

Experimentelle Schädigungen von Nervensystem und Muskulatur durch Chlorochin: Modelle verschiedenartiger Speicherdistrophien*

Georg W. Klinghardt

Neuropathologische Abteilung des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung
und Neurologisches Institut (Edinger-Institut) der Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. W. Krücke)

Eingegangen am 8. Oktober 1973; Angenommen am 10. Dezember 1973

Experimental Lesions of the Nervous and Muscular Systems due to Chloroquine: Models of Various Storage Dystrophies

Summary. The neuronal storage dystrophy produced experimentally by chloroquine, contains models for quite a number of well known neurological storage diseases, almost all of which can be traced back to genetically determined defects of various lysosomal enzymes. Within the nervous system the neurones of the posterior root and trigeminal ganglia are predominantly affected in the experimental disease. Electronmicroscopically one finds unusually complex and regionally differing combinations of various types of storage bodies. In rats, the perikarya of posterior root and trigeminal nerve cells contained predominantly the concentrically layered type of membranous cytoplasmic bodies (MCBs) such as seen in infantile amaurotic idiocy. In rabbits, on the other hand, the majority of MCBs consisted of the “zebra body” type, as seen especially in gargoylism. Within the frequent axonal ballooning of these cells there are, in both species, additional small to very large accumulations of glycogen granules or particles usually surrounded by one or several membranes; in type II glycogenosis such glycogen deposits are also stored within neurones. Storage bodies with extensive curvilinear segments are found exclusively within the affected perikarya of neurones in the trigeminal ganglia of rats; they lay either massed together or scattered amongst the layered MCBs. Similar cytosomes are found in some forms of neuronal ceroid-lipofuscinosis.

Thin layer chromatography of lipid extracts showed an unequivocal increase of a substance with the R_F -value between ganglioside $G_{D_{1a}}$ and $G_{D_{1b}}$ in materials derived from spinal ganglia of four of our experimental rabbits. An increase of phospholipids within the storage areas of neurones of posterior root ganglia was, so far, only suggested by the histochemical test with acid hematein.

The number of cytoplasmic granules with intensive yellow fluorescence within the pyramidal cells of the cornu ammonis was considerably increased. However only a small proportion of these granules could be related to layered MCBs; moreover MCBs within this location often differed in origin from the type observed in nerve cells of the sensory ganglia. Likewise the axonal dystrophy of neurones within the central nervous system differed already under the light microscope from comparable changes in cells of the posterior root and trigeminal ganglia.

The vacuoles present in the “red myopathy” were due principally to a phospholipidosis. At the same time there was a selective evenly disseminated glycogenosis of the affected type I muscle fibres as seen in Pompe’s disease in all fibre types. In young rats there was relatively little degeneration of the type I muscle fibres, however these fibres showed a greatly increased activity of phosphorylase which even exceeded that found in the type II fibres. This may be a consequence of the glycogenosis.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

The distal chloroquine neuropathy was accentuated in those muscles which showed the greatest lesions. It consisted, in the main, of myelin breakdown which never reached the state of neutral fat. The myopathy was not neurogenic. In man its unusual localization and progression is likewise explained by the predominant affection of the red muscle fibres.

Almost all the histological changes noted within the nervous and muscular system could be explained through a molecular interaction between phospholipids and chloroquine due to the amphiphilic character of the drug and through the accumulation of the drug in lysosomes and an impairment in their digestive capacity.

Key words: Chloroquine — Myoneuropathy — Neuronal Storage Dystrophy — Glycogenosis — Ceroid-lipofuscinosis.

Einleitung

Die wesentlichen Nebenwirkungen der Therapie mit Chlorochindiphosphat¹ liegen auf neurologischem Gebiet. Von ihnen sind klinisch die Beteiligung von Muskulatur und Spinalnerven besonders eingehend untersucht und vielfach unter der Bezeichnung Neuromyopathie zusammengefaßt worden. Vom Menschen gibt es zur Histopathologie der Nebenwirkungen des Chlorochins am Nervensystem außer einem elektronenmikroskopischen Nervenbefund (Fardeau u. Godet-Guillain, 1970) keine Mitteilungen. Dagegen wurde die Myopathie vielfach bioptisch untersucht. Tierexperimentelle Untersuchungen haben deren eigenartiges Prädispositions-muster aufgedeckt und das Verständnis ihrer Pathogenese wesentlich gefördert (Smith u. O'Grady, 1968; Klinghardt, 1968; McDonald u. Engel, 1970). Die begleitende experimentelle Neuropathie zeigte ebenfalls Besonderheiten in ihrer Lokalisation und Feinstruktur (Klinghardt, 1968, 1970, 1971, 1972; Klinghardt u. Thomas, 1970). Veränderungen in Perikarya von Nervenzellen (Gleiser *et al.*, 1968) und extreme Axonballonierungen (Klinghardt u. Thomas, 1970) in Spinal- und Trigeminusganglien sprachen dafür, daß eine Speicher-dystrophie peripherer Neurone dabei im Spiele ist. Gleiser *et al.* wiesen bereits auf die elektronenmikroskopische Ähnlichkeit zwischen der „Lipodystrophie“ infolge Chlorochinintoxikation beim Schwein und entsprechenden Veränderungen bei manchen Neurolipidosen hin.

Fragestellungen

Die Fortsetzung unserer tierexperimentellen Untersuchungen mit Chlorochin galt der weiteren Aufklärung der licht- und elektronenmikroskopischen Natur der neuronalen Speicher-dystrophie an den Prädispositionsorten ihrer Manifestation. Die Ergebnisse warfen die Frage nach der histopathologischen, pathogenetischen und ätiologischen Vergleichbarkeit dieser experimentellen Nervenzellspeicherung mit Ganglienzellveränderungen bei verschiedenen natürlichen Speicherkrankheiten vor allem des Menschen auf. Wir befaßten uns ferner mit der weiteren histochemischen Charakterisierung der Chlorochinmyopathie sowie den Beziehungen zwischen der Myo- und der Neuropathie, die zur Erklärung der ungewöhnlichen Symptomatik der Chlorochinmyoneuropathie beim Menschen herangezogen wurden.

Material und Methode

Die Versuchsratten (Wistar-Stamm) waren spezifisch pathogenfreie Tiere (Lieferant: Dr. Hagemann, Bösingfeld/Lippe) mit Ausgangsgewichten zwischen 100 und 200 g. Nur bei

¹ Einige Markennamen der Droge sind: Resochin®, Aralen®, Nivaquine B®, Sanoquin®, Imagon®, Tresochin®, Silbesan®, Artrichin®, Bipiquin®, Reumachlor®, Avlochlor®, Bemathe®, Tanakan®, Résoquine®.

den Studien über enzymhистоchemische Veränderungen der Typ I-Muskelfasern betrug das Gewicht der Tiere bei Versuchsbeginn 40–50 g. Die ersten 30 histologisch untersuchten geschlechtsreifen Tiere hatten Chlorochindiphosphat in wäßriger Lösung mit der Magensonde erhalten. Wegen der sehr hohen Tagesdosen (375 und 250 mg/kg), mußten des öfteren applikationsfreie Tage eingeschoben werden. Bei den danach in Versuch genommenen 70 geschlechtsreifen Ratten und 10 Babyratten (s. o.) verabreichten wir die Droge kontinuierlich mit dem Futter vermischt (2,0 g der Substanz = 8 Tabletten Resochin® auf 1 kg des Alleinfutters Altromin® — s. Brock u. Wilk). Dazu wurde Wasser ad libitum gegeben. Bei den ausgewachsenen Tieren bedeutete dies eine tägliche Aufnahme von etwa 200 mg/kg. Auch diese geschlechtsreifen und die Babyratten blieben gegenüber Kontrollen im Wachstum und Gewicht zurück. Bei der kontinuierlichen Verabreichung der Droge mit dem Futter lag die Versuchsdauer der untersuchten Tiere zwischen 47 und 290 Tagen. Neuronale massive Speicherung war schon nach 6 Versuchswochen nachweisbar.

Die Kaninchenversuche wurden an 14 Tieren der Hermelin-Rasse (Lieferant: Stegmann/Seilauf) mit Ausgangsgewichten zwischen 900 und 1400 g durchgeführt. Sie erhielten die Droge in wäßriger Lösung mit der Magensonde. Wir gaben verschiedenen hohe Tagesdosen (100 oder 125 oder 165 mg/kg), bei demselben Tier aber in der Regel nur eine dieser Tagesdosen durchgehend. Freßunlust, Apathie und Gewichtsabnahme machten immer wieder Einschaltung applikationsfreier Tage nötig, so daß die Droge im Endeffekt nur jeden 2.–3. Tag verabreicht worden war. Bei den untersuchten Tieren lagen Höhe und Anzahl der Tagesdosen und die Versuchsdauer zwischen wenigstens 58 Tagesdosen zu 100 mg/kg innerhalb von 155 Tagen und höchstens 74 Tagesdosen zu 165 mg/kg innerhalb von 138 Tagen.

Die Ratten wurden mit Chloralhydrat i. p., die Kaninchen mit Evipan® i. v. unmittelbar am Ende der Intoxikationsperiode getötet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden ohne zusätzliche Fluorochromierung mit einem Fluoreszenzmikroskop der Carl Zeiss-Werke, Oberkochen, mit der Auflichtmethode durchgeführt (Lampe CS 200, Erregerfilter BG 12/3 mm mit Transmission zwischen 325 und 500 und Maximum bei 404,7 nm, Sperrfilter 50). Am aufschlußreichsten waren ungefärbte Kryostatschnitte. Ausreichende Resultate waren auch an Gefrier- und ungefärbten, nicht entparaffinierten Schnitten nach Formolfixation erhältlich und sogar noch nach Entparaffinierung und Einbettung in Isobutylmethacrylat, das nicht fluoresziert (Reichel *et al.*, 1968). Die Untersuchung in üblicher Weise mit Kresylviolett gefärbter und eingedeckter Paraffinschnitte war nur erfolgreich, wenn viel fluoreszierendes Material vorgelegen hatte. — Chlorochindiphosphat besitzt eine leuchtend gelbe Eigenfluoreszenz. Wegen einzuhaltender Kautelen bei der Annahme fluoreszierender Konzentrationen der Droge in verschiedenen Geweben s. später.

Spinalganglien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden bei den Kaninchen in Narkose (Evipan® i. v.) entnommen, mit 3,9%igem Glutaraldehyd 1 Std lang vorfixiert, 4 Std lang mit 2%iger Lösung von OsO₄ in 0,1 molarem Phosphatpuffer (Sørensen) nachfixiert und in Epon 812 eingebettet. Die 2 µ dicken Semidünnschnitte wurden an einem Reichert-Ultramikrotom angefertigt, mit p-Phenylendiamin gefärbt und im Phasenkontrast mikroskopiert. Die Ultradünnschnitte wurden mit Diamantmesser geschnitten, mit Bleicitrat kontrastiert (Venable u. Coggeshall, 1965) und mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop EM 9 S-2 photographiert. — Bei den Ratten wurden die Spinal- und Trigeminusganglien zumeist in Narkose (Chloralhydrat i. p.) entnommen und unmittelbar anschließend wie angegeben fixiert. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung des Pyramidenzellbandes des Ammonshornes wurden die Ratten vorher von der Aorta ascendens aus in der Narkose mit 3,9%igem Glutaraldehyd perfundiert.

Untersuchtes Rattenmaterial. Bei 76 Ratten wurden lichtmikroskopische Untersuchungen von Gefrier- und Paraffinschnitten nach Formolfixation durchgeführt. Die orientierenden Untersuchungen betrafen sehr verschiedene Regionen von Nervensystem und Muskulatur, die anschließenden systematischen in unterschiedlicher Häufigkeit die folgenden Abschnitte: Hinterfußsohle, N. tibialis am Fuß, desgleichen am Unterschenkel, desgleichen am Oberschenkel (einschließlich des übrigen Plexus), Cauda, lumbales und Halsmark mit Spinalganglien, Trigeminusganglien, M. tibialis anterior, M. gastrocnemius. — Folgende Färbungen wurden angewandt: Sudan III-Hämatoxylin, OTAN, Spielmeyer, Hämatoxylin-Eosin, Heidenhain-Woelcke, Bodian, PAS, Kresylviolett, Luxol-Echtblau, Turnbull.

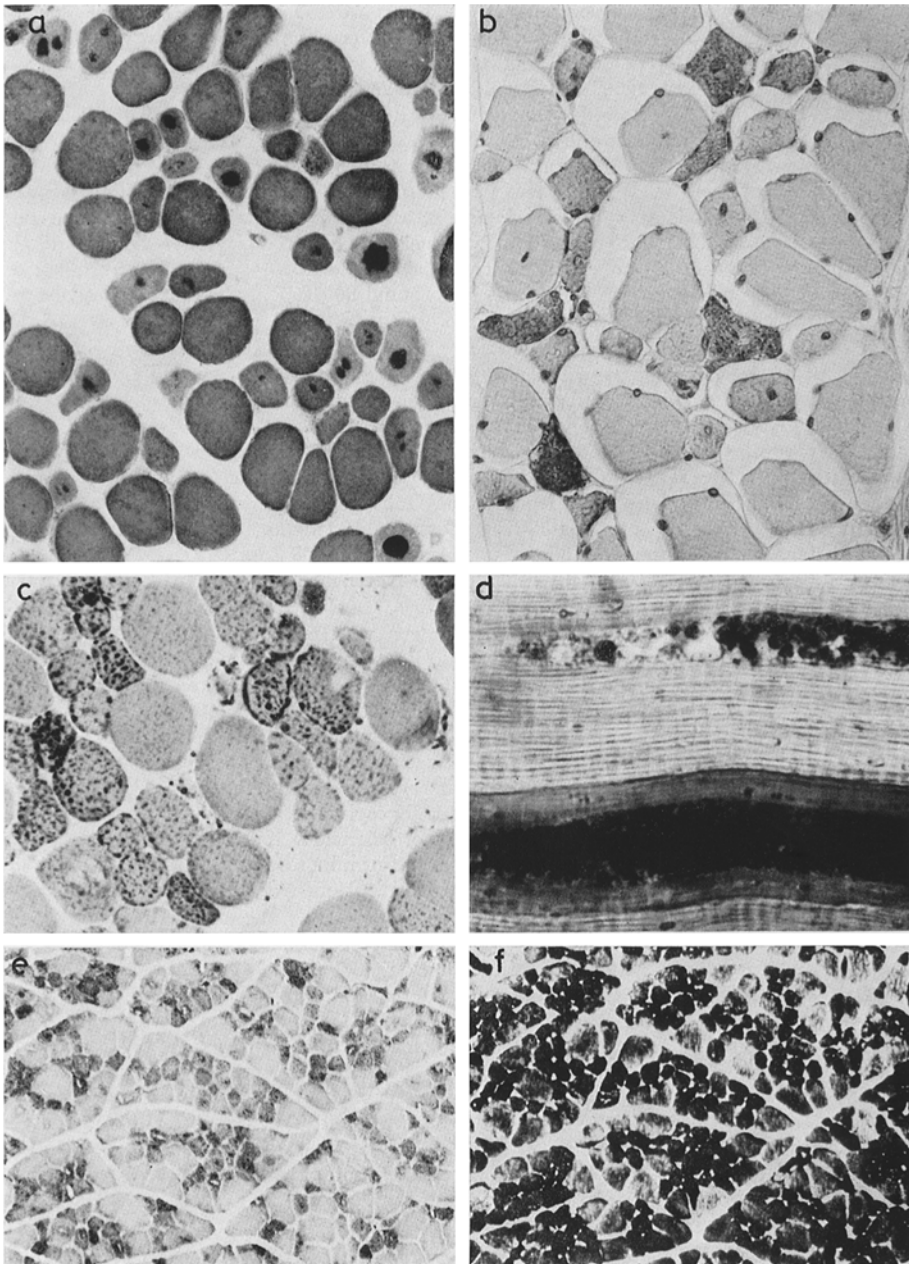


Abb.1. a Exp.-Nr.5077, Ratte, 158 Tage lang Chlorochin mit dem Futter; M.tibialis ant.; saurer Hämäteintest (Baker), $150\times$. In den kleinkalibrigen (Typ I)-Muskelfasern zumeist ein größeres oder einige kleinere Phospholipiddepots; die großkalibrigen Fasern lassen keine oder nur minimale Phospholipidablagerungen erkennen. b Exp.-Nr.5301, Ratte, 71 Tage lang Chlorochin mit dem Futter; Medialer Kopf des M.gastrocnemius, Glykogenfärbung (Best), $275\times$. In zahlreichen kleinkalibrigen Muskelfasern ziemlich gleichmäßig verstreut massenhaft Glykogengranula; die großkalibrigen (Typ II-)Muskelfasern sind davon völlig frei.

Der saure Hämäteintest (Baker) mit orientierenden Kontrollen nach Extraktion mit Pyridin wurde bei 10 Versuchs- und 3 Kontrolltieren durchgeführt und betraf vor allem den *M.tibialis anterior*, *M.gastrocnemius*, Zwerchfell, Herzmuskel, Spinal- und Trigeminusganglien.

Mit der Glykogenfärbung nach Best wurden bei 6 Versuchs- und 3 Kontrolltieren der *M.tibialis anterior*, *M.gastrocnemius* und das Zwerchfell untersucht.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Kryostatschnitten wurden bei 12 Versuchs- und einigen Kontrolltieren durchgeführt. Sie betrafen den *M.tibialis anterior*, *M.soleus*, Spinal- und Trigeminusganglien, Ammonshorn, Kleinhirnseitenlappen und Halsmarkquerschnitte. Außerdem wurden von zahlreichen Versuchstieren ungefärbte Paraffinschnitte aus verschiedenen Regionen des Nervensystems und der Muskulatur untersucht.

Zur histochemischen Differenzierung von Muskelfasertypen an Kryostatschnitten wurden der Phosphorylasenachweis nach Takeuchi und der Dehydrogenasenachweis nach Hess, Scarpelli und Pearse mittels MTT durchgeführt. Damit wurde bei 20 zu Versuchsbeginn geschlechtsreifen und bei 6 zu Versuchsbeginn 40–50 g schweren Ratten sowie einigen Kontrollbabyratten der *M.tibialis anterior* untersucht.

Von 12 Versuchsratten wurden 12 vorzugsweise cervicale und lumbosacrale Spinalganglien nach Eponeinbettung phasenkontrastmikroskopisch und 10 davon elektronenmikroskopisch untersucht. Die entsprechenden Zahlen für Trigeminusganglien sind: von 5 Tieren 5 bzw. 4 Ganglien, für das Pyramidenzellband des Ammonshorns: von 8 Tieren 8 bzw. 3 Blöcke.

Untersuchtes Kaninchenmaterial. Formolfixiertes Material aus denselben Regionen und mit denselben Färbungen wie bei den Ratten wurden von den 8 Kaninchen mit den längsten Intoxikationsperioden untersucht. Das Rückenmark wurde in wesentlich größerer Ausdehnung untersucht als bei den Ratten. Bei der Muskulatur lag das Schwergewicht der Untersuchungen auf dem Vergleich rein roter Muskeln (*M.semitendinosus*, *M.longissimus dorsi*) mit den benachbarten gemischten Muskeln. Der Baker-Test konnte nur orientierend durchgeführt werden (Zwerchfell, Spinalganglien, Leber). Für die Fluoreszenzmikroskopie stand nur formolfixiertes Material zur Verfügung. — Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschränkten sich auf 4 Spinalganglien von 4 Tieren (eines davon mit relativ kurzer Intoxikationsperiode — s. später) und einen Block mit Purkinje-Zellen.

Ergebnisse

I. Muskelbefunde bei Ratten

Im Zentrum des *M.tibialis anterior* liegen die drei histochemisch differenzierbaren Haupttypen von Skelettmuskelfasern sehr gleichmäßig verstreut. Hier waren bei allen 20 geschlechtsreifen Tieren Abschnitte mit elektiver oder dominierender Degeneration der Typ I-Muskelfasern zu finden. Im medialen Kopf des *M.gastrocnemius* kommen dagegen die Typ I- und Typ II-Muskelfasern abschnittsweise fast unvermischt vor. Hier zeigte sich — dem sehr unterschiedlichen Schädigungsbild benachbarter rein roter und gemischter Skelettmuskeln beim Kaninchen vergleichbar (Klinghardt, 1970) — der rote Abschnitt fast vollständig degeneriert und der „weiße“ weitgehend verschont. — Die folgenden bisher übersehenen Befunde unterstreichen diese Selektivität der Muskelfaserschädigung.

c Exp.-Nr.5079, Ratte, 147 Tage lang Chlorochin mit dem Futter; *M.tibialis ant.*, saurer Hämäteintest, 150×. Die klein- und mittelkalibrigen Muskelfasern enthalten wesentlich größere phospholipidhaltige Granula als die großkalibrigen. d Exp.-Nr.5397, Ratte, 110 Tage Chlorochin mit dem Futter. Lateraler Kopf des *M.gastrocnemius*, saurer Hämäteintest, 1000×. Stiftförmige Depots phospholipidreicher Massen in 2 Muskelfasern. e und f Exp.-Nr.4235, Babyratte, 167 Tage lang Chlorochin mit dem Futter (Ausgangsgewicht 40 g, Endgewicht 70 g!); *M.tibialis ant.*, benachbarte Kryostatschnitte, 250×. Die in Abb.2a dehydrogenasenreichen kleinkalibrigen Muskelfasern lassen in Abb.2b eine noch stärkere Aktivität der Phosphorylase erkennen, als die Typ II-Fasern. Keine Kernvermehrung in den Typ I-Fasern

Mit dem sauren Hämatest (Baker) waren zwei Schädigungsformen unterscheidbar. Bei der einen lagen in gemischten Skelettmuskeln zahlreiche kleine blauschwarze rundliche Einlagerungen über sämtliche Faserquerschnitte ziemlich gleichmäßig verstreut vor (Abb. 1c). Sie waren in kleinkalibrigen Fasern zahlreicher und größer als in den großkalibrigen und auf Längsschnitten oft in parallelen Längszeilen geordnet. Kleine Anhäufungen dieser Körnchen im Faserzentrum stellten den Übergang zum Schädigungsmuster vom „vakuoligen“ Typ dar. Bei ihm lagen in den Typ I-Fasern große phospholipidreiche Depots vor, die in den großkalibrigen Faserquerschnitten fehlten (Abb. 1a). Sie waren auf Längsschnitten oft stiftförmig (Abb. 1d). Das Verteilungsmuster dieser Phospholipidose entsprach also dem enzymhistochemisch festgestellten Prädilektionsmuster der Myopathie.

Die fluoreszenzmikroskopischen Befunde an Kryostatschnitten der Muskulatur entsprachen den granulären Veränderungen, die die Baker-Methode zeigte. Chlorochindiphosphat wird infolge seiner gelben Eigenfluoreszenz auch in Gewebsschnitten an den Stellen seiner Anreicherung mikroskopisch nachweisbar. Außerdem fluoreszieren die membranös geschichteten Körperchen bereits an sich leuchtend gelb. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung von Chlorochinschäden der Muskulatur spielen dagegen Störungen durch Lipofuscin nicht eine derartige Rolle wie im Zentralnervensystem.

Nur bei vereinzelt Muskelfasern wies das Sarkoplasma insgesamt auch eine geringe zusätzliche diffuse Gelbfluoreszenz auf. Auffallender als im Baker-Test waren die zwischen den Muskelfasern liegenden mit gelbleuchtenden Granula vollgepfropften Makrophagen.

Die fast elektive Schädigung der Typ I-Muskelfasern zeigte sich auch beim Glykogennachweis nach Best. Die degenerativ veränderten Fasern waren gleichmäßig von unzähligen rötlichen Granula übersät, die nicht den fluoreszenzoptisch bzw. beim sauren Hämatest erkennbaren entsprachen (Abb. 1b). Auch die universelle Schädigung rein roter Muskelanteile wurde hierbei deutlich. Neben der Phospholipidose liegt also eine Glykogenose der Typ I-Fasern vor.

Bemerkenswert war das enzymhistochemische Verhalten der roten Muskelfasern bei jungen Ratten (Gewicht bei Versuchsbeginn 40–50 g), denen wir längere Zeit Chlorochin mit dem Futter verabreicht hatten (vgl. auch Klinghardt u. Thomas, 1970). Die Tiere blieben im Wachstum zurück und entwickelten nur eine sehr schwächliche Muskulatur. Ihre Typ I-Muskelfasern zeigten trotz der langdauernden Intoxikation keine oder nur Initialstadien der Degeneration, die bei den geschlechtsreifen Tieren weit fortgeschritten zu sein pflegte. Außerdem wiesen die roten Fasern neben ihrer regelrechten hohen Dehydrogenaseaktivität eine sehr starke Phosphorylaseaktivität auf, die sogar noch höher als die der benachbarten Typ II-Muskelfasern war (Abb. 1e und 1f). Bei den ausgewachsenen Versuchstieren haben wir dieses enzymhistochemische Verhalten nie gesehen.

II. Muskelbefunde bei Kaninchen

Orientierende Untersuchungen mit dem sauren Hämatest ergaben auch bei Kaninchen einen hohen Phospholipidgehalt des Inhaltes der Muskelfaservacuolen. An der Bevorzugung der Typ I-Muskelfasern und an der primär myopathischen Natur ihrer Affektion war gleichfalls nicht zu zweifeln. Lichtmikro-

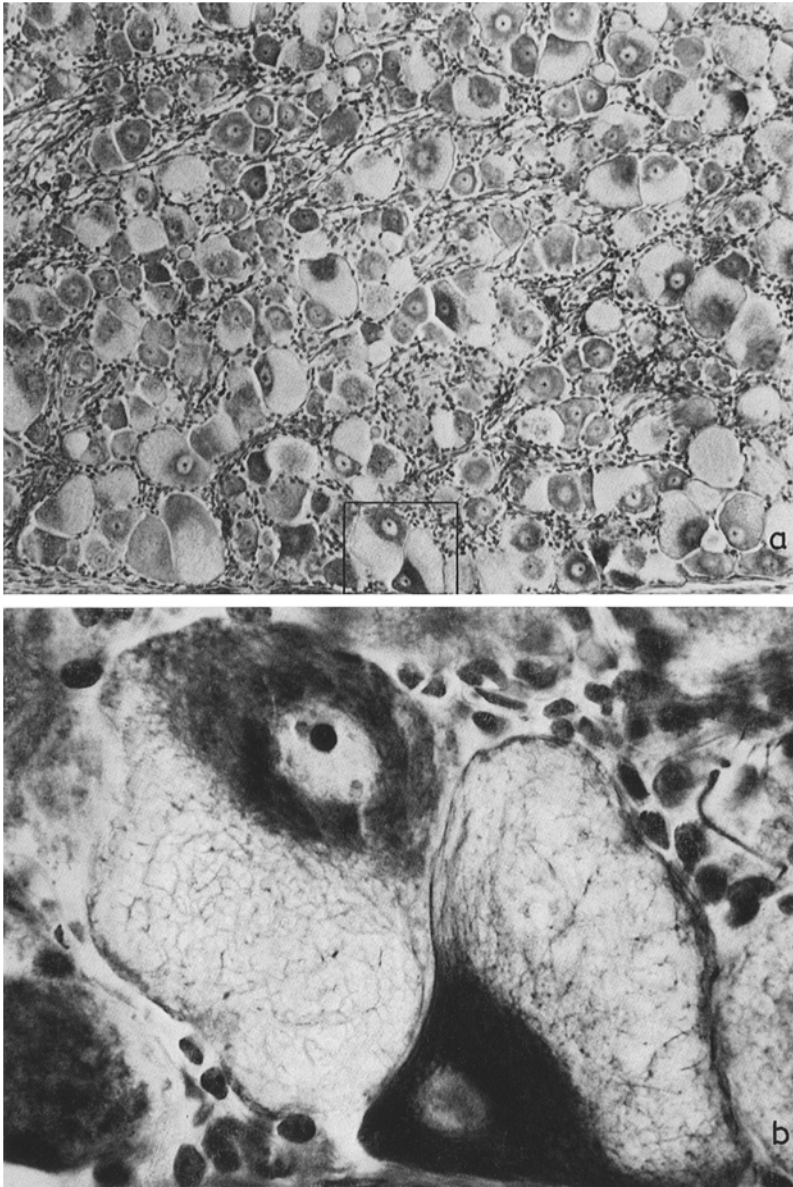


Abb.2. a und b Exp.-Nr.4500, Kaninchen. In 261 Versuchstagen 136mal 125 Chlorochin/kg/die. Lumbales Spinalganglion, Silberimprägnation nach Bodian. In a 120 \times , in b der eingerahmte Ausschnitt von a 800 \times . Sehr viele Nervenzellen zeigen eine Auftreibung ihres Perikaryons mit gemeinsamer Verlagerung von Kern und Nissl-Schollen zur Peripherie. Imprimierung einiger der Perikarya durch homogen erscheinende Axonaufreibungen. Bei der stärkeren Vergrößerung wird die wabige Struktur der Speicherareale der Perikarya bei Silberimprägnation deutlich

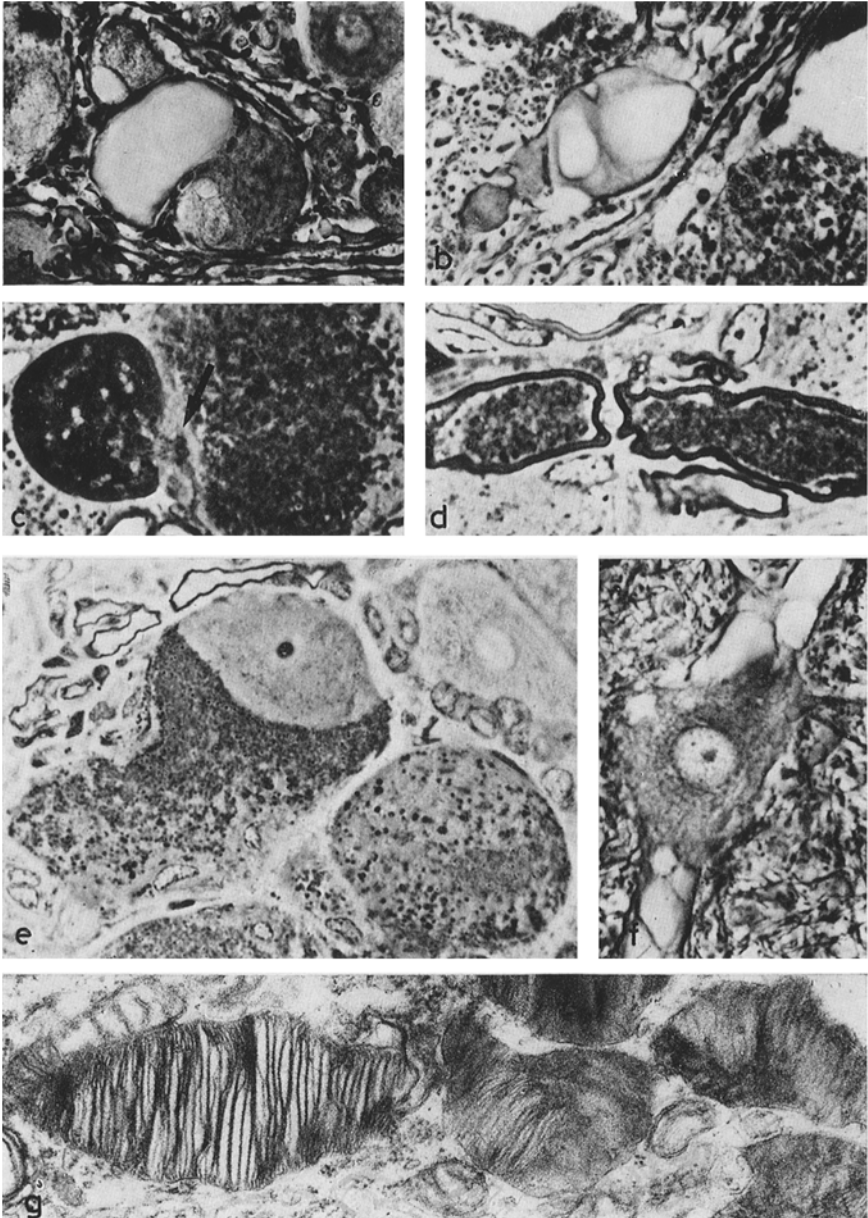


Abb. 3. a Exp.-Nr. 3019, Kaninchen, in 138 Tagen 74 mal 165 mg Chloroquin/kg/die. Sacrales Spinalganglion, Bodian-Imprägnation, $750\times$. Imprimierung des Perikaryons einer Nervenzelle durch eine Axonballonierung, deren Inhalt homogen dargestellt ist. b Exp.-Nr. 4498, Kaninchen, in 171 Tagen 105 mal 100 mg Chloroquin/kg/die. Lumbale hintere Rückenmarkswurzel, Silberimprägnation nach Bodian, $225\times$. Starke Ballonierung eines eintretenden Axons im Rückenmark. c Exp.-Nr. 5665, Ratte, 106 Tage Chloroquin mit dem Futter. Cervicales Spinalganglion, p-Phenylendiamin, $1250\times$ im Phasenkontrast, Nachvergrößerung $2\times$. Unzählige Granula im Perikaryon einer Ganglienzelle (re.) und in ihrem ballonierten Axon (li.) sowie dem dünnen Verbindungsstück dazwischen (Pfeil). d Exp.-Nr. 4497, Kaninchen, in

skopische Spinalnervenveränderungen fanden sich nur bei bereits weit fortgeschrittener Myopathie.

III. Befunde an Spinalnerven, Spinal- und Trigeminalganglien bei Ratten

Nicht selten war schon nach wenigen Versuchstagen makroskopisch über dem caudalen Rückenmark, den lumbosacralen Spinalwurzeln und Spinalganglien der Versuchstiere eine Randzonensiderose deutlich.

Bei den Ratten stand die nucleodistale Akzentuation der Schädigung langer Spinalnerven im Vordergrund. An der Sohle lag mitunter Markscheidenzerfall über längere Strecken vor, der nicht als Druckschaden zu deuten war (Untersuchung von Kontrolltieren). Vielfach bestanden an präterminalen Abschnitten neben kontinuierlichem Myelinzerfall auch perlschnurartige Kaliberschwankungen der Axone. Die Nervenstämme an den Unter- und Oberschenkeln dagegen waren unauffällig. Im Gegensatz dazu stand der in Spinal- und Trigeminalganglien vielfach kontinuierliche ballenförmige Markscheidenzerfall fast aller Fasern, der auch hier nie bis zum Neutralfettstadium des Abbaues ging. Die Perikarya und Axone vieler Nervenzellen wiesen hier dieselbe granuläre Speicherungs dystrophie auf (Abb. 5c und 3c), die bei den Kaninchen noch ausführlich beschrieben wird. Dies gilt auch für den hohen Phospholipidgehalt der Speicherareale der Perikarya im Baker-Test (Abb. 5a) und für die besonders starke Speicherung mancher Nervenzellen nahe der Ganglienkapsel (Abb. 5c).

Elektronenmikroskopisch lagen in den Perikarya aller dieser Nervenzellen reichlich bis massenhaft pathologische, in erster Linie membranöse geschichtete Cytosomen (MCBs = membranous cytoplasmic bodies) vor, die oft eine Einheitsmembran erkennen ließen. Innerhalb eines Perikaryons war diese Cytosomenpopulation meist recht gleichförmig, zwischen benachbarten Perikarya mitunter jedoch recht different. Bei den Ratten überwogen die konzentrisch geschichteten membranösen Körperchen die Cytosomen mit planparalleler Schichtung stets bei weitem (Abb. 4). Beide Formationstypen kamen auch im selben Granulum gemeinsam vor und wiesen mitunter kontinuierliche Übergänge zwischen ihren Membransystemen auf.

Eindrucksvoll waren in manchen Perikarya wie in Reinkultur vorliegende, ziemlich gleichgroße, rundliche und aus besonders dicht stehenden konzentrisch geordneten Lamellen aufgebaute Cytosomen (Abb. 5d), die ebenfalls mitunter eine einfache umhüllende Membran erkennen ließen. Bei stärkerer Vergrößerung ergab

252 Versuchstagen 134 Tagesdosen Chlorochin zu 100 mg/kg. Ganglion Gasseri, p-Phenylendiamin, 1150 \times , im Phasenkontrast. Wurstförmige Axonaufreibung durch Massen von Granula. e Tier der Abb. 3d, Ganglion Gasseri, p-Phenylendiamin, 560 \times im Phasenkontrast. Starke granuläre Speicherung besonders im Perikaryon der einen Ganglienzelle mit gemeinsamer Verlagerung von Kern und Nissl-Substanz zur Peripherie. Unterschiedliche Größe der Speichergranula, die sich ferner in Mantelzellen finden. f Kaninchen der Abb. 3a. Lumbalmark, motorische Vorderhornzelle, Silberimprägnation nach Bodian, 1150 \times . Wabige Fortsatzdystrophie. g Kaninchen der Abb. 3d, lumbales Spinalganglion, 33000 \times . Transversal zur Längsachse annähernd planparallele Schichtung der Membranen der Speicherkörperchen, die eine umgebende Einheitsmembran erkennen lassen. Stellenweise ist eine Periodik dickerer und dünnerer dichter Linien angedeutet. In den Cytosomen mit stärkerer Aufsplitterung der Lamellierung kommen auch feingranuliert erscheinende Abschnitte vor

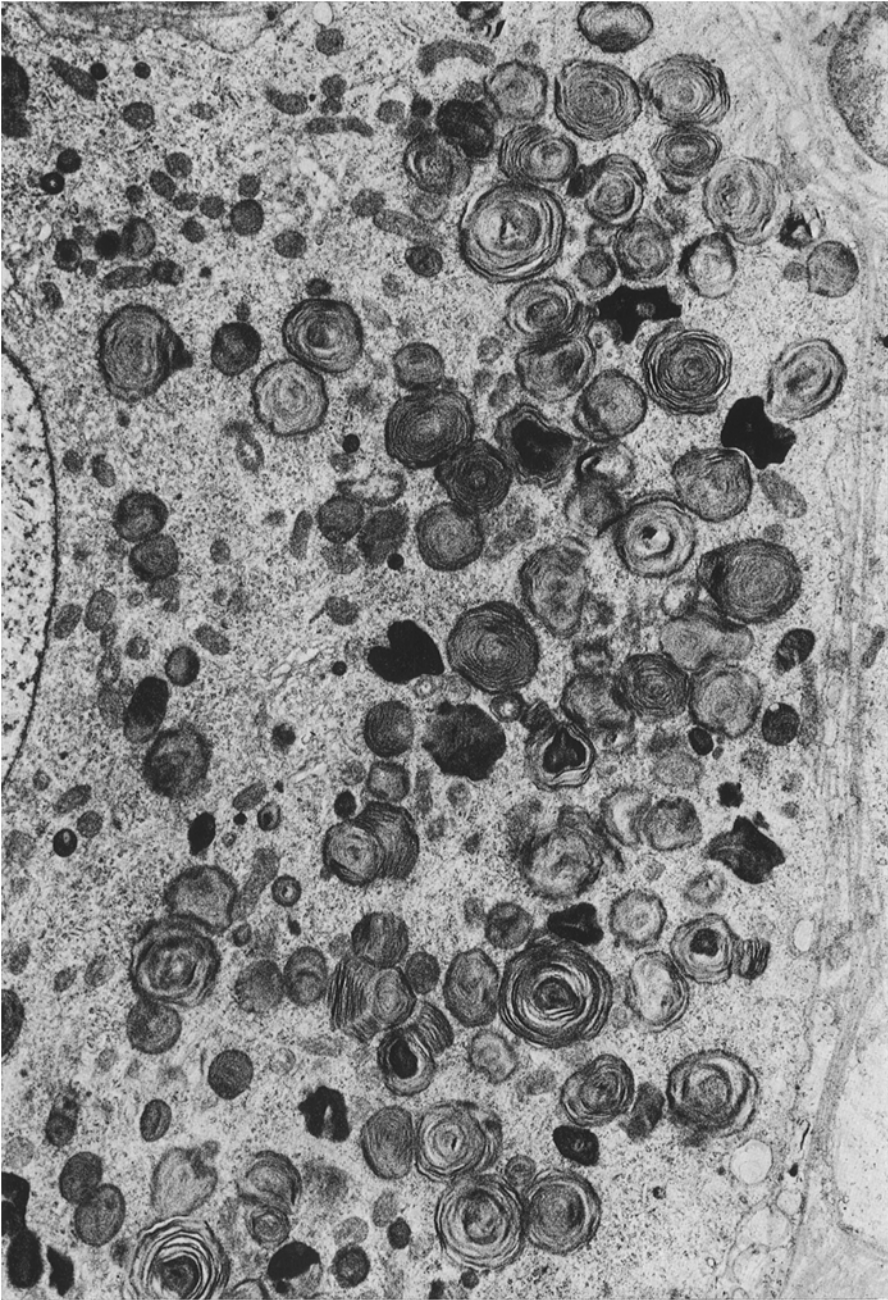


Abb. 4. Exp.-Nr. 5393, Ratte, 141 Tage Chlorochin mit dem Futter, cervicales Spinalganglion, 6650 \times . Im Perikaryon einer Ganglienzelle zahlreiche annähernd konzentrisch geschichtete membranöse Cytosomen unterschiedlicher Größe, teilweise mit kompakterem Zentrum. In der unteren Hälfte des Bildes haben einige der MCBs auch Abschnitte mit Schichtung nach dem Zebra-Typ. Einzelne lipofuscinähnliche Granula

sich in ihren kompakten Abschnitten ein Alternieren dickerer und dünnerer dichter Linien nach dem Muster der „intra-periodic“ und „major dense line“ regulärer Markscheiden (Abb. 6f). In ihren aufgesplitterten Arealen lagen oft viele Paare zweier dünnerer dichter Linien mit breiterem Abstand zu den Nachbarpaaren vor (Abb. 5f). Dieser Befund läßt sich auf eine Aufsplitterung der dickeren dichten Linie — wie auch bei Morbus Tay-Sachs beobachtet (Terry, 1970) — zurückführen. Auch bei Membranabfaltungen von der inneren Markscheidenlamelle in den Axonraum war wiederholt deren Absplitterung aus der „major dense line“ deutlich.

Das elektronenmikroskopische Bild der Speicherung in den zahlreichen Axonballonierungen innerhalb der Spinalganglien (Abb. 6a) wich von dem in den Perikarya deutlich ab. Nur hier — wie auch bei den Kaninchen — waren zwischen den membranösen geschichteten Cytosomen (aber wesentlich seltener als diese) von einer einfachen oder doppelten, gelegentlich sogar angedeutet mehrschichtigen Membran umhüllte sehr unterschiedlich große kompakte Anhäufungen von Glykogenpartikeln zu sehen (Abb. 6b und 6c). Seltener waren dichte oder auseinandergezogene Ansammlungen von Glykogengranula ohne umhüllende Membran, die ebenfalls beträchtliche Ausmaße aufweisen konnten. Die membranösen geschichteten Cytosomen wichen von jenen in den Perikarya insofern ab, als ihre große Masse wesentlich kleiner und ihre Schichtung stärker aufgelockert und ungeordneter war.

Einen weiteren relativ seltenen auffälligen Typ von Speichergranula haben wir bisher nur in Perikarya von Trigeminalganglien der Versuchsratten gesehen. Diese Cytosomen wiesen ausgedehnte curvilineare und spärliche geschichtete membranöse Abschnitte auf. Sie lagen teils zwischen den Speicherkörperchen mit reiner membranöser Schichtung verstreut (Abb. 7a), teils in manchen Arealen der Perikarya unvermischt (Abb. 7b). Mitunter war auch bei ihnen eine begrenzende Einheitsmembran feststellbar.

IV. Befunde an Spinalnerven, Spinal- und Trigeminalganglien bei Kaninchen

Die schwersten Nervenschädigungen bestanden an den Ästen innerhalb der Muskeln mit der schwersten Myopathie, also innerhalb der rein roten (die bei Ratten nicht vorkommen). Hier lag mitunter an sämtlichen Fasern ein kontinuierlicher, ungewöhnlich feinkörniger Markscheidenzerfall vor. Eine distale Akzentuation des Myelinzerfalls mit Andeutung perlschnurartiger Kaliberschwankungen und reichlich Sprossungen von Axonen waren in gemischten, besonders in äußeren Augenmuskeln deutlich. Das Neutralfettstadium des Myelinabbaues war auch bei den Kaninchen nirgends nachweisbar.

Auch hier kontrastierten gegenüber den ungeschädigten proximalen Nervenabschnitten die schweren Veränderungen in den Spinal- und Trigeminalganglien. Mitunter waren nur spärliche Markscheidenreste nachweisbar. Die ebenfalls zahlreichen extremen Axonballonierungen imprimierten nicht selten benachbarte Perikarya (Abb. 3a). Sie kamen auch in hinteren Wurzeln und in deren Fortsetzungen im Rückenmark (Abb. 3b) vor.

Die granuläre Form des Speichermaterials war in Semidünnschnitten besonders eindrucksvoll (Abb. 3d und 3e). Fortgeschrittene Speicherung hatte Auf-

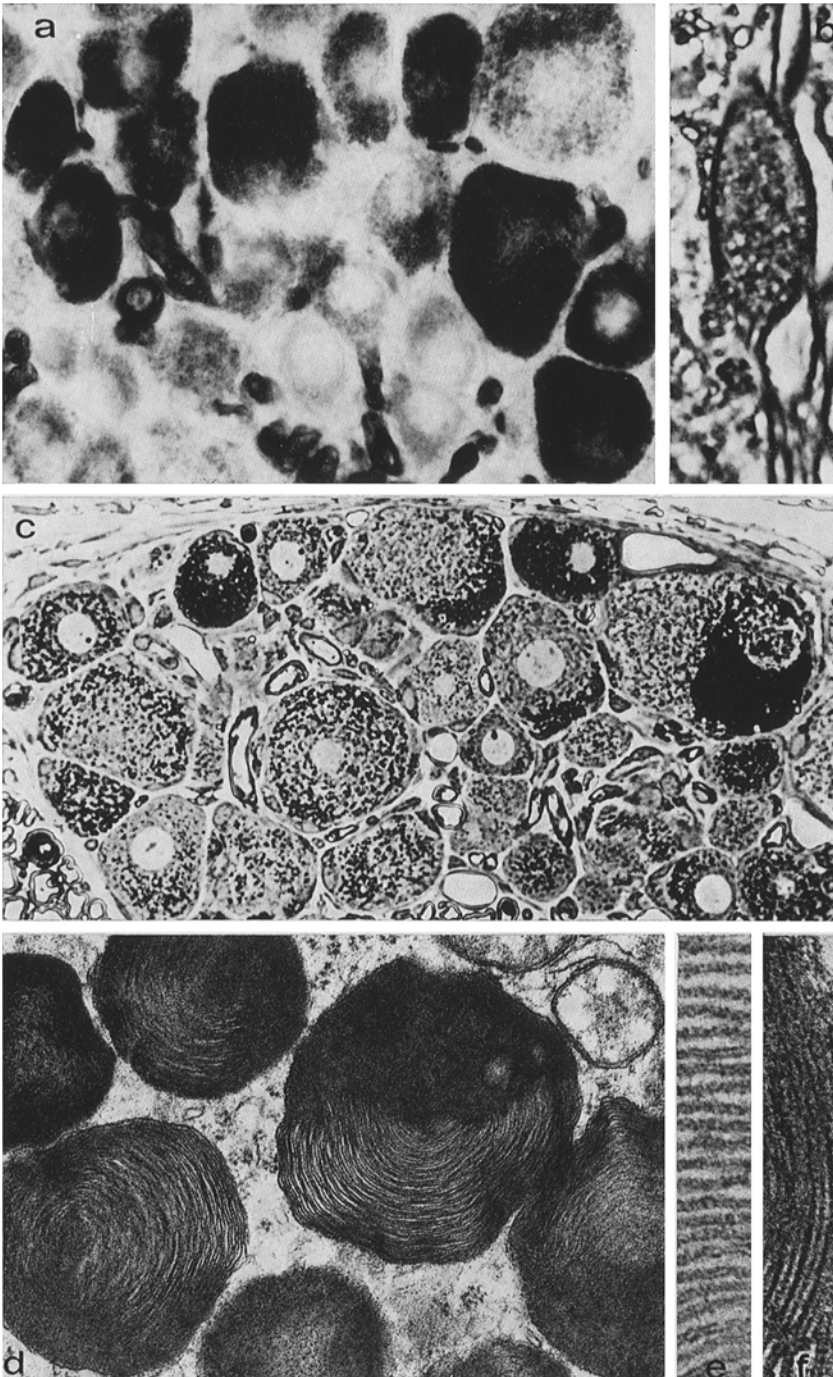


Abb. 5. a Exp.-Nr. 5079. Ratte, 147 Tage lang Chlorochin mit dem Futter. Cervicales Spinalganglion, saurer Hämatest, $500\times$. Vor allem die stärker aufgetriebenen Perikarya einiger Nervenzellen sind von dichten Massen blauschwarzer Granula angefüllt. b Exp.-Nr. 4698,

treibung der Perikarya zahlreicher Nervenzellen (Abb. 2a und 3e) und eine wabige Struktur der Speicherungsbezirke im Bodianbild (Abb. 2b) zur Folge. — Im Gegensatz zu den Ratten überwogen bei den Kaninchen in den Spinal- und Trigeminusganglienzellen die planparallel geschichteten membranösen Cytosomen die konzentrisch geschichteten bei weitem (Abb. 3g). Dieser Unterschied war schon in den Anfangsstadien der Speicherung ersichtlich (z. B. nach 9 Applikationen binnen 18 Tagen). An den planparallel geschichteten Cytosomen war eine einfache membranöse Umhüllung oft besonders deutlich. Auch bei den Kaninchen fanden sich die von einer Einheitsmembran umgebenen mitunter aber auch freien, teilweise recht beträchtlichen Massierungen von Glykogenpartikeln und Glykogengranula nur in den Axonballonierungen.

V. Lipidchemische Befunde bei Kaninchen

Eine Ergänzung zu den morphologischen Nervenzellbefunden in den Spinal- und Trigeminusganglien verdanken wir lipidchemischen Untersuchungen von Jatzkewitz (1972) und Sandhoff (1974). Sie haben bei drei Kontroll- und vier langdauernd mit Chlorochin behandelten Kaninchen unserer Inzucht Lipidextrakte von Leber, Milz und Spinalganglien mittels Dünnschichtchromatographie (Adsorbens: Kieselgel G; Laufmittel: Chloroform-Methanol-0,3% CaCl_2 -konzentrierte Ammoniaklösung wie 60:35:35:1,5 v/v) vergleichend analysiert. Im Spinalganglienmaterial der Versuchstiere (die dort auch mikroskopisch eine massive Speicherungs dystrophie aufwiesen) fand sich eine noch nicht identifizierte Substanz mit einem R_F -Wert zwischen dem der Ganglioside G_{D1a} und G_{D1b} (Nomenklatur von Svennerholm, 1963) angehäuft. Sie zeigte nach Reaktion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz eine andere Färbung als Ganglioside.

VI. Befunde am Zentralnervensystem

Die lichtmikroskopischen Veränderungen in den Perikarya zentralnervöser Nervenzellen waren bei beiden Species graduell wesentlich geringer als in den Nervenzellen der untersuchten sensiblen Ganglien. Dies wurde beim Vergleich von Spinalganglien und Rückenmark im gleichen Schnittpräparat bei den Kanin-

Ratte, 245 Tage lang Chlorochin mit dem Futter. Querschnitt vom oberen Halsmark, Semidünnschnitt, p-Phenylendiamin, im Phasenkontrast $1150\times$. Durch unzählige Granula ballonierter Fortsatz einer Spinalganglienzelle. c Exp.-Nr. 4710, Ratte 262 Tage lang Chlorochin mit dem Futter. Lumbales Spinalganglion, Semidünnschnitt, p-Phenylendiamin, im Phasenkontrast $400\times$. Sämtliche Nervenzellperikarya weisen massenhaft Speichergranula auf, am stärksten einige unter der bindegewebigen Kapsel des Ganglions. d–f Exp.-Nr. 5089, Ratte, 195 Tage lang Chlorochin mit dem Futter. Cervicales Spinalganglion. In d $33000\times$, in e und f $210000\times$. In d im Perikaryon einer Ganglienzelle besonders regelmäßig konzentrisch geschichtete membranöse Körperchen, von denen das links unten abschnittsweise eine äußere begrenzende Umhüllung erkennen läßt. — Bei stärkerer Vergrößerung stellen sich in den aufgelockerten Abschnitten der membranösen Körper (wie in e) viele Paare dünnerer dichter Linien dar, während in den kompakten Abschnitten (wie in f) dickere und dünnere dichte Linien alternieren

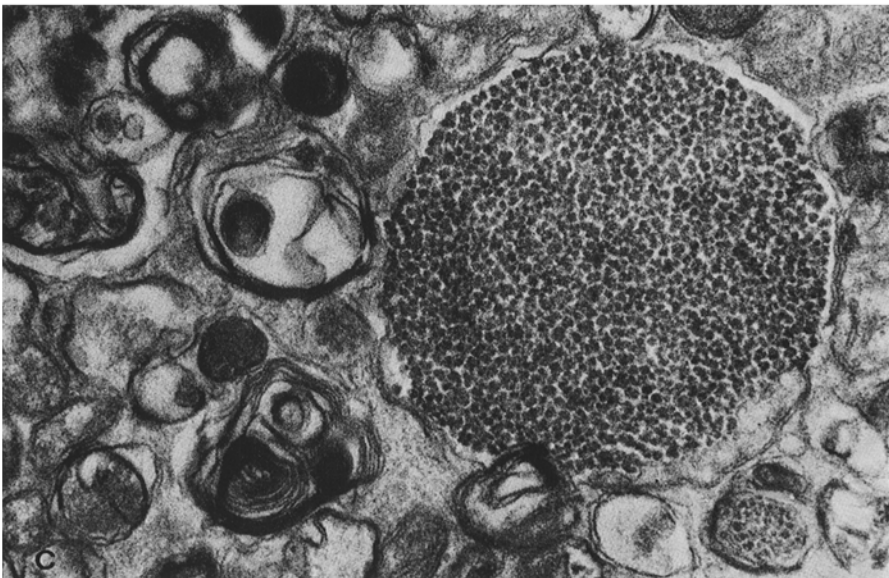
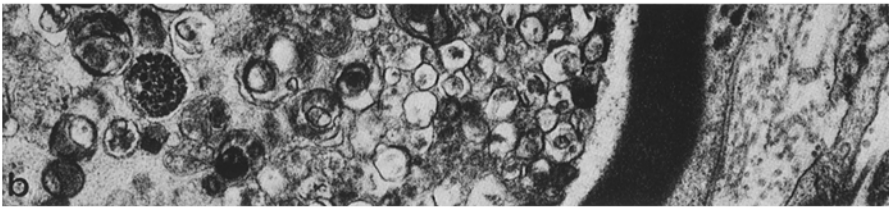
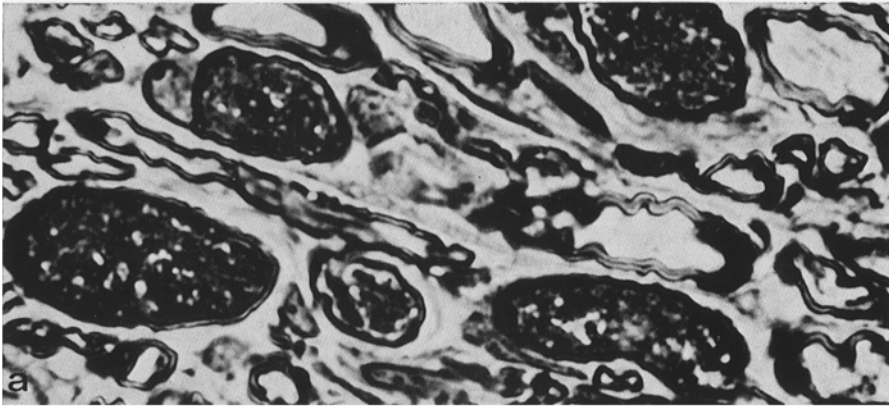


Abb. 6. a Exp.-Nr. 5089, Ratte, 166 Tage lang Chlorochin mit dem Futter. Cervicales Spinalganglion, p-Phenylendiamin, $720\times$ im Phasenkontrast. Ballonierungen mehrerer Axone durch Unmassen von Granula. b und c Ausschnitte von einer Axonballonierung aus dem Spinalganglion der Abb. 6a; in b $6600\times$, in c $33000\times$. In b ist die umgebende Myelinscheide mit dargestellt. In c zwischen den stärker aufgelockerten, konzentrisch geschichteten, verschiedenartig vereinigten membranösen Cytosomen eine sehr große (wie auch in b zu sehen) und eine kleinere (neben weiteren angedeuteten) Anhäufung von Glykogenpartikeln mit Umhüllung durch Membranen. In einigen Membranhüllen liegt sehr feingranuliertes Material, das auch frei zwischen den Cytosomen zu sehen ist

chen besonders deutlich. Selbst bei massiver Auftreibung vieler Nervenzellperikarya im Spinalganglion zeigten höchstens vereinzelte motorische Vorderhornzellen desselben Segments größere von Nissl-Schollen freie Areale, aber nie Kernverlagerungen oder eine wabige Struktur des Perikaryons im Bodianbild. Stärkere Axonaufreibungen ließen sich im Rückenmark regelmäßig auf Fortsätze von Spinalganglienzellen beziehen (Abb. 5b). Nur nach sehr langer Versuchsdauer haben wir gelegentlich auch an zentralnervösen Neuronen bei Kaninchen perikaryonaher Fortsatzdystrophie gesehen. Sie bestand in einer auffallenden wabigen Strukturierung bei der Silberimprägnation (Abb. 3f), wie wir sie in den sensiblen Ganglien nie gesehen haben. Ein ebenfalls nur beim Kaninchen nach sehr langer Intoxikation erhobener Befund waren in den cervicalen medialen Hintersträngen gelegene Axonfragmentationen und eigentümliche verklumpte argentophile Ballen im Axonlager.

Die Deutung der erheblichen fluoreszenzmikroskopischen Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren im Zentralnervensystem ist nur mit Vorbehalt möglich. Sowohl Lipofuscingranula wie die membranös geschichteten cytoplasmatischen Körperchen an sich (vgl. Abb. 8c von einem Kind mit amaurotischer Idiotie) weisen eine intensiv gelbe Eigenfluoreszenz auf. Eine durch Chlorochin bedingte — und evtl. zusätzliche — gelbe Fluoreszenz ist hiervon nicht abgrenzbar. Chlorochin wird auch nicht nur in Lysosomen gebunden. Die fluoreszenzmikroskopischen Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren erlauben jedoch eine eindrucksvolle Orientierung über bevorzugte Wirkungsorte des Chlorochins im Zentralnervensystem. Abb. 8a gibt eine — wie die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, weit überwiegend auf membranöse geschichtete Körperchen zu beziehende — Fluoreszenz in Speicherarealen von Trigeminalganglienzellen wieder. Die Vermehrung der fluoreszierenden Granula in den motorischen Vorderhornzellen war demgegenüber stets geringer (Abb. 8d), aber immer noch sehr deutlich. Von Kontrolltieren ließen sich aus diesen Regionen überhaupt keine fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen anfertigen. Die pathologisch verstärkte granuläre Fluoreszenz war auch in den Perikarya der Pyramidenzellen des Ammonshorns beträchtlich (Abb. 8e) und felderförmig verschieden. Dagegen war sie in den Purkinje-Zellen wieder nur mäßig verstärkt. — Nach längerer Intoxikationsperiode ist in sämtlichen Ganglienzellen des ZNS und vor allem auch in Astrocyten vermehrte granuläre Gelbfluoreszenz zu finden. Vereinzelte Pyramidenzellen der Großhirnrinde fielen außerdem durch eine intensive, diffuse Gelbfluoreszenz der Konturen ihres Perikaryons auf (Abb. 8b).

Unsere bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen am ZNS betreffen das Pyramidenzellband des Ammonshorns bei Ratten. Hier fanden sich nur vereinzelte, besonders große und von den bisher beschriebenen Formen abweichende konzentrisch geschichtete membranöse Körperchen in den Perikarya von Ganglienzellen (Abb. 8g), wie sie auch nach prolongierter Hypoxie gesehen wurden (Yu *et al.*, 1972). Dagegen fielen in diesen Pyramidenzellen reichlich lipofuscinähnliche Granula auf. — Weitere Untersuchungen müßten zu klären suchen, ob die fluoreszenzmikroskopischen Ganglienzellbefunde im ZNS generell auf einer Vermehrung letzterer oder morphologisch ähnlicher Cytosomen beruhen und somit anders als in den untersuchten sensiblen Ganglien zu erklären sind.

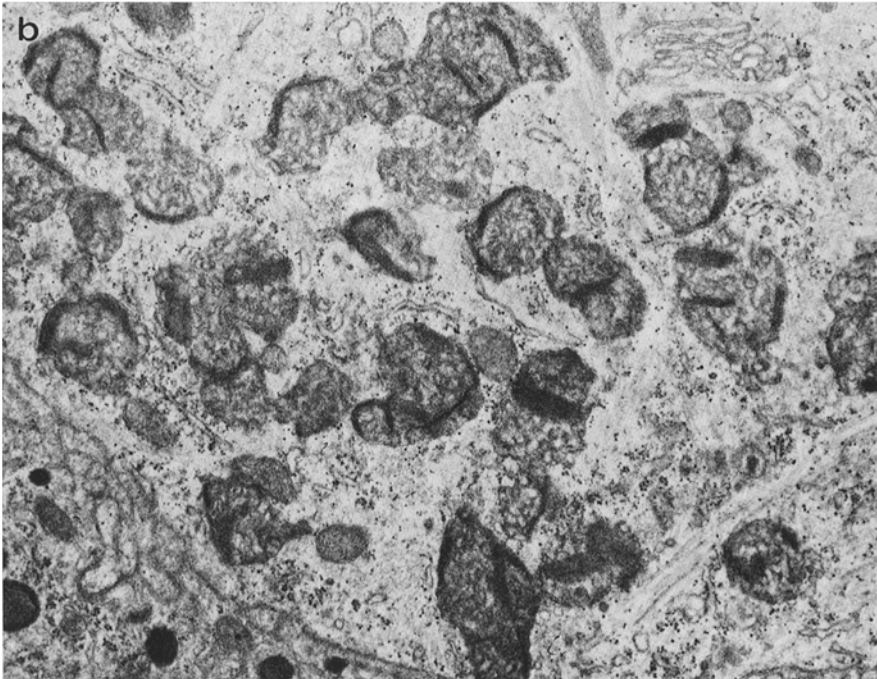
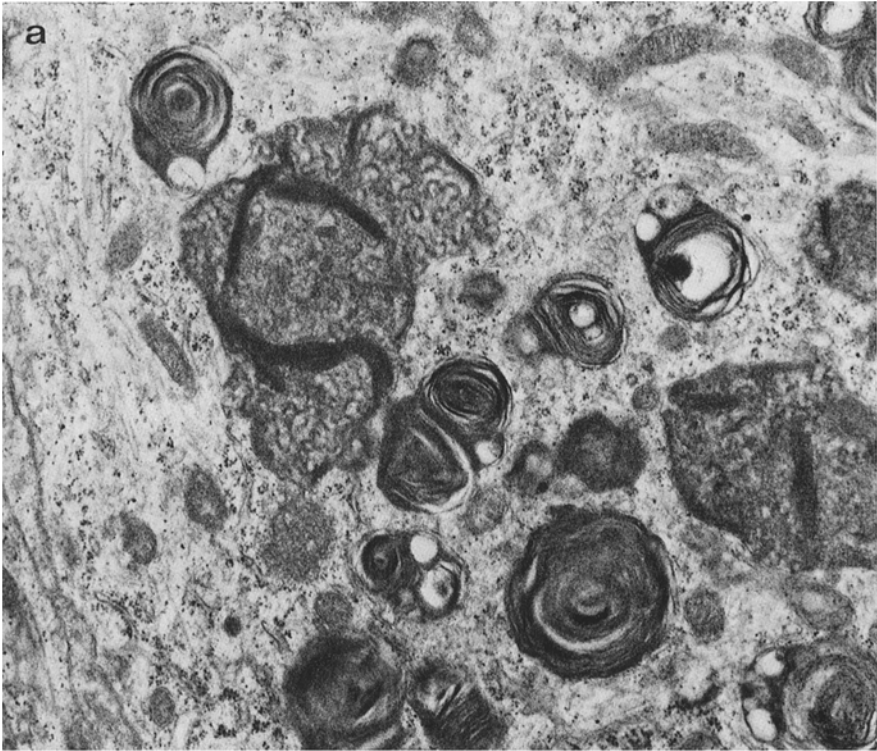


Abb. 7

Diskussion

Unter den vorliegenden experimentellen neuropathologischen Befunden legt die in Spinal- und Trigeminusganglien beobachtete Speicherdystrophie der Ganglienzellen Vergleiche mit einigen natürlichen neurologischen Krankheitsbildern nahe. In den Perikarya und Axonballonierungen bestand eine ungewöhnlich komplexe und regional unterschiedliche Kombination verschiedener Typen von Speicherkörperchen. Eine geringere Vielfältigkeit derartiger Cytosomen ist bei verschiedenen bekannten Speicherkrankheiten als kennzeichnender Befund geläufig. Diese vergleichbaren natürlichen Krankheiten enthalten jeweils nur Ausschnitte des experimentellen Speicherbildes. Sie beruhen teilweise auf angeborenen Defekten einzelner lysosomaler Enzyme (wie die G_{M1} - und G_{M2} -Gangliosidose oder die Glykogenose Pompe), teilweise werden lysosomale Enzymdefekte als ihre direkte oder indirekte Ursache diskutiert (wie bei manchen Formen neuronaler Ceroid-Lipofuscinose).

Für das Vorliegen einer *Neurolipidose* sprachen die lichtmikroskopischen Aufreibungen vieler Nervenzellperikarya und Axone in Spinal- und Trigeminusganglien durch Massen von Granula und deren färberisches Verhalten. Elektronenmikroskopisch entsprach dem die zumeist einfache oder periodische, entweder konzentrische (wie besonders bei der infantilen amaurotischen Idiotie bekannt) oder planparallele (wie vor allem vom Gargoylismus geläufig) membranöse Schichtung sowie die nicht selten deutliche Umhüllung dieser Cytosomen durch eine einzelne Membran. Die definitive biochemische Identifizierung der im Spinalganglienmaterial unserer Versuchskaninchen mittels Dünnschichtchromatographie (Jatzkewitz, 1972; Sandhoff, 1974) angehäuft nachgewiesenen Substanz mit einem R_F -Wert zwischen dem der Ganglioside G_{D1a} und G_{D1b} steht noch aus. Ob und wie weit die biochemischen Ursachen der Speicherdystrophien infolge Chlorochin mit jenen der vier aus der Pathologie geläufigen Gangliosidoseformen (s. Jatzkewitz, 1970; Sandhoff *et al.*, 1969) oder anderen durch Defekt eines lysosomalen Enzyms bedingten Erkrankungen nicht nur oberflächliche Gemeinsamkeiten haben, bedarf ebenfalls weiterer Klärung.

Sehr viel seltener als die konzentrisch oder planparallel geschichteten membranösen Körperchen haben wir zwei weitere elektronenmikroskopisch besonders auffällige Formen von neuronalem Speichermaterial gefunden. — Die eine davon sahen wir bisher nur in Nervenzellperikarya in Trigeminusganglien von Ratten. Diese hier mitunter wie in einer Reinkultur massierten oder zwischen den membranös geschichteten Körperchen verstreuten Gebilde mit ausgedehnten curvilinearen und spärlichen membranös geschichteten Anteilen erinnern an das Speichermaterial bei manchen Formen *neuronaler Ceroid-Lipofuscinose*.

Abb. 7. a und b. Exp.-Nr. 5393, Ratte, 141 Tage Chlorochin mit dem Futter. Ganglion Gasseri, in a 18500, in b 17500. In a im Perikaryon einer Ganglienzelle zwischen überwiegend konzentrisch geschichteten membranösen Cytosomen größere Körperchen mit ausgedehnten Abschnitten, die Lipopigmentkörpern vom curvilinearen Typ ähnlich sehen und spärlicheren Abschnitten mit membranöser Schichtung. In b liegen etwas kleinere derartige Cytosomen im Perikaryon einer anderen Nervenzelle abschnittsweise unvermischt zusammen. Sie lassen stellenweise eine äußere begrenzende Membran erkennen

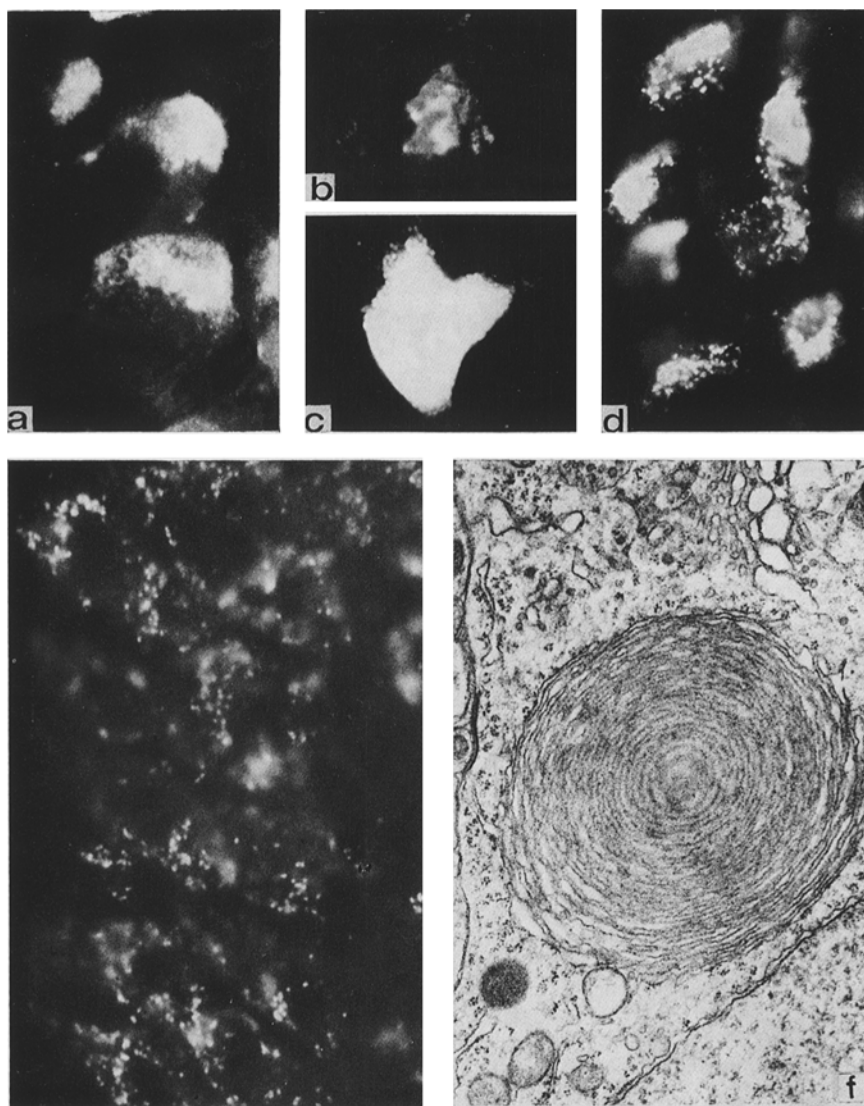


Abb. 8a—e. Kryostatschnitte, Auflichtfluoreszenz, keine zusätzliche Fluorochromierung. a Exp.-Nr. 4881, Ratte, 112 Tage Chlorochin mit dem Futter. Ganglion Gasseri, 1200 \times . In den Perikarya der Ganglienzellen exzentrisch Anhäufungen intensiv gelbleuchtender Speichergranula. b Exp.-Nr. 4700, Ratte 293 Tage Chlorochin mit dem Futter. Pyramidenzelle in der Uncusrinde, 1200 \times . Mehr homogene Gelbfluoreszenz vor allem der Zellbegrenzung. c MPI-Nr. 4879, 4¹⁰/₁₂ Jahre altes Kind mit amaurotischer Idiotie. Motorische Vorderhornzelle im Brustmark, 1200 \times . Das Speichermaterial fluoresciert genauso leuchtend gelb, wie das der Versuchstiere. d Exp.-Nr. 4894, Ratte, 158 Tage Chlorochin mit dem Futter. Oberes Halsmark, 1200 \times . Motorische Vorderhornzellen mit vielen leuchtenden Granula im Perikaryon. e Exp.-Nr. 5409, Ratte, 107 Tage Chlorochin mit dem Futter. Feld h 1 des Pyramidenzellbandes des Ammonshorns, 3000 \times . Die Ganglienzellen enthalten unzählige gelbleuchtende Granula unter Ausparung der Kernregion. f Exp.-Nr. 5309, Ratte, 148 Tage Chlorochin mit dem Futter. Pyramidenzellband des Ammonshorns, 17500 \times . Im Perikaryon einer Ganglienzelle ein konzentrisch geschichtetes Körperchen in der Nachbarschaft eines Golgi-Apparates, Zackenformige Ausziehungen an seinem Rand, cisternenartige Erweiterungen in seinen peripheren Abschnitten und Fehlen einer abschließenden Einheitsmembran lassen seine Entstehung aus dem Golgi-Apparat vermuten

Bei der anderen besonders auffallenden selteneren Form von neuronalem Speichermaterial handelt es sich um zwischen den MCBs liegende beträchtliche freie Anhäufungen von Glykogenpartikeln bzw. Glykogengranula, zumeist jedoch um kompakte kleinere oder große Haufen von Glykogenpartikeln mit einer einfachen oder doppelten, selten sogar mehrfachen membranösen Umhüllung. Wir haben diesen Befund nur in den Axonballonierungen von Spinal- und Trigeminusganglienzellen beider Species erhoben. Er legt den Vergleich mit der *neuronalen Glykogenspeicherung* bei der Typ II-Glykogenose (Pompe) nahe. Letztere kann sich beim Menschen ebenfalls bevorzugt in Spinalganglien manifestieren (Martin *et al.*, 1971).

Bereits die orientierenden Untersuchungen machten deutlich, daß die Veränderungen in zentralnervösen Neuronen von jenen in den untersuchten sensiblen Ganglien wesentlich differieren. Genügend lange Versuchsdauer hatte zwar in allen untersuchten zentralnervösen Regionen eine starke Vermehrung gelb-fluoreszierender Granula in Nervenzellperikarya zur Folge. Andeutungen von Perikaryonaufreibungen lagen jedoch allenfalls bei vereinzelt motorischen Vorderhornzellen vor. Gelegentliche geringfügige Verbreiterungen nucleoproximaler Abschnitte ihrer Fortsätze ließen bei den Ratten lichtmikroskopisch keine Masierungen von Granula erkennen; sie unterschieden sich auch bei den Kaninchen von den Axonballonierungen in den Spinal- und Trigeminusganglien im Bodianbild durch die Darstellung grober, leer erscheinender Waben. Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pyramidenzellen des Ammonshorns bei Ratten ergab deutliche Unterschiede gegenüber den Nervenzellveränderungen in den untersuchten sensiblen Ganglien. Gerade in den Perikarya der Pyramidenzellen des Ammonshornes fanden sich — mit felderförmigen Differenzen — die gelb-fluoreszierenden Granula regelmäßig stark vermehrt. Sie stellten sich hier jedoch nur zu einem geringen Teil als konzentrisch geschichtete membranöse Cytosomen dar, deren Typ sich von dem in den sensiblen Ganglien oft deutlich durch ihre engen Beziehungen zum Golgi-Apparat und Fehlen einer Einheitsmembran unterschied. Dagegen lag hier eine Vermehrung von Lipofuscingranula vor. Zebra-Körperchen, Ceroid-Lipofuscingranula und Anhäufungen von Glykogenpartikeln haben wir hier nicht gesehen.

Befunde zahlreicher biochemischer und pharmakologischer Experimente mit Chlorochin lassen auch eine *ätiologische und pathogenetische Verwandtschaft* zwischen der neuronalen Speicherungs dystrophie durch Chlorochin und der bei verschiedenen genetisch bedingten Speicherkrankheiten vermuten. Den Defekten einzelner lysosomaler Enzyme bei den natürlichen Erkrankungen kann man ein intermediäres Wirkungsprinzip des Chlorochins gegenüberstellen, das einen generellen Mangel lysosomaler Enzyme imitiert. Dadurch wird auch die ungewöhnliche elektronenmikroskopische Vielfältigkeit des neuronalen Speicherungs-materials bei der Chlorochinintoxikation verständlich.

Lysosomen werden als der für die pharmakologische Wirkung des Chlorochins entscheidende intracelluläre Angriffsort der Droge angesehen (Übersichten bei De Duve, 1968; Allison, 1968; Weissmann, 1964, 1965, 1968, 1969, 1973). In Zellkulturen wurde seine — ebenso die einiger anderer vorzugsweise vom Chinolin abgeleiteter Chemotherapeutica — bevorzugte Aufnahme und Konzentration in diesen Organellen festgestellt (Allison u. Young, 1964). Zahlreiche weitere *in vitro*-Untersuchungen haben neben einem „labilisierenden“ einen konzentrationsabhängigen „stabilisierenden“ Effekt des Chlorochins auf Lyso-

somenpopulationen bei Säugern ergeben. So wird beispielsweise die durch Streptolysin S, Lysolecithin, Etiocholanolon (ein Pyrogen) oder Progesteron bewirkte Freisetzung der sauren Hydrolasen aus Lysosomen von Kaninchenleber durch Chlorochin gehemmt (Weissmann, 1964). Auch auf Lysosomen aus Rattenleber hat die Droge in vitro einen derartigen Effekt (Miller u. Smith, 1966). Hierin und in vielen weiteren ähnlichen experimentellen und durch elektronenmikroskopische Befunde gestützten Ergebnissen (vgl. Abraham *et al.*, 1968; Hendy *et al.*, 1969; Abraham u. Hendy, 1970) wird u. a. die Grundlage der entzündungshemmenden Wirkung des Chlorochins bei zahlreichen Krankheitsbildern des rheumatischen Formenkreises gesehen. — Chlorochin hat chemisch einen amphiphilen Charakter, ebenso wie eine mit der vorher aufgeführten Gruppe nicht übereinstimmende Reihe von Chemotherapeutica mit ganz verschiedenen Indiaktionsgebieten, die sämtlich Phospholipidosen zu induzieren vermögen (Lüllmann *et al.*, 1973). Vermutlich liegt dem ihre besonders intensive Wechselwirkung mit verschiedenen Phospholipiden zugrunde, deren Substrateigenschaften für den regulären Abbau durch Enzyme dadurch verändert werden. Für die Auslösung der Phospholipidose der Muskulatur durch Chlorochin dürfte dies sogar der dominierende Faktor sein neben der Erschwerung der Weitergabe der für den Abbau normaler Phospholipide notwendiger lysosomaler Enzyme aus primären Lysosomen.

Auf die Dauer muß die therapeutisch erwünschte Hemmung der Weitergabe saurer Hydrolasen auch zu persistierenden Anomalien bzw. Verzögerungen des normalen Umsatzes bzw. Katabolismus anderer von lysosomalen Enzymen regulierter Zellbestandteile führen. Wie beim genetisch bedingten Defekt eines lysosomalen Enzymes (z. B. bei Morbus Tay-Sachs) darf man auch bei der chronischen Chlorochinintoxikation die Speicherung der zumeist membranös geschichteten Cytosomen in Neuronen als eine Folge davon betrachten.

Bemerkenswerterweise sehen sich die konzentrisch geschichteten membranösen Cytosomen in den Perikarya von Nervenzellen in Spinalganglienkulturen nach Zusatz von Chlorochin zum Nährmedium (Tischner, 1972) wie von „Gangliosid“ (Stern, 1972) recht ähnlich.

Die histochemisch deutlich gewordene Glykogenose der geschädigten Typ I-Muskelfasern dürfte ebenfalls eine Folge des hemmenden Effektes des Chlorochins auf die Wirksamkeit lysosomaler Enzyme sein. Insofern erscheint diese Massierung von Glykogen in den roten Muskelfasern der Muskelbeteiligung bei der Glykogenose Pompe ätiologisch vergleichbar, bei der ein Defekt der lysosomalen sauren Maltase vorliegt. Der abnorm hohe Phosphorylasegehalt der nicht oder nur wenig degenerativ veränderten roten Muskelfasern bei den ganz jungen Versuchsratten könnte eine Anpassung dieses nicht lysosomal gebundenen Enzyms an gesteigerten Bedarf sein. Zumindest sind die bei unserer experimentellen Myopathie ebenfalls stark vermehrt gefundenen Anhäufungen von Glykogengranula ohne umhüllende Membran diesem enzymatischen Abbau gut zugänglich. Die verschiedenen elektronenmikroskopischen Formen der Anhäufung von Glykogenpartikeln bzw. Glykogengranula stimmen bei der experimentellen und der Pompeschen Myopathie weitgehend überein (s. Garcin *et al.*, 1964; Engel, 1970). Auch bei der Typ II-Glykogenose sind anfangs die roten Muskelfasern von der Vacuolisierung weit stärker betroffen als die weißen (Engel, 1970).

Die lysosomale Genese der vielfach von einer deutlichen Einheitsmembran umgebenen MCBs in Ganglienzellen infolge Chlorochin darf auch aufgrund ihres elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Gehaltes an saurer Phosphatase (Abraham *et al.*, 1968; Abraham u. Hendy, 1970) als gesichert gelten. Derselbe Befund wurde an membranösen Cytosomen in Nervenzellen (Wallace *et al.*, 1964, 1968) und Leberzellen (Volk *et al.*, 1968) bei amaurotischer Idiotie des Menschen erhoben.

Der Nachweis saurer Phosphatase in manchen der vielschichtigen Myelinfiguren von Skelet- (McDonald u. Engel, 1970) und Herzmuskulatur (Hendy *et al.*, 1970) bei Chlorochinintoxikation spricht für den lysosomalen Ursprung eines Teiles auch dieser Formationen. Der überwiegende Teil der Myelinkörper dieser Lokalisation läßt sich jedoch offenbar nicht im Sinne lysosomaler Residualkörper deuten (McDonald u. Engel, 1970) und dürfte auf die direkte „stabilisierende“ Wirkung des Chlorochins auf verschiedene Phospholipide zurückgehen.

Klinisch und experimentell festgestellte Nebenwirkungen zweier anderer Pharmaka mit chemisch amphiphilem Charakter lassen bemerkenswerte Beziehungen zum Speicherungsprozeß infolge Chlorochin erkennen. Das zur Erweiterung der Herzkranzgefäße benutzte 4,4-Diäthylaminoäthoxyhexystrol² hatte beim Menschen (Yamamoto *et al.*, 1970) und Ratten (Yamamoto *et al.*, 1971) in erster Linie die Vermehrung eines besonderen sauren Glycerinphosphatides, der Lysobisphosphatidsäure zur Folge, die auch bei Morbus Niemann-Pick (einer Sphingolipidose mit überwiegender Beteiligung innerer Organe, selten des Gehirns) vermehrt gefunden wurde (Rouser *et al.*, 1968). Das zur Hemmung der Biosynthese von Cholesterin angewandte Triparanol³ führte bei Ratten zur Vermehrung von Inositolphosphatid, Serinphosphatid und Sphingomyelin (Arai *et al.*, 1967). Bei beiden Bildern lagen gehäuft intracelluläre Einschlüsse geschichteter lamellierter Struktur vor.

Ein wesentlicher Teil unserer lichtmikroskopischen Resultate betrifft die *Topik und Selektivität der Schädigungen*. — Die Tatsache, daß der neuronale Speicherungsprozeß in den Spinal- und Trigeminusganglien wesentlich ausgeprägter war (nach orientierenden Untersuchungen auch in den Grenzstrang- und intramuralen Ganglien des Darmes) als im ZNS, läßt eine bessere Schutzfunktion der Bluthirnschranke im Vergleich zur Blutnervenschranke gegenüber Chlorochin vermuten. Chlorochin verändert aber auch die reguläre Schrankenfunktion der Gefäße, wie die zahlreichen Spontanblutungen in verschiedensten Geweben zeigen. Gerade in Spinalganglien von Ratte und Kaninchen liegt verglichen mit peripheren Nerven eine erhöhte Permeabilität der Gefäße für die verschiedensten Substanzen und eine Prädisposition zu Permeabilitätsstörungen vor (Olsson, 1971; Waksman, 1961). Die MCBs infolge Chlorochin werden auch in Gefäßendothelien bevorzugt gespeichert (Read u. Bay, 1971).

Neben dem Gefäßfaktor ist für die Lokalisation und relative Selektivität einiger neuropathologischer Effekte des Chlorochins offensichtlich auch die reversible Bindung des Mittels an verschiedene Pigmente wesentlich. Die Beziehungen zwischen der enormen Konzentration des Chlorochins in den melaninhaltigen Geweben des Auges (Bernstein *et al.*, 1963) und Entstehung der Chlorochinretinopathie wurden vielfach erörtert. — Auch an menschliches Hämoglobin wird Chlorochin bevorzugt gebunden (Rubin *et al.*, 1965). — Seiler hatte seinerzeit mittels Hochspannungselektrophorese eine reversible Bindung des dem Chlorochin chemisch sehr nahe verwandten Chinacrins auch an Myoglobin nachgewiesen (s. Klinghardt u. Thomas, 1970). Schon Smith u. O'Grady (1966) vermuteten einen analogen Grund für die bevorzugte Schädigung der besonders myoglobinreichen Typ I-Muskelfasern durch Chlorochin. — Auch das auffallende Muster der Chlorochinmyopathie des Menschen und deren nicht seltene Kombination mit einer Neuropathie erscheint uns danach verständlich. Die bevorzugte klinische Affektion der Muskulatur überhaupt findet in tierexperimentellen Befunden von

² Coralgil®, Coralgina®, Trimanyl®.

³ Trianel®, Hipocolestina®, Triparin®, Acosterina®, Metascelene® usw.

Grundmann *et al.* (1972) eine Erklärung. Langzeitintoxikation hatte nur in der Muskulatur eine ständig fortschreitende Akkumulation des Chlorochins zur Folge, während in den anderen untersuchten Geweben ein Konzentrationsmaximum nicht mehr überschritten wurde.

Die klinische „Myoneuropathie“ (ein weniger mißverständlicher Ausdruck als „Neuromyopathie“) wurde oft beschrieben (Whisnant *et al.*, 1963; Loftus, 1963; Garcin *et al.*, 1964; Begg u. Simpson, 1964; Buksowicz *et al.*, 1965; Blom u. Lundberg, 1965; Rewcastle *et al.*, 1965; Millinger u. Suerth, 1966; Eadie u. Ferrier, 1966; Hicklin, 1968; Chapman u. Ewen, 1969; Hughes *et al.*, 1970) und bietet danach ein charakteristisches Bild: Die Muskelschwäche beginnt in der Regel in der proximalen Beinmuskulatur und kann allmählich auf die Rücken-, Nacken-, proximale Oberarm-, selten sogar auf die Gesichts-, Schluck- und Atemmuskulatur und auf innere Augenmuskeln übergreifen. Die Muskeldehnungsreflexe schwinden, Sensibilitätsstörungen fehlen fast stets. Bei elektrophysiologischen Untersuchungen fielen wiederholt Veränderungen im Sinne sowohl einer Myopathie wie einer Neuropathie im selben Muskel unmittelbar nebeneinander auf (Whisnant *et al.*, 1963; Garcin *et al.*, 1964; Weber *et al.*, 1968; Itabashi u. Kökmen, 1972 und viele andere). Die Leitungsgeschwindigkeit einzelner Nerven war mitunter deutlich herabgesetzt.

Die vielfach abgebildete vacuolige Chlorochin-Myopathie des Menschen war zumeist viel massiver als wir dies jemals experimentell sahen. Gründe dürften die oft jahrelange Durchführung der Therapie und die sehr lange Verweildauer der Droge im Organismus sein. Ausscheidung von Chlorochin mit dem Harn war beim Menschen noch 5 Jahre nach der letzten therapeutischen Verabreichung nachweisbar (Zvaifler u. Rubin, 1962; Rubin *et al.*, 1965).

Nachdem der Proteinstoffwechsel der roten Muskelfasern viel höher ist als der der weißen (Citoler *et al.*, 1967), vermuteten wir (Klinghardt, 1970), daß die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Chlorochin (Ciak u. Hahn, 1966, 1967 u. a.) ein weiterer Faktor der bevorzugten Affektion der roten Muskelfasern ist.

Die zahlreichen Axonballonierungen in den Spinal- und Trigeminalganglien im Bereich des Axonabganges oder nicht weit vom Perikaryon entfernt finden in der axonproximalen Lokalisation der symptomatischen Axondystrophie bei vergleichbaren natürlichen Speicherkrankheiten (Seitelberger, 1971) eine Parallele. Unsere Untersuchungen über gleichartige axonterminale Manifestationen sind nicht abgeschlossen. Vorläufige Befunde an motorischen Endplatten und Muskelspindeln stehen in Einklang mit den Auftreibungen terminaler Axone bei der amaurotischen Idiotie des Menschen (Clément *et al.*, 1953; Krücke, 1955, 1959; Krücke u. Ömol, 1968). Aus der Reihe weiterer aufgetauchter Fragen könnte die systematische Bearbeitung der regionalen, aber auch zwischen benachbarten Nervenzellen (möglicherweise verschiedenen Typs) festgestellten Unterschiede in der Zusammensetzung des Speichermaterials einen Beitrag zur verschiedenen Anfälligkeit und Reaktion neuronaler Systeme — etwa im Ammonshorn — geben.

Ich möchte Fräulein Mayle und Fräulein Eckstein für ihre Mitarbeit bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Herrn König für seine Sorgfalt besonders bei den Langzeitexperimenten und Hilfe bei deren Auswertung auch an dieser Stelle danken.

Literatur

- Abraham, R., Hendy, R., Grasso, S.: Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. *Exp. molec. Path.* **9**, 212—229 (1968)
- Abraham, R., Hendy, R.: Irreversible lysosomal damage induced by chloroquine in the retinae of pigmented and albino rats. *Exp. molec. Path.* **12**, 185—200 (1970)

- Abraham, R., Hendy, R.: Effects of chronic chloroquine treatment on lysosomes of rat liver cells. *Exp. molec. Path.* **12**, 148 (1970)
- Allison, A. C.: Effects of drugs and toxic agents on lysosomes. In: The interaction of drugs and subcellular components in animal cells. London: P. N. Campbell 1968
- Allison, A. C., Young, M. R.: Uptake of dyes and drugs by living cells in culture. *Life Sci.* **3**, 1407—1414 (1964)
- Arai, K., Yates, R. D., Rappoport, D. A.: Fine structure and chemical composition of opaque cytoplasmic bodies of triparanol treated Syrian hamsters. II. Phospholipid analysis of opaque bodies from adrenal glands. *Tex. Rep. Biol. Med.* **25**, 350—359 (1967)
- Begg, T. B., Simpson, J. A.: Chloroquine "neuromyopathy". *Brit. med. J.* **1964 I**, 770
- Bernstein, H., Zvaifler, N., Rubin, M., Sister Mansour, A. M.: The ocular deposition of chloroquine. *Invest. Ophthalm.* **2**, 384—392 (1963)
- Blom, S., Lundberg, P. O.: Reversible myopathy in chloroquine treatment. *Acta med. scand.* **177**, 685—688 (1965)
- Brock, N., Wilk, W.: Zur Ernährung der Laboratoriumstiere. 1. Mitteilung: Altromin® — eine Standard-Diät für Ratte und Maus. *Arzneimittelforsch.* **11**, 1071—1086 (1961)
- Buksowicz, C., Dowzenko, A., Dymecki, J.: Chloroquine neuromyopathy. *Polish med. J.* **4**, 839—842 (1965)
- Chapman, R. S., Ewen, W. B.: Chloroquine-induced myopathy. *Brit. J. Derm.* **81**, 217—219 (1969)
- Ciak, J., Hahn, F. E.: Chloroquine: mode of action. *Science* **151**, 347—349 (1966)
- Citoler, P., Beniter, L., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung der Protein-Synthese in roten und weißen Muskelfasern. *Exp. Cell Res.* **45**, 195—205 (1967)
- Clément, R., Gruner, J., Rameix, P., Bretagne, J.: Idiotie amaurotique de Tay-Sachs. *Presse méd.* **61**, 253—255 (1953)
- De Duve, C.: Lysosomes as targets for drugs. In: The interaction of drugs and subcellular components in animal cells. London: P. N. Campbell 1968
- Eadie, M. J., Ferrier, T. M.: Chloroquine myopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **29**, 331—337 (1966)
- Engel, A. G.: Acid maltase deficiency in adults: Studies in four cases of a syndrome which may mimic muscular dystrophy or other myopathies. *Brain* **93**, 599—616 (1970)
- Fardeau, M., Godet-Guillain, J.: Étude ultrastructurale des plaques motrices du muscle squelettique humain et de leurs modifications pathologiques. *Proc. Vith Internat. Congr. Neuropath., Paris 1970*
- Gambetti, P., Di Mauro, S., Baker, L.: Nervous system in Pompe's disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **30**, 412—430 (1971)
- Garcin, R., Rondot, P., Fardeau, M.: Sur les accidents neuromusculaires et en particulier sur une „myopathie vacuolaire“ observés au cours d'un traitement prolongé par le chloroquine. *Rev. neurol.* **111**, 177—195 (1964)
- Gleiser, C. A., Bay, W. W., Dukes, T. W., Brown, R. S., Read, W. K., Pierce, K. R.: Study on chloroquine toxicity and a drug-induced cerebrosplinal lipodystrophy in swine. *Amer. J. Path.* **53**, 27—45 (1968)
- Grundmann, M., Mikulikova, I., Vrublovsky, P.: Tissue distribution of chloroquine in rats in the course of long-term application. *Arch. int. Pharmacodyn.* **197**, 45—52 (1972)
- Hendy, R. J., Abraham, R., Grasso, P.: The effect of chloroquine on rat heart lysosomes. *J. Ultrastruct. Res.* **29**, 485—495 (1969)
- Hicklin, J. A.: Chloroquine neuromyopath. *Ann. Phys. Med.* **9**, 189-192 (1968)
- Hughes, J. T., Esiri, M., Oxbury, J. M., Whitty, C. W. M.: Chloroquine myopathy. *Quart. J. Med.* **40**, 85—93 (1971)
- Itabashi, H. H., Kökmen, E.: Chloroquine neuromyopathy. *Arch. Path.* **93**, 209—218 (1972)
- Jatzkewitz, H.: Zerebrale Sphingolipidosen als angeborene Stoffwechselstörungen. *Dtsch. med. Wschr.* **95**, 131—139 (1970)
- Jatzkewitz, H.: Briefliche Mitteilung (1972)
- Klinghardt, G. W.: Histopathologische Besonderheiten der Myoneuropathie durch Chloro-chindiphosphat. *Naturwissenschaften* **55**, 136—137 (1968)

- Klinghardt, G. W.: Experimentelle Untersuchungen zur Ätiologie der Polyneuropathie durch Nitrofurane und zur Histopathologie der Neuro-Myopathie durch Chlorochindiphosphat (Resorchin®). *Beitr. Neurochir.* **16**, 55–61 (1970)
- Klinghardt, G. W.: Histopathologie des Nervensystems bei experimenteller Chlorochin-Intoxikation. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **55**, 840 (1971)
- Klinghardt, G. W.: Experimentelle Beiträge zur Neuropathologie aktueller Pharmaka vom Chinolintyp. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.* **208**, 127 (1974)
- Klinghardt, G. W., Thomas, E.: Experimental myoneuropathy of certain drugs of 8-amino quinoline type. *Proc. Vth Internat. Congr. Neuropath.*, pp. 1076–1077. Paris 1970
- Krücke, W.: Erkrankungen des peripheren Nervensystems. In: *Hdb. d. spez. pathol. Anat. und Histol.*, Vol. XIII/5. Teil, S. 1–248. O. Lubarsch, F. Henke u. R. Rössle, Hrsg. Berlin: Springer 1955
- Krücke, W.: Histologie der Polyneuritis und Polyneuropathie. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **180**, 1–39 (1959)
- Krücke, W., Önl, B.: Zur Histopathologie der peripheren Neurone bei amaurotischer Idiotie. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.* **191**, 133 (1968)
- Leading article: Chloroquine neuromyopathy. *Brit. med. J.* **1964 I**, 452
- Loftus, L. R.: Peripheral neuropathy following chloroquine therapy. *Canad. med. Ass. J.* **89**, 917–920 (1963)
- Lüllmann, H., Lüllmann-Rauch, R., Wassermann, O.: Arzneimittel-induzierte Phospholipid-speicherkrankheit. *Dtsch. med. Wschr.* **98**, 1616–1625 (1973)
- MacDonald, R. D., Engel, A. G.: Experimental chloroquine myopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **29**, 479–499 (1970)
- Martin, J. J., de Barsy, Th., van Hoof, F., Palladini, G.: Pompe's disease: An inborn lysosomal disorder with storage of glycogen. *Acta neuropath. (Berl.)* **23**, 229–244 (1973)
- Miller, W. S., Smith, J. G.: Effect of acetylsalicylic acid on lysosomes. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **122**, 634–636 (1966)
- Millingen, K. S., Suerth, E.: Peripheral neuromyopathy following chloroquine therapy. *Med. J. Aust.* **1**, 840–841 (1966)
- Olsson, Y.: Studies on vascular permeability in peripheral nerves. IV. Distribution of intravenously injected protein tracers in the peripheral nervous system in various species. *Acta neuropath. (Berl.)* **17**, 114–126 (1971)
- Read, W. K., Bay, W. W.: Basic cellular lesion in chloroquine toxicity. *Lab. Invest.* **24**, 246–259 (1971)
- Reichel, W., Hollander, J., Clark, J. H., Strehler, B. L.: Lipofuscin pigment accumulation as a function of age and distribution in rodent brain. *J. Geront.* **23**, 71–78 (1968)
- Rewcastle, N. B., Humphrey, J. G.: Vacuolar myopathy: Clinical, histochemical and microscopic study. *Arch. Neurol. (Chic.)* **12**, 570–582 (1965)
- Rouser, G., Kritschewsky, G., Yamamoto, A. G., Knudson, J., Simon, G.: *Lipids* **3**, 287 (1968)
- Rubin, M., Zvaifler, N., Bernstein, H., Mansour, A.: Chloroquine toxicity. *Proc. 2nd Internat. Pharm. Meet., Prague 1963*, Vol. IV, pp. 467–486. Oxford 1965
- Sandhoff, K.: Briefliche Mitteilung (1974)
- Sandhoff, K., Jatzkewitz, H., Peters, G.: Die infantile amaurotische Idiotie und verwandte Formen von Gangliosid-Speicherkrankheiten. *Naturwissenschaften* **56**, 356–362 (1969)
- Seitelberger, F.: Neuropathological conditions related to neuroaxonal dystrophy. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. V, 17–29 (1971)
- Smith, B., O'Grady, G.: Experimental chloroquine myopathy. *Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **29**, 255–258 (1966)
- Stern, J.: The induction of ganglioside storage in nervous system cultures. *Lab. Invest.* **26**, 509–514 (1972)
- Svennerholm, L.: Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**, 613–623 (1963)
- Terry, D. D.: Electron microscopy of selected neuropilidoses. *Handbook of clinical neurology*, P. J. Vinken and G. W. Bruyn, Eds., Vol. X, pp. 362–384. Amsterdam 1970
- Tischner, K. H.: Chloroquine-induced alterations in rat sensory ganglia cultivated in vitro. *Acta neuropath. (Berl.)* **22**, 208–221 (1972)

- Venable, J. H., Coggeshall, R.: A simplified lead citrat stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25** I, 407—408 (1965)
- Volk, W. B., Wallace, B. J., Aronson, S. M.: Some ultrastructural and histochemical aspects of lipidoses. *Cerebral lipidoses*, Vol. II, pp. 86—103. A. N. Vicente, P. Dustin, and A. Lowenthal, Eds. Bruxelles: Presses Academiques Européennes 1968
- Waksman, B. H.: Experimental study of diphtheric polyneuritis in the rabbit and guinea pig. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **20**, 35—77 (1961)
- Wallace, B. J., Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Fine structural localization of acid phosphatase activity in neurons of Tay-Sachs disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **23**, 676 (1964)
- Wallace, B. J., Volk, B. W., Schneck, L., Kaplan, H.: Fine structural localization of two hydrolytic enzymes in the cerebellum of children with lipidoses. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **25**, 76—96 (1966)
- Weber, M., Bricchet, B., Ponin, F., Huriet, C., Tridon, P.: Electromyographie et neuromyopathie chloroquinique. *Rev. neurol.* **118**, 556—459 (1968)
- Weissmann, G.: Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed. Proc.* **23**, 1038—1044 (1964)
- Weissmann, G.: Lysosomes. *New Engl. J. Med.* **1965**, 1084—1090, 1143—1149
- Weissmann, G.: Lysosomes and joint disease. *Arthr. and Rheum.* **9**, 834—840 (1968)
- Weissmann, G.: The effects of steroids and drugs on lysosomes. In: *Lysosomes in biology and pathology*, Vol. I, pp. 276—295. J. T. Dingle and H. B. Fell, Eds. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1969
- Whisnant, J. P., Espinosa, R. E., Kierland, R. R., Lambert, E. H.: Chloroquine neuropathy. *Proc. Mayo Clin.* **38**, 501—513 (1963)
- Yamamoto, A., Adachi, S., Ishibe, T., Shinji, Y., Kaki-Uchi, Y., Seki, K., Kitani, T.: Accumulation of acid phospholipids in a case of hyperlipidemia with hepatosplenomegaly. *Lipids* **5**, 566—571 (1970)
- Yamamoto, A., Adachi, S., Kitani, T., Shinji, Y., Seki, K., Nasu, T., Nishikawa, M.: Drug induced lipidosis in human cases and in animal experiments. *J. Biochem.* **69**, 613—615 (1971)
- Yu, M. C., Bakay, J., Lee, J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. *Acta neuropath. (Berl.)* **22**, 222—234 (1972)
- Zvaifler, N. J., Rubin, M.: The metabolism of chloroquine. *Arthr. and Rheum.* **5**, 330 (1962)

Dr. G. W. Klinghardt
 Neuropathologische Abteilung
 des Max-Planck-Institutes
 für Hirnforschung
 D-6000 Frankfurt a.M., Deutschordenstr. 46
 Bundesrepublik Deutschland