des INH. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. **257**, 8 (Abstract) (1967).
- Bischoff, A.: The ultrastructure of tri-ortho-cresyl-phosphat-poisoning. I. Studies on myelin and axonal alterations in the sciatic nerve. Acta neuropath. (Berl.) **9**, 158—174 (1967).

- Blümcke, S.: Zur Morphologie und Genese des Leitgewebes peripherer Nervenfaservereinate. II. Elektronenmikroskopische Befunde aus der Nervennarbe. *Zbl. allg. path. Anat.* **104**, 241—255 (1963).
- Elektronenoptische Untersuchungen an Schwannschen Zellen während der initialen Degeneration und frühen Regeneration. *Beitr. path. Anat.* **128**, 238—258 (1963).
- Niedorf, H. R.: Electron microscope studies of Schwann cells during the Wallerian degeneration with special reference to the cytoplasmic filaments. *Acta neuropath. (Berl.)* **6**, 46—60 (1966).
- — Rode, J.: Axoplasmic alterations in the proximal and distal stumps of transected nerves. *Acta neuropath. (Berl.)* **7**, 44—61 (1966).
- Themann, H., Niedorf, H. R.: The deposition of glycogen during the degeneration and regeneration in sciatic nerves of rabbits. Light and electron microscopic studies. *Acta neuropath. (Berl.)* **5**, 69—81 (1965).
- Brock, N., Wilk, W.: Zur Ernährung der Laboratoriumstiere. *Arzneimittel-Forsch. (Drug. Res.)* **11**, 1071—1086 (1961).
- Cajal, S. R.: Studien über Nervenregeneration. Leipzig: Joh. Ambr. Barth 1908.
- Castro, F. de: Recherches sur la dégénération et la régénération du système nerveux sympathique. Quelques observations sur la constitution des synapses dans les ganglions. *Trab. Lab. invest. Biol.* **26**, 357—456 (1930).
- Cavanagh, J. B.: On the pattern of changes in peripheral nerves produced by isoniazid intoxication in rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **30**, 26—33 (1967).
- Danilova, L. V.: An increasing contrast of cell membranes in allantoic epithelium under degenerative variations. In: *Electron Microscopy 1966, Volume II*, ed. by R. Uyeda. Tokyo: Maruzen 1966.
- Descarries, L., Schröder, J. M.: Fixation du tissu nerveux par perfusion a grand débit. *J. Microscopie* **7**, 281—286 (1968).
- Echandia, E. L. R., Piezzi, R. S.: Microtubules in the nerve fibers of the toad *Bufo Arenarum* Hensel. *J. Cell Biol.* **39**, 491—497 (1968).
- Elfvin, L. G.: The ultrastructure of unmyelinated fibers in the splenic nerve of the cat. *J. Ultrastruct.* **1**, 428—454 (1958).
- Electron microscopic investigation of the plasma membrane and myelin sheath of autonomic nerve fibers in the cat. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 388—407 (1961).
- Engström, H., Wersäll, J.: Myelin sheath structure in nerve fibre demyelination and branching regions. *Exp. Cell Res.* **14**, 414—425 (1958).
- Estable-Puig, J. F., Bauer, W. C., Blumberg, J. M.: Paraphenylenediamine staining of osmium-fixed plastic embedded tissue for light and phase microscopy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **24**, 531—535 (1965).
- Gamble, H. J.: Comparative electron microscopic observations on the connective tissues of a peripheral nerve and a spinal nerve root in the rat. *J. Anat. (Lond.)* **98**, 17—25 (1964).
- Gosset, J. M.: Specialization of Schwann cell membranes. *Nature (Lond.)* **212**, 734—735 (1966).
- Gangadharam, P. R. J., Harold, F. M., Schaefer, W. B.: Selective inhibition of nucleic acid synthesis in mycobacterium tuberculosis by isoniazid. *Nature (Lond.)* **198**, 712—714 (1963).
- Gasser, H. S.: Properties of dorsal root unmyelinated fibers on the two sides of the ganglion. *J. gen. Physiol.* **38**, 709—728 (1955).
- Glimstedt, G., Wohlfahrt, G.: Electron microscopic observations on Wallerian degeneration in peripheral nerves. *Acta morph. neerl.-scand.* **3**, 135—146 (1960).
- — Electron microscopic studies on peripheral nerve regeneration. *Lunds universitets arsskrift* **16**, 1—22 (1960).
- Greenawalt, J. W., Rossi, C. S., Lehninger, A. L.: Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **23**, 21—38 (1964).
- Honjin, R., Nakamura, T., Imura, M.: Electron microscopy of peripheral nerve fibers. III. On the axoplasmic changes during Wallerian degeneration. *Okajimas Folia anat. jap.* **33**, 131—156 (1959).
- Karnovsky, M. J.: The fine structure of mitochondria in the frog nephron, correlated with cytochrome oxidase activity. *Exp. molec. Path.* **2**, 347—366 (1963).

- Klinghardt, G. W.: Experimentelle Nervenfaserschädigungen durch Isonicotinsäurehydrazid und ihre Bedeutung für die Klinik. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med. (Kongr.)* **60**, 764—768 (1954).
- Arzneimittelschädigungen des peripheren Nervensystems unter besonderer Berücksichtigung der Polyneuropathie durch Isonicotinsäurehydrazid (experimentelle und humanpathologische Untersuchungen). *Proc. Vth Internat. Congr. Neuropath. Sept. 1965*, S. 292—301.
- Krulik, R.: Der Einfluß von Hydrazin und Isonicotinsäurehydrazid auf bestimmte Substanzen des Zuckerstoffwechsels in vitro. *Arzneimittel-Forsch.* **16**, 1623—1626 (1966).
- Levene, C. I.: The lathyrogenic effect of isonicotinic acid hydrazide (INAH) on the chick embryo and its reversal by pyridoxal. *J. exp. Med.* **113**, 795—811 (1961).
- Nathaniel, E. J. H., Pease, D. C.: Degenerative changes in rat dorsal roots during Wallerian degeneration. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 511—532 (1963).
- — Regenerative changes in rat dorsal roots following Wallerian degeneration. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 533—549 (1963).
- — Collagen and basement membrane formation by Schwann cells during nerve regeneration. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 550—560 (1963).
- Ochoa, J., Mair, W. G. P.: The normal sural nerve in man. I. Ultrastructure and numbers of fibres and cells. *Acta neuropath. (Berl.)* **13**, 197—216 (1969).
- Vial, J. D.: Behaviour of peripheral nerve structures in chronic neuropathies, with special reference to the Schwann cell. *J. Anat. (Lond.)* **102**, 95—111 (1967).
- Pasquali-Ronchetti, J., Greenawalt, Carafoli, E.: On the nature of the dense matrix granules of normal mitochondria. *J. Cell Biol.* **40**, 565—568 (1969).
- Ohmi, S.: Electron microscopic study on Wallerian degeneration of the peripheral nerve. *Z. Zellforsch.* **54**, 39—67 (1961).
- Peachy, C. D.: Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. *J. Cell Biol.* **20**, 95—111 (1964).
- Poche, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Herzmuskels vom Siebenschläfer während des aktiven und lethargischen Zustandes. *Z. Zellforsch.* **50**, 332—360 (1959).
- Ranson, S. W.: Degeneration and regeneration of nerve fibers. *J. comp. Neurol.* **22**, 487—547 (1912).
- Schaefer, W. R.: Effect of isoniazid on the dehydrogenase activity of mycobacterium tuberculosis. *J. Bact.* **79**, 236—245 (1960).
- Schlaepfer, W. W., Hager, H.: Ultrastructural studies of INH-induced neuropathy in rats. I. Early axonal changes. *Amer. J. Path.* **45**, 209—220 (1964).
- — Ultrastructural studies in INH-induced neuropathy in rats. II. Alteration and composition of myelin sheath. *Amer. J. Path.* **45**, 423—433 (1964).
- — Ultrastructural studies in INH-induced neuropathy in rats. III. Repair and regeneration. *Amer. J. Path.* **45**, 679—689 (1964).
- Schröder, J. M.: Die Hyperneurotisation Bünngnerscher Bänder bei der experimentellen Isoniazid-Neuropathie: Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Virchows Arch., Abt. B Zellpath.* **1**, 131—156 (1968).
- Taxi, J. T.: Etude au microscope electronique de la dégénérescence Wallérienne des fibres nerveuse amyeliniques. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **248**, 2796—2798 (1959).
- Terry, R. D., Harkin, J. C.: Wallerian degeneration and regeneration of peripheral nerves. In *Biology of Myelin*, p. 303. Ed. by S. A. Korey. New York: P. B. Hoeber 1959.
- Thomas, R. S., Greenawalt, J. W.: Microincineration, electron microscopy, and electron diffraction of calcium phosphate-loaded mitochondria. *J. Cell Biol.* **39**, 55—76 (1968).
- Tomsanyi, A.: Effect of isoniazid on the incorporation of amino acids into protein by a soluble system of mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.* **92**, 119—120 (1965).
- Venable, J. H., Coggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**, 407—408 (1965).
- Vial, J. D.: The early changes in axoplasm during Wallerian degeneration. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 551—556 (1968).

- Webster, H. deF.: Transient focal accumulations of axonal mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. *J. Cell Biol.* **12**, 361—383 (1962).
- Collins, G. H.: Comparison of osmium tetroxide and glutaraldehyde perfusion fixation for the electron microscopic study of the normal rat peripheral nerve. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **23**, 109—126 (1964).
- Wechsler, W., Hager, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der sekundären Wallerschen Degeneration des peripheren Säugetiernerven. *Beitr. path. Anat.* **126**, 352—380 (1962).
- Weiss, J. M.: Mitochondrial changes induced by potassium and sodium in the duodenal absorptive cell as studied with the electron microscope. *J. exp. Med.* **102**, 783—788 (1955).
- Yates, R. D., Yates, J. C.: The occurrence of intramitochondrial granules in nerve cells. *Z. Zellforsch.* **92**, 388—393 (1968).
- Yoneda, M., Kato, N., Okajama, M.: Competitive action of isonicotinic acid hydrazide and vitamin B₆ in formation of indole by *E. coli*. *Nature (Lond.)* **170**, 803 (1952).
- Zbinden, G., Studer, A.: Experimenteller Beitrag zur Frage der Isoniazid-Neuritis und ihre Beeinflussung durch Pyridoxin. *Z. Tuberk.* **107**, 97—107 (1955).
- Zelená, J., Lubińska, L., Gutmann, E.: Accumulation of organelles at the ends of interrupted axons. *Z. Zellforsch.* **91**, 200—219 (1968).
- Zeller, E. A., Barsky, J., Touts, J. R., Kirchheimer, W. F., van Orden, L. S.: Influence of isonicotinic acid hydrazide (INH) and l-isonicotinyl-2-isopropylhydrazide (IIH) on bacterial and mammalian enzymes. *Experientia (Basel)* **8**, 349—350 (1952).

Dr. J. M. Schröder
Frankfurt am Main/BRD
Deutschordenstr. 46