

Bildung von Sulfatidgranula nach intracerebraler Injektion von Cerebrosid-Schwefelsäureestern beim Kaninchen

HORSTMAR HOLLÄNDER

Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie
(Max Planck-Institut) München

Eingegangen am 10. November 1965

Intracelluläre Ablagerungen von Cerebrosid-Schwefelsäureestern (CSE) in Form von Sulfatidgranula wurden bisher nur bei der metachromatischen Leukodystrophie, einer seltenen Stoffwechselerkrankung des Menschen, beobachtet. Es handelt sich bei dieser Krankheit um eine angeborene Fermentstörung (MEHL u. JATZKEWITZ 1965). In der vorliegenden Arbeit wurden kolloidal gelöste CSE Kaninchen intracerebral injiziert. Auf diese Weise war es möglich, intracelluläre Bildung von CSE-Granula zu induzieren. Auffallend war dabei die geringe Häufigkeit granulärer CSE-Ablagerungen. Durch gleichzeitige Injektion von Natrium-diäthyldithiocarbamat (NDDTC) ließ sich die geringe Bereitschaft zur Sulfatidgranulabildung nicht steigern.

Material und Methodik

20 männliche Kaninchen zwischen 2,5 und 3 kg wurden zum Versuch verwendet.

17 Tieren wurde je 1,5 mg CSE in physiologischer Kochsalzlösung intracerebral injiziert. Der Injektionslösung waren bei 3 dieser Tiere je 2 mg NDDTC zugesetzt. Die injizierte Flüssigkeitsmenge betrug bei allen Tieren 0,1 ml. 2 der 3 Kontrolltiere wurden mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung und 1 Tier mit 2 mg NDDTC in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung gespritzt. Von den 14 Tieren, die nur CSE erhalten hatten, wurden je 2 Tiere nach 4, 8 und 16 Std, 1 und 2 Tagen getötet und je 1 Tier nach 3, 4, 8 und 23 Tagen. 1 Tier der beiden zugehörigen Kontrolltiere wurde am 1. Tag und 1 Tier am 23. Tag post injectionem getötet.

Von den 3 Tieren, die zusätzlich NDDTC erhalten hatten, wurde je 1 Tier am 2., 4. und 8. Tag post injectionem getötet und das entsprechende Kontrolltier am 4. Tag.

Die Tötung erfolgte in Äthernarkose durch Entbluten aus der Vena Cava. Die Gehirne wurden in neutralem 4%igem Formalin ca. 3 Wochen lang fixiert. Die histochemische Untersuchung erfolgte an 20 μ starken Gefrierschnitten. Es wurden Frontalschnitte aus drei Regionen untersucht: 1. Frontalhirn, 2. Schnitt in Höhe der Injektionsstelle mit Stammganglien, 3. Occipitalhirn. Der CSE-Nachweis erfolgte mit der Trypaflavin-p-dimethylaminobenzaldehyd-Methode (HOLLÄNDER 1963, 1964). Kontrollschnitte wurden mit HE, Kresylviolett, Sudan nach ROMELS, Markscheiden nach SCHROEDER gefärbt.

Herstellung der Injektionslösungen. 60 mg eines CSE-Gemisches wurden in 50 ml Chloroform-Methanol (2:1) in einem 100 ml-Kolben gelöst. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter leichter Erwärmung des Gefäßes mit einer knapp über der

Flüssigkeitsoberfläche befindlichen, an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Capillare abgeschnorchelt. Man erhält auf diese Weise einen dünnen Lipoïdfilm auf der Kolbenwand. Nach Zusatz von 4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung wurde der Kolben an einen Rückflußkühler gehängt und im kochenden Wasserbad 5 Std lang erhitzt. Dabei lösen sich die CSE kolloidal, die Lösung opalesciert.

1 ml dieser Lösung wurden 20 mg NDDTC (Merck) zugesetzt und gelöst.

Injektionstechnik. Die Injektion wurde in Äthernarkose vorgenommen. Die Injektionsstelle lag 1 cm hinter einer, die Mitte beider oberer Orbitalränder verbindenden gedachten Linie 0,5 cm rechts paramedian. Nach Freilegung des Schädelknochens wurde an der angegebenen Stelle mit einem Rundkopfbohrer eine Vertiefung in den Knochen gebohrt, so daß nur eine dünne Knochenlamelle stehenblieb. Diese Schicht und die darunterliegende Dura wurden dann mit einer auf 5 mm abgeschnittenen und wieder angeschliffenen 24 Nadel durchgestochen. Die Nadel wurde dann senkrecht zur Schädeloberfläche ins Hirn eingeführt. Die Injektion erfolgte mit einer Tuberkulinspritze.

Ergebnisse

Bei keinem der untersuchten Tiere fanden sich pathomorphologische Veränderungen im Frontal- oder Occipitalstück. Das Mittelstück zeigte im Bereich des Stichkanals, je nach Überlebenszeit, frische Blutungen,

Tabelle

Injizierte Substanz in 0,1 ml	Tötung post injectionem	Anzahl der Tiere	Anzahl der Tiere mit CSE-Granula
1,5 mg CSE	4 h	2	0
1,5 mg CSE	8 h	2	0
1,5 mg CSE	16 h	2	0
1,5 mg CSE	1 d	2	0
1,5 mg CSE	2 d	2	1
1,5 mg CSE	3 d	1	1
1,5 mg CSE	4 d	1	0
1,5 mg CSE	8 d	1	0
1,5 mg CSE	23 d	1	0
NaCl	1 d	1	0
NaCl	23 d	1	0
1,5 mg CSE + 2 mg NDDTC	2 d	1	0
1,5 mg CSE + 2 mg NDDTC	4 d	1	0
1,5 mg CSE + 2 mg NDDTC	8 d	1	0
2 mg NDDTC	4 d	1	0
	Gesamt	20	2

ältere Blutungen, Fettkörnchenzellen, Gliaprogressivität. Hervorzuheben ist das gehäufte Auftreten von geblähten Astrocyten mit großen glasig erscheinenden, blaß färbbaren Kernen, Formen wie man sie beim Hirnödem beobachtet. Hinzu kam eine oft deutliche Entmarkung mit Auflockerung des Grundgewebes. In keinem Fall konnten wir entzündliche Reaktionen im Sinne einer Meningitis oder Meningoencephalitis beob-

achten. CSE-Granula ließen sich nur in zwei Fällen nachweisen. Beide Tiere hatten nur CSE injiziert bekommen und waren am 2. und 3. Tag post injectionem getötet worden (Tabelle). Bei keinem aller übrigen Tiere fanden wir Sulfatidgranula. Beide positiven Fälle zeigten nur auf der Seite der Injektion Granulabildung, und zwar in Gliazellen in der Umgebung von Ependymresten im Bereich der Anlagerung des Alveus an die basale Balkenfläche (Abb. 1 und 2). Ganz vereinzelt auch in Pialzellen

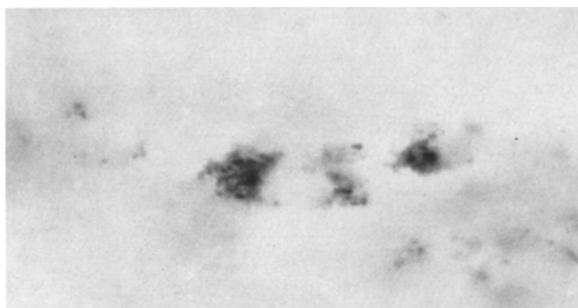


Abb. 1. Intracelluläre CSE-Granula. Deutliche Aussparung der Kerne. Trypaflavin-p-Dimethylaminobenzaldehyd 1500 ×

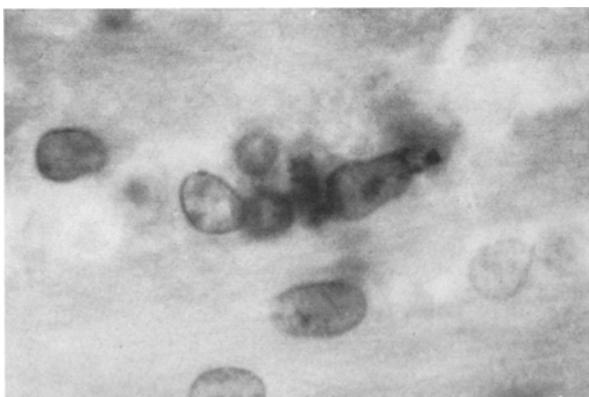


Abb. 2. Intracelluläre CSE-Granula. Trypaflavin-p-Dimethylaminobenzaldehyd-Hämalaun. 1800 ×

über dem Cortex in der Nähe der Injektionsstelle. Sicher extracellulär liegende Granula konnten nicht nachgewiesen werden. Nach Chloroform-Methanol Extraktion ließen sich keine Schwefelsäureester mehr nachweisen.

Schnitte wurden über Nacht bei 37°C in Chloroform-Methanol 2:1 inkubiert und dann auf CSE untersucht.

Mit der PAS-Reaktion und mit dem Schwefelsäureesternachweis nach Sulfatierung ließen sich die Granula auch am extrahierten Schnitt darstellen.

Die NDDTC-Tiere zeigten pathomorphologisch und histochemisch keinen Unterschied gegenüber den zwölf negativen CSE-Tieren.

Diskussion

Die histochemischen Eigenschaften der in den beiden Fällen nachgewiesenen Granula entsprechen den Reaktionen von Sulfatidgranula, wie wir sie in Hirn und Niere von Fällen metachromatischer Leukodystrophie beschrieben haben (HOLLÄNDER 1965).

Das typische CSE-Granulum enthält CSE-Ablagerungen auf oder in einer Mucopolysaccharid-Matrix, ohne covalente Bindungen zwischen Polysacchariden und CSE.

Freiliegende Sulfatgruppen mit geringem gegenseitigen Abstand bedingen die Chromotropie und erlauben den histochemischen Nachweis des CSE-Granulums.

Bemerkenswert ist, daß es nur in so seltenen Fällen zur Granulierung kommt. In jüngster Zeit haben OLSSON, SOURANDER u. SVENNERHOLM kolloidal gelöste Sphingolipoide Ratten intracerebral gespritzt. Sie benutzten wesentlich höhere CSE-Konzentrationen als wir (8 mg pro Ratte) und fanden deutliche unresorbierte CSE-Ablagerungen. Obwohl diese Depots über die gesamte Versuchsdauer von 6 Wochen nachweisbar blieben, war es nur in sehr geringem Maße zur cellulären CSE-Einlagerung gekommen. Offenbar bleiben also größere CSE-Mengen über lange Zeit unresorbiert im Gewebe liegen, während sich geringere CSE-Mengen nach der Injektion rasch im Gewebe zu verteilen scheinen, so daß keine freien Sulfatgruppen in größerer Dichte auftreten. Ein Stadium granulärer Einlagerung muß dabei nicht in jedem Fall durchlaufen werden.

Die geringe Neigung zur Bildung von CSE-Granula läßt sich durch gleichzeitige Gabe von NDDTC nicht steigern.

Durch chronische Vergiftung mit dieser Substanz gelang es MUR, ZARUBA u. KRIKLAVA (1959) bei Schafen Leukodystrophien mit metachromatischen Abbauprodukten zu erzeugen. Es wurde jedoch bis jetzt nicht gesichert, ob es sich dabei um CSE-Ablagerungen handelt.

AUSTIN u. LEHFELDT (1965) implantierten Reinlipoide in fester Form ins Rattenhirn. Sie fanden nach Implantation von CSE (eine Mengenangabe in Milligramm wurde nicht gemacht) sogenannte „Granular bodies“ noch 4 Wochen post injectionem. Wie schon OLSSON u. Mitarb. bemerkten, liegen bei dieser Versuchsanordnung offenbar andere Resorptionsbedingungen vor.

In bezug auf das Ausbleiben einer „experimental-globoid-response“ nach intracerebraler CSE-Injektion entsprechen auch unsere Untersuchungen den Ergebnissen von AUSTIN u. LEHFELDT (1965).

Zusammenfassung

17 Kaninchen wurde je 1,5 mg Cerebrosid-Schwefelsäureester (CSE) in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung intracerebral gespritzt. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten post injectionem getötet und die Gehirne histologisch und histochemisch untersucht. Nur bei zwei Tieren konnte die intracelluläre Bildung von Sulfatid-Granula nachgewiesen werden. Aufgrund des Löslichkeitsverhaltens und ihrer histochemischen Reaktion erwiesen sich die Granula als typische CSE-Granula, wie sie auch bei der metachromatischen Leukodystrophie beobachtet werden. Durch gleichzeitige Gabe von Natriumdiathyldithiocarbamat ließ sich die geringe Bereitschaft zur granulären Ablagerung der angebotenen CSE nicht steigern.

An dieser Stelle sei Herrn Dr. HARTMUT PILZ für seine Hilfe und die Überlassung der CSE herzlich gedankt.

Literatur

- AUSTIN, J. H., and D. LEHFELDT: Studies in Globuid (Krabbe) Leukodystrophy. III. Significance of experimentally-produced globuid-like elements in rat white matter and spleen. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **24**, 265—289 (1965).
- HOLLÄNDER, H.: A staining method for cerebroside-sulfuric-esters in brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 118 (1963).
- Der histochemische Nachweis von Schwefelsäureestern mit Trypaflavin. *Histochemistry* **3**, 387—395 (1964).
- Der histochemische Nachweis von Mucopolysacchariden in Sulfatidgranula bei intrazellulärer Speicherung von Cerebrosidschwefelsäureestern. *J. Neurochem.* **12**, 335—337 (1965).
- MEHL, E., and H. JATZKEWITZ: Evidence for the genetic block in metachromatic leukodystrophy (ML). *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 407—411 (1965).
- MUR, J., M. ZARUBA, and J. KRIKLAVA: Diffuse, metachromatische Myelindestruktion des Schafhirnes, hervorgerufen durch chron. Applikation kupferbindender analytischer Reagenzien. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 535 (1959).
- OLSSON, Y., P. SOURANDER, and L. SVENNERHOLM: Experimental studies on the pathogenesis of leukodystrophies. I. The effect of intracerebrally injected sphingolipoids in the rat's brain. *Acta neuropath. (Ber.)* (im Druck).

Dr. H. HOLLÄNDER
Deutsche Forschungsanstalt
für Psychiatrie (Max Planck-Institut)
8 München 23, Kraepelinstraße 2