

Ultrastrukturelle Befunde bei 9 Feten nach pränataler Diagnose von Neurolipidosen*

G. Suchlandt¹, W. Schlote¹ und K. Harzer²

¹ Lehrstuhl für submikroskopische Pathologie und Neuropathologie
(Leiter: Prof. Dr. W. Schlote)

² Institut für Hirnforschung (Direktor: Prof. Dr. J. Peiffer) Universität Tübingen,
Belthlestrasse 15, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Ultrastructural Findings in Nine Fetuses with Neurolipidoses After Prenatal Biochemical Diagnosis

Summary. After positive prenatal enzymic diagnosis of different neurolipidoses therapeutic abortion was carried out in the 19th to 25th week of pregnancy. Ten delivered fetuses were studied ultrastructurally and in nine of them positive results were obtained, although in some cases one had to accept relatively poor structural conservation of fetal tissues. The ultrastructure of the quantitatively small lipid storage effects qualitatively resembled that of the postnatal stages with some exceptions of localization. In fetal GM₂-gangliosidosis type 2 (variant 0) concentric membranous cytoplasmic bodies were detected in the brain cortex. In Krabbe's disease the myelinated regions of the spinal cord showed scattered storage (globoid) cells, sometimes closely related to blood vessels, which contained isolated or stranded tubular or spicular inclusions. In GM₁-gangliosidosis type 1 neurons of the brain stem showed lamellar inclusions structured as zebra bodies, and splenic histiocytes exhibited numerous almost clear cytoplasmic vacuoles. In fetal metachromatic leukodystrophy the CNS including myelinated regions was essentially free of morphologic lipid storage effects. However, many kidney tubules cells contained great numbers of irregular or roughly parallel stacks of membranes. These inclusions may be equivalent to "tuffstone" bodies. In one fetus the bodies were restricted to tubular cells bearing microvilli. Fluorescent microscopy of arcus of the kidney tubule showed excess amounts of metachromatic material. Less of this material was demonstrable in the envelope layer of hepatic Glisson triangles. In the fetus with Niemann-Pick disease type C large neurons of the basal ganglia and the spinal cord were filled with membranous inclusions that were similar to myelin-shaped bodies rather than to solid membranous bodies. The 19-weeks-old fetus with enzymically proven

Sonderdruckanforderungen an K. Harzer

* Diese Arbeit enthält die Ergebnisse der medizinischen Dissertation von G. S., Tübingen, 1982

Gaucher disease was free of ultrastructural lipid storage effects. Most but not all of the morphological findings in the fetuses with neurolipidoses were in accordance with published results.

Key words: Fetal neurolipidosis - Ultrastructure - Prenatal diagnosis

Zusammenfassung. Nach positiver enzymatischer Pränataldiagnose aus der Amnionzellkultur lieferte die morphologische Untersuchung von 10 Feten (19.-25. Schwangerschaftswoche) mit sechs verschiedenen Neurolipidosen (Sphingolipid-Speicherkrankheiten) bei 9 Feten ein positives Ergebnis, wobei der nicht immer optimale Erhaltungszustand der fetalen Gewebe nach therapeutischer Abruptio in Kauf genommen werden mußte. Die Ultrastruktur der quantitativ meist noch geringen Lipidspeicherprozesse in Gehirn oder viszeralen Organen glich qualitativ jener der postnatalen Speicherprozesse: GM₂-Gangliosidose Type 2; Nachweis von „menbranous cytoplasmic bodies“ lysosomalen Ursprungs in Fortsätzen von Nervenzellen des Großhirns. Morbus Krabbe; Auftreten von einkernigen und mehrkernigen Speicherzellen, z. T. mit Gefäßbeziehung, im Rückenmark. In den Speicherzellen traf man auf spieß- oder lamellenförmige, teils auch fädig strukturierte Einschlußkörper. GM₁-Gangliosidose Typ 1; in Nervenzellen des Hirnstamms Vorkommen intrazytoplasmatischer lysosomaler Speicherkörper vom „Zebra“-Typ, in der Milz fanden sich durch zahlreiche, kaum strukturierte Vakuolen geblähte Speicherzellen. Metachromatische Leukodystrophie; im Gegensatz zu Literatur-Befunden waren keine Speicherprozesse im fetalen Hirn und Rückenmark, jedoch starke Speicherungen in den Nierentubuli in Form multilamellärer (zirkulär, parallel oder unregelmäßig geschichteter) Speicherkörper, teils mit Prävalenz in den Zellen mit Mikrovilli, nachweisbar. Fluoreszenzmikroskopisch war metachromatisches Material in Nierentubuli und Sammelrohren, ferner auch in der Leber (Grenze der Glissoneischen Dreiecke zum Parenchym) darstellbar. Morbus Niemann-Pick Typ C; große Nervenzellen des Rückenmarks und der Stammganglien enthielten zahlreiche Myelinfiguren-artige Einschlußkörper, die den postnatalen lysosomalen Speicherkörpern in Nervenzellen bei dieser Erkrankung ähneln. Morbus Gaucher; der erst 19 Wochen alte Fet zeigte trotz biochemisch eindeutigen Defekts der Glucocerebrosidase-Aktivität noch keine Speicherphänomene. Die bereits pränatal oft deutliche morphologische Manifestation der Speicherprozesse bei Neurolipidosen zeigt, daß die postnatale Latenz der klinischen Erscheinungen während mehrerer Monate (bisweilen 1-2 Jahre) einem hohen Grad an zellulärer Kompensationsfähigkeit entspricht.

Schlüsselwörter: Fetale Neurolipidose - Ultrastruktur - Pränatale Diagnose

Einleitung

Die genetische Beratung bei unheilbaren Erbkrankheiten mit bekannten Stoffwechseldefekten führt heute nicht selten dazu, daß diese Erkrankungen bereits

pränatal diagnostiziert und die betroffenen Schwangerschaften wegen der für das Kind infausten Prognose unterbrochen werden. Nach der Abruptio sind spezifische Untersuchungen an den Feten aus folgenden Gründen wünschenswert:

1. Die Treffsicherheit der oft komplizierten biochemischen Tests, deren Ergebnisse schwerwiegende Konsequenzen haben, muß laufend überwacht werden, auch wenn die Speziellabors viel Erfahrung haben (Galjaard 1980).
2. Die pränatalen Stadien der genetischen Stoffwechselerkrankungen sind noch wenig erforscht; sowohl die frühen biochemischen als auch die morphologischen Auswirkungen sind für das Verständnis der Pathogenese wichtig. Die Elektronenmikroskopie hat an der Aufklärung dieser Vorgänge wesentlichen Anteil. Die Mehrzahl der hier untersuchten Neurolipidosen gehören zu den lysosomalen Speicherkrankheiten. Das Speicherlysosom als sekundäres Lysosom ist mit zahlreichen ultrastrukturellen Variationen der Stoffspeicherung morphologischer Ausdruck der Stoffwechselstörung. Die genetisch bedingte, katabole Insuffizienz des Lipidabbaus führt zur Lipidablagerung in diesen lysosomalen Speicherkörpern in Neuronen und Gliazellen; gleichzeitig können mesenchymale und verschiedene parenchymatöse Zellen betroffen sein. Im Gehirn selbst führt die Stoffspeicherung zur Zellblähung und Dystrophie in der grauen und/oder weißen Substanz, schließlich zum Substanzverlust und in jedem Fall zur Störung und zum Verlust neurologischer Funktionen. Biochemisch lassen sich zwei Hauptgruppen der Neurolipidosen unterscheiden, die Gangliosidosen mit Hauptort der Manifestation in den Nervenzellen und die lipidotischen Leukodystrophien mit Befall vorwiegend der Marksubstanz. Pränatal liegen oft schon im 2. Trimenon biochemisch und morphologisch faßbare Lipidanhäufungen vor, die quantitativ meist geringer als beim postnatalen Vollbild der Erkrankung ausfallen.

Die pränatale biochemische Diagnose bei den in dieser Studie untersuchten Feten mit Neurolipidosen erfolgte – außer bei dem Feten mit Morbus Niemann-Pick Typ C – in der Amnionzellkultur nach Fruchtwasserpunktion im 2. Trimenon. Die morphologischen Untersuchungen bestätigten in allen Fällen (außer einem, bei dem aber die biochemische Bestätigung möglich war) die Diagnosen.

Methodik

Die biochemischen Methoden der Pränataldiagnostik sind in der in Tabelle 1 zitierten Literatur enthalten.

Zur morphologischen Untersuchung wurde von fetalen Gewebsstücken ausgegangen, die primär fixiert in gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung (Pease 1964) vorlagen. Die Gewebezteile wurden in 2×1 mm große Zylinder unterteilt, in 1%iger gepufferter OsO₄-Lösung nachfixiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxid in Araldit eingebettet. Nach der lichtmikroskopischen Durchsicht der mit Toluidinblau gefärbten Semidünnsschnitte (Schnittdicke 1 µm) und Auswahl von Sektoren für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Ultradünnsschnitte von 0,05 µm Schnittdicke (Ultramikrotom Porter-Blum MT 2) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen aufgefangen. Blockkontrastierung mit gesättigter alkoholischer Uranylacetatlösung. Schnittkontrastierung mit Bleizitratlösung. Durchsicht der Schnitte und Herstellung von Aufnahmen em EM 10B (Zeiss). Herstellung von Vergrößerungen nach dem Ilfoprintverfahren.

Tabelle 1. Pränatale biochemische Diagnose der untersuchten fetalen Neurolipidosen. Alle Enzymwerte als nMol gespaltenes Substrat je Stunde je mg Amnionzell- oder fetales Organprotein

Nr. der Familie bzw. des Feten	Erkrankung	Punktionswoche und Woche bei Interrupvio	Enzymaktivität in kult. Amnionzellen ^a (Kontrolle in Klammern)	Bestätigung am Feten	Literatur
1	GM ₂ -Gangliosidose Typ 2	23/25.	Total β -Hexosaminidase 100 (1150)	Total β -Hexosaminidase Hirn: 50 (1350)	Harzer et al. (1975)
2a	M. Krabbe	17/21.	Cerebrosid- β -Galaktosidase 0,025 (0,08)	Cerebrosid- β -Galaktosidase Leber: 0,06 (1,20)	Harzer et al. (1976)
			0,04 (0,88)	Hirn: 0,03 (1,35)	Harzer (1979)
2b	M. Krabbe	15/20.	0,07 (0,6)	Hirn: <0,05 (1,4)	
3	M. Krabbe	16/19.	<0,03 (0,9)	Leber: 0,05 (1,3)	Harzer (1977)
4	GM ₁ -Gangliosidose	17/24.	Saure β -Galaktosidase 2,38 (235,0)	Saure β -Galaktosidase Hirn: 3,47 (89)	Harzer (1979)
5a	Metachromatische Leukodystrophie	16/21.	Arylsulfatase A 1,0 (60,2)	Cerebrosidsulfatase Leber: 0 (1,83)	Harzer und Hayashi (1981)
			(96,3)		Dubois et al. (1977)
5b	Metachromatische Leukodystrophie	16/21.	Arylsulfatase A 5,1 (105)	Arylsulfatase A Niere: <4,15 (19,5)	
			7,7		
6a	Metachromatische Leukodystrophie	20/21.	Arylsulfatase A 4,4 (73)	Arylsulfatase A Niere: 3,5 (20,5)	Harzer und Hayashi (1981)
6b	Metachromatische Leukodystrophie	16/21.	Arylsulfatase A 3,1 (65)	Arylsulfatase A Niere: 6,4 (35)	Harzer (1979)
7	M. Niemann-Pick Typ C	20/21.	Sphingomyelinase 5,1-5,4 (9,6)	Sphingomyelinase Leber: 0,74-0,8 (1,7-1,8)	Harzer et al. (1977)
			3,1-4,0 (8,0)	Hirn: 0,65-1,05 (0,65-1,65)	Harzer et al. (1978)
8	M. Gaucher	16/19.	Glucocerebrosidase 1,8-2,4 (30)	Glucocerebrosidase Leber: 0,64-0,88 (13,5)	Harzer (1980)
				Fet. Hautfibroblasten: 0,35-0,45 (37)	Heilbrunner et al. (1981)

^a Die Aktivitätswerte sind zum Teil aus den Daten in den zitierten Originalarbeiten zur besseren Übersicht umgerechnet

Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Sulfatiden bei metachromatischer Leukodystrophie wurden Gefrierschnitte hergestellt und nach der Methode von Benz und Harzer (1974) mit Pseudoisocyaninchlorid angefärbt. Die Anregung mit langwelligem UV-Licht führt zu einer orangefarbenen Fluoreszenz des Farbstoff-Sulfatid-Komplexes.

Kasuistik

In Tabelle 1 ist eine Übersicht über die pränatalen Diagnosen von Neurolipidosen in den 8 Risikofamilien gegeben, deren Krankheitsgeschichte zumeist in den in der Tabelle zitierten Literaturstellen zu finden sind. Es folgt eine gekürzte Übersicht über wichtige klinische Daten in den Risikofamilien. Numerierung und Krankheitsbezeichnung vgl. Tabelle 1.

Familie 1. Beim ersten, mit 3½ Jahren verstorbenen Kind im Alter von 1½ Jahren extremer psychostatomotorischer Entwicklungsrückstand, Krampfanfälle. Das Mädchen hob den Kopf nicht, der vergrößert erschien, es stand und saß nicht und ergriff keine Gegenstände. Spastik aller Extremitäten. Am Augenhintergrund in der Makula „kirschroter Fleck“ als Zeichen einer Netzhautdegeneration; Opticusatrophie. EEG: Allgemeinveränderungen, keine Krampfwellen. Keine biochemische Diagnostik; „kirschroter Fleck“ am Augenhintergrund als typisches, aber nicht beweisendes Zeichen für eine GM₂-Gangliosidose. Die in der 23. Woche erneut schwangere Mutter kam zur pränatalen Untersuchung. Erst unmittelbar unter dem Eindruck des Todes ihres Kindes erkundigten sich die Eltern nach der pränatalen Diagnostik. Die Untersuchung von Fruchtwasser und Amnionzellkultur erfolgte auf Verdacht hin. Es ergab sich ein über 90%iger Defekt der beiden Hexosaminidasen A und B, somit war die pränatale Diagnose GM₂-Gangliosidose Typ 2 gestellt.

Familie 2. Das erste Kind entwickelte sich bis zum Alter von drei Monaten unauffällig. Im Alter von fünf Monaten Nervenleitgeschwindigkeit stark verlangsamt, Liquor-Eiweißgehalt erhöht (auf über 100 mg%). Erweiterung der Hirnkammern. Schreiattacken, Spastik, Überstreckhaltung des Kopfes, Krampfanfälle. Die Untersuchung eines Leukozytenkonzentrats ergab bei 95%igem Mangel der Aktivität der Cerebrosid-β-Galaktosidase die Diagnose Morbus Krabbe. Tod mit 1¾ Jahren im unbeeinflußbaren zentralen bedingten Fieberschub. In der 17. Woche der zweiten Schwangerschaft der Mutter diagnostische Fruchtwasserpunktion. In der nach 3 Wochen aus dem Fruchtwasser gezüchteten Amnionzellkultur fand sich ein 94%iger Defekt der Cerebrosid-β-Galaktosidase. Schwangerschaftsunterbrechung komplikationslos in der 21. Woche. Eine dritte Schwangerschaft wurde ausgetragen und führte zu einem gesunden, inzwischen dreijährigen Mädchen. Nach Amniozentese in der 17. Schwangerschaftswoche war in den gezüchteten Amnionzellen eine Enzymaktivität von 55% der Norm festgestellt worden. Dieser Wert entsprach einem heterozygoten (nicht krankheitsauslösenden) Zustand. Bei einer vierten Schwangerschaft wurde nach Amniozentese in der 15. Woche in der Amnionzellkultur ein über 95%iger Enzymdefekt festgestellt. Die Schwangerschaft wurde in der 20. Woche unterbrochen und die Diagnose wie bei der zweiten Schwangerschaft am Feten enzymatisch bestätigt.

Familie 3. Zwei von fünf Kindern waren an Morbus Krabbe verstorben, bei einem war die Diagnose enzymatisch gesichert worden. In der 16. Woche der dritten Schwangerschaft Amniozentese; stark verminderte Aktivität der Cerebrosid-β-Galaktosidase in der zwei Wochen später untersuchten Amnionzellkultur. Schwangerschaft in der 19. Woche unterbrochen. Die stark herabgesetzte Enzymaktivität konnte in fetalem Leber- und Hirngewebe bestätigt werden.

Familie 4. Das erste Kind soll von Geburt an in seiner Entwicklung gestört gewesen sein. Der 8½ Monate alte Junge war blaß, untergewichtig, hatte eine auffallende Facies. Ange deuteter Exophthalmus, Hydrozelen beidseits, Vergrößerung von Leber und Milz. Das Kind zeigte allgemeine Muskelhypotonie, bewegte die Arme stereotyp. Bei Verdacht auf Speicherkrankheit Suralbiopsie sowie Laparoskopie mit Leberbiopsie: Elektronenmikroskopische Untersuchung am Institut für pathologische Anatomie der Universität Zürich ergab für das Leber-

punktat wie für die Suralisbiopsie einen „am ehesten mit dem Vorliegen einer GM₁-Gangliosidose zu vereinbarenden Befund“. Biochemisch wurde die Diagnose nicht abgesichert. Im Alter von 13 Monaten kam das Kind mit generalisierten Krampfanfällen in die Kinderklinik Hagen. Das EEG zeigte Allgemeinveränderungen mit multizentrischen Spikes. Augenärztlich Verdacht auf Makulopathie im Sinne eines „kirsroten Flecks“. Tod mit 14 Monaten. Eine zweite Schwangerschaft endete mit Spontanabort. Bei einer dritten Schwangerschaft in der 17. Woche Fruchtwasserpunktion; biochemisch in der Amnionzellkultur auf 1% der Kontrolle reduzierte Aktivität der sauren β -Galaktosidase. Schwangerschaftsunterbrechung in der 22. Woche. Im Gehirn des Feten wurde derselbe Enzymdefekt und eine auf das dreifache erhöhte Menge an GM₁-Gangliosid gefunden.

Bei einer weiteren Schwangerschaft mit Amniozentese erst in der 26. Schwangerschaftswoche (?) in der Amnionzellkultur gegenüber den Kontrollkulturen auf 38% erniedrigte, ausreichende (heterozygote) Enzymaktivität. Das Kind zeigt als Carrier für GM₁-Gangliosidose bis zum jetzigen Alter von 1½ Jahren keinerlei Krankheitssymptome.

Familie 5. Das erste Kind kam im Alter von 2 Jahren in die Universitätskinderklinik Düsseldorf. Das Mädchen hatte verspätet Sitzen gelernt und wiederholt Krampfanfälle erlitten. Auffällige Standunsicherheit in Valgusstellung, ataktischer Gang, Strabismus divergens. Motorische Nervenleitgeschwindigkeit deutlich vermindert. Im Liquor „mäßige Eiweißerhöhung“. Am Augenhintergrund „diskrete degenerative Veränderungen“. Die Verdachtsdiagnose Metachromatische Leukodystrophie (MLD) wurde bestätigt durch Nachweis einer auf 2% der Kontrolle verringerten Aktivität der Arylsulfatase A in den Leukozyten. Die Mutter des Mädchens wurde erneut schwanger. Amniozentese in der 16. Woche. In der Amnionzellkultur war die Aktivität der Arylsulfatase A bis auf 1,5% der Norm vermindert. Schwangerschaft in der 21. Woche unterbrochen. Im fetalen Lebergewebe Nachweis eines kompletten Defekts der für MLD hochspezifischen Enzymaktivität (Cerebrosid-Sulfatase; = Arylsulfatase A mit natürlichem Lipidsubstrat). Bei einer weiteren Schwangerschaft nach Amniozentese in der 16. Woche wiederum in der Amnionzellkultur eine starke Verminderung der Aktivität der Arylsulfatase A auf ca. 6% der Norm. Interrupcio in der 21. Schwangerschaftswoche. Am Feten Bestätigung des Enzymdefekts. Durch Lipiddünnschichtchromatographie wurde zusätzlich in der Niere eine ca. 5fache Sulfatidvermehrung (Sulfatid = Speicherlipid bei MLD) festgestellt.

Familie 6. Als die Mutter in der 20. Woche schwanger war, wurde bekannt, daß ihre vierjährige Tochter eine Gangataxie, Augenmuskelzittern, Areflexie an Armen und Beinen zeigte. Am Nervus peroneus betrug die Nervenleitgeschwindigkeit nur 18,5 m/s (stark erniedrigt). Das Kind saß und sprach nicht mehr, hatte Krampfanfälle, Muskelatrophie, Spitzfußstellung, Strabismus divergens, folgte nicht mit den Augen. Augenärztlich: Geringes Makulaödem, diskreter „kirsroter Fleck“. Erst jetzt wurde im Urin biochemisch ein kompletter Defekt der Arylsulfatase A festgestellt; die Diagnose MLD führte zur pränatalen Diagnostik bei der Mutter: Sofortige Amniozentese. Im zellfreien Fruchtwasser fand sich ein 95%iger Defekt der Arylsulfatase-A-Aktivität, worauf die Schwangerschaft unterbrochen wurde. Die Metachromatische Leukodystrophie des Feten wurde bestätigt durch Nachweis eines 94%igen Defekts der Arylsulfatase-A-Aktivität in der später verfügbaren Amnionzellkultur und einen ca. 80%igen Aktivitätsdefekt der Arylsulfatase A in der fetalen Niere. Hier 5fache Sulfatidvermehrung gegenüber fetalem Kontrollgewebe. Bei einer weiteren Schwangerschaft (zwei Jahre später) in der 16. Woche Amniozentese; in der Amnionzellkultur wieder ein 95%iger Defekt der Arylsulfatase A; Schwangerschaft in der 21. Woche unterbrochen. Die biochemische Aufarbeitung der fetalen Niere führte zur Bestätigung der MLD des Feten.

Familie 7. Das erste Kind entwickelte sich bis zu seinem 2. Lebensjahr unauffällig. Dann allmählich Rückstand der sprachlichen sowie motorischen Entwicklung. Mit 2½ Jahren Spastik der Extremitäten, myoklonische Zuckungen der rechten Hand und Hypotonie der Rumpfmuskulatur. Hyper- und Areflexie bestanden nebeneinander, Leber und Milz waren deutlich vergrößert. Ophthalmologisch blasse Papille, kein „kirsroter Fleck“. MLD, Gangliosidose und Morbus Krabbe wurden durch Enzymtests ausgeschlossen. In der Submukosa einer Rektumbiopsie wurden reichlich PAS-positive Speicherzellen gefunden, im Knochenmark zahlreiche Schaumzellen mit unterschiedlich großen Vakuolen; in den Leukozyten leicht

erniedrigte Aktivität der Sphingomyelinase und Glucocerebrosidase. Diagnose einer Speicherkrankheit, Verdacht auf Morbus Niemann-Pick Typ C (atypische neuroviszrale Lipidose). Als die Mutter wieder schwanger war, wurde nach Fruchtwasserpunktion in der 20. Woche eine Aktivität der Sphingomyelinase von 55% der Norm im zellfreien Überstand gefunden. Die Schwangerschaft wurde in der 21. Schwangerschaftswoche unterbrochen. Nach weiteren zwei Wochen war die Amnionzellkultur verfügbar. Die Sphingomyelinase-Aktivität war im Vergleich zu Kontrollkulturen auf 44% erniedrigt. In der fetalen Leber fand man gespeichertes Sphingomyelin („Niemann-Pick-Lipid“; 1,65% des Trockengewichts im Vergleich zu 0,8% bei einem Kontrollfeten) und Vermehrung anderer Lipide (Glucocerebrosid, Cholesterin, Lysobisphosphatidsäure) sowie um ca. 50% herabgesetzte Sphingomyelinase- und Glucocerebrosidase-Aktivität. Diese Befunde erlaubten die Diagnose eines Morbus-Niemann-Pick Typ C beim Feten. Das kranke Geschwister-Kind starb im Alter von 4½ Jahren im Anschluß an eine Fieberattacke. Postmortal wurde die Diagnose eines Morbus-Niemann-Pick Typ C biochemisch bestätigt. Die pränatale Diagnose in dieser Familie erscheint rückblickend problematisch und kann bei Verdacht auf den Typ C des Morbus-Niemann-Pick nicht grundsätzlich empfohlen werden.

Familie 8. Die Eltern des erst-erkrankten Kindes sind Blutsverwandte zweiten Grades. Im Alter von zwei Jahren wurde bei dem Kind die bis ins kleine Becken reichende Milz extirpiert. Histologische Diagnose: Morbus Gaucher. Im weiteren Verlauf Blutungsanämie und hochfieberhafte Infekte, Tod im Alter von 4 Jahren. Bei der jetzigen Schwangerschaft Amnionzente in der 16. Woche. In den kultivierten Amnionzellen betrug die Restaktivität der Cerebrosid- β -Glucosidase (Gaucher-Enzym) 6% der Kontrollen und lag somit im Bereich der für den Morbus Gaucher bekannten Werte. Abbruch der Schwangerschaft in der 19. Woche. Die pränatale Diagnose wurde am Feten durch Nachweis des Enzymdefekts im Lebergewebe und in den aus Fascia lata gezüchteten Fibroblasten bestätigt.

Ergebnis der morphologischen Untersuchungen

Die enzymatischen Befunde, die zur Diagnose in den vorliegenden Fällen führten, waren bereits während der Risikoschwangerschaften erhoben worden und lagen vor; die wichtigsten Meßwerte und ihre Quellen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die morphologischen, meist ultrastrukturellen Befunde dokumentieren bei fast allen Feten mit Lipidosen den schon im Gang befindlichen Speicherprozeß. Eine nicht immer optimale Strukturerhaltung nach der therapeutischen Unterbrechung durch späte Fixierung oder Kontakt mit Spülösungen mußte in Kauf genommen werden.

Fet 1: GM₂-Gangliosidose, Typ 2 (= Variante 0)

Zur Untersuchung stand nur Großhirnrinde zur Verfügung. Die meisten Zellen und Zellteile sind infolge artifizieller Schwellung vakuolär umgewandelt, einige Zellfortsätze zeigen noch relativ gut erhaltene Plasmaprozesse. In diesen Zellteilen treten runde Einschlüsse auf, die zirkulär geschichtete Lamellenpakete enthalten (Abb. 1). Der Periodenabstand der Lamellen beträgt 12 nm.

Fet 2a: Morbus Krabbe, Globoidzell-Leukodystrophie

Zur Untersuchung standen Großhirnteile, Kleinhirn und Rückenmark zur Verfügung. Die von Groß- und Kleinhirn hergestellten Präparate sind licht- und elektronenmikroskopisch unauffällig. Im Rückenmark finden sich zahlreiche

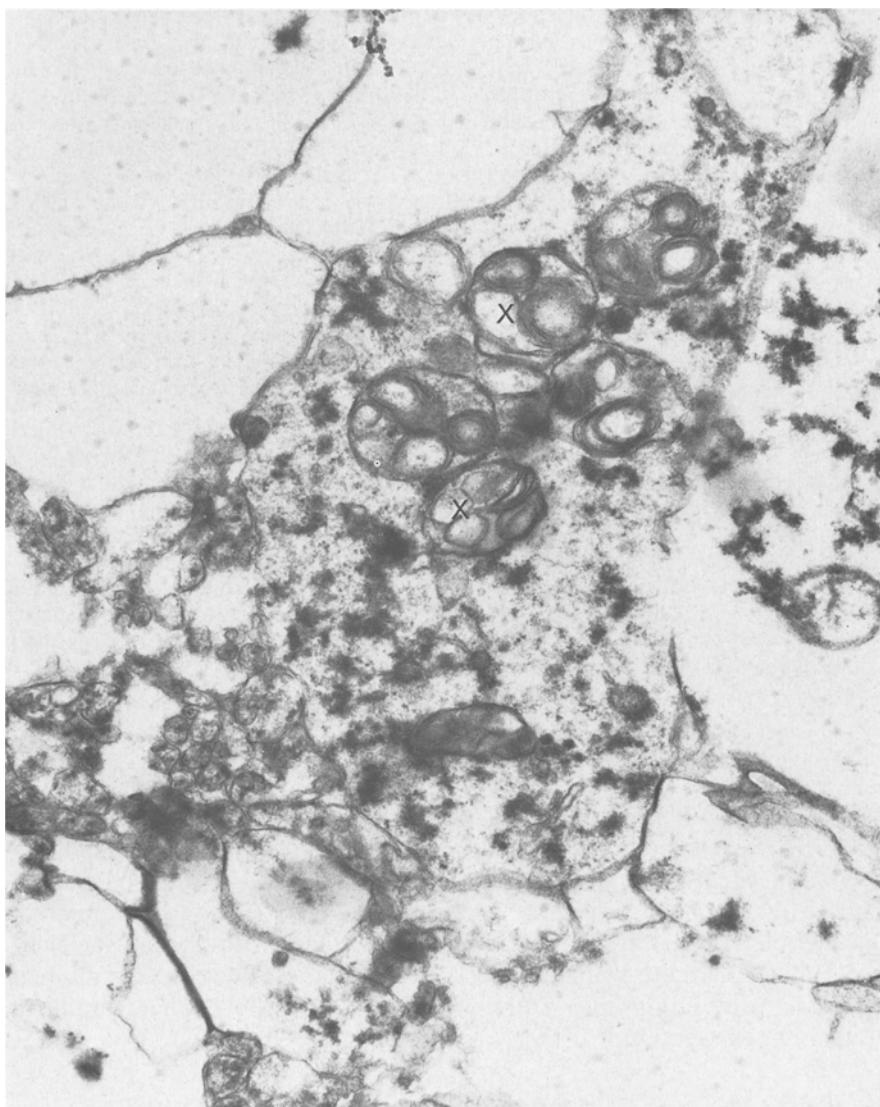


Abb. 1. Zirkulär geschichtete Lamellenpakete (meist 3–4) enthaltende Einschlußkörper (X) in Zellfortsätzen der Großhirnrinde von Fet Nr. 1 (GM₂-Gangliosidose Typ 2). Vergrößerung: $\times 36\,000$

mehrkernige plasmareiche Zellen mit unregelmäßigen Konturen inmitten des spongiös aufgelockerten Gewebes, teils in deutlicher Beziehung zu Blutgefäßen (lichtmikroskopisch dokumentiert bei Harzer et al. 1976). elektronenmikroskopisch enthalten diese Zellen Phagosomen mit Myelinfiguren verschiedener Form (Abb. 2). Deren variierende Gestalt spricht für eine Entstehung durch Phagozytose von zerfallendem Myelin und gegen Speicherkörper.

Die Zellen enthalten Einschlußkörper mit linearen, teils gestreckt, teils gebogen verlaufenden Strukturen ohne regelmäßige Periodenabstände. Sie ent-

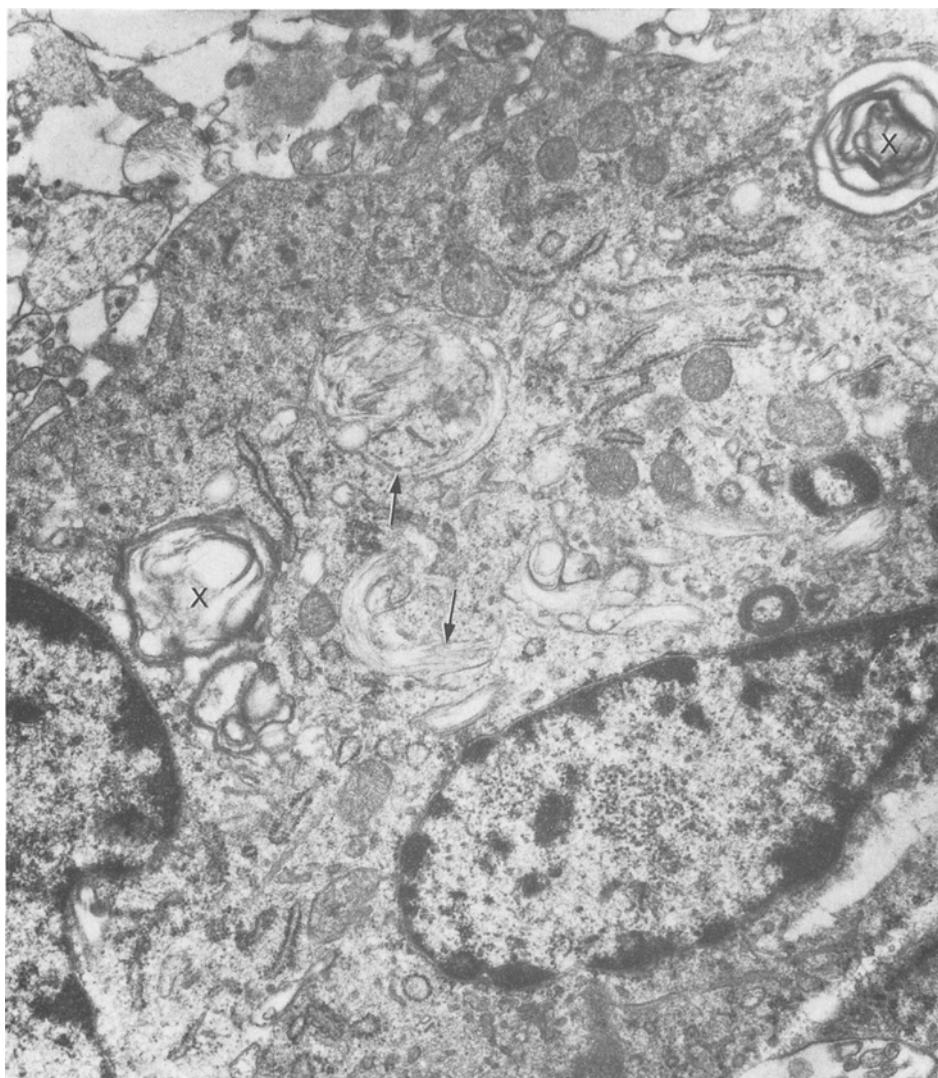


Abb. 2. Globoidzelle im Rückenmark von Fet Nr. 2a (Morbus Krabbe). Oberhalb der beiden Kerne die linearen bzw. lamellären strähnigen Einschlußkörper (↓). Daneben Myelinfiguren (X). Vergrößerung: $\times 31\,500$

sprechen den bei Morbus Krabbe beschriebenen linearen bzw. lamellären Zelleinschlüssen. Deren lamellärer Charakter gibt sich daran zu erkennen, daß neben den Linien auch flächenhafte Strukturen mit unscharfen Grenzen als Anschnittprofile vorkommen. Die mehrkernigen Zellen sind reich an granulärem endoplasmatischen Retikulum und Ribosomen, sie entsprechen nach Form, Größe und Kerngestalt mehrkernigen mikroglialen Zellen (Globoidzellen). In der Umgebung der mehrkernigen Zellen finden sich reichlich markhaltige Nervenfasern, die teilweise im Zerfall begriffen sind.

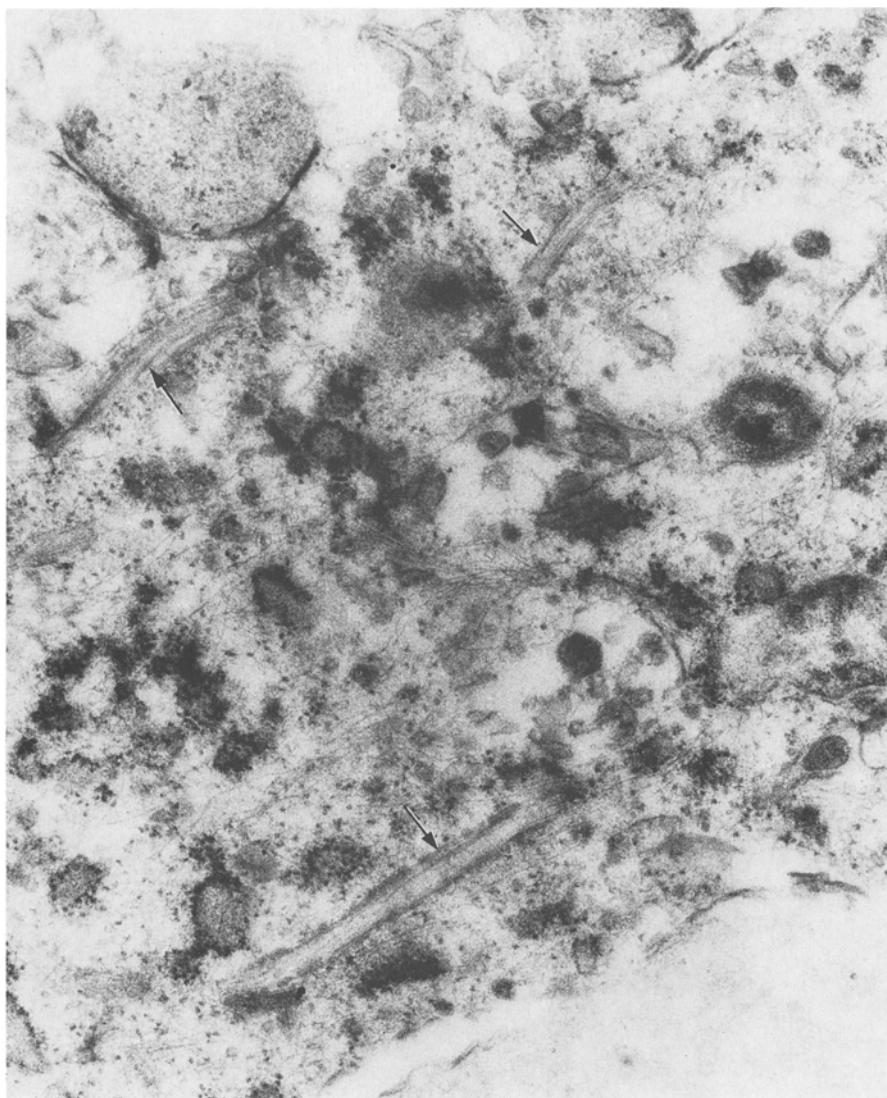


Abb. 3. „Spießförmige“ fädige Einschlußkörper (!) in Globoidzelle im Rückenmark von Fet Nr. 2b (Morbus Krabbe). Reichlich endoplasmatisches Retikulum. Vergrößerung: $\times 60\,000$

Fet 2b: Morbus Krabbe

Bei dem Geschwisterfeten des oben beschriebenen lagen zur Untersuchung Großhirnteile und Rückenmark vor. Das Großhirn ist sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch unauffällig. Dagegen treten im Rückenmark mehrkernige mikrogliale Zellen auf, die elektronenmikroskopisch reich an granulärem endoplasmatischen Retikulum sind und langgestreckte oder leicht gebogene Einschlußkörper mit fädiger bzw. lamellärer Struktur enthalten (Abb. 3). Die Lamellen sind unregelmäßig angeordnet und teilweise nur randständig zu finden.

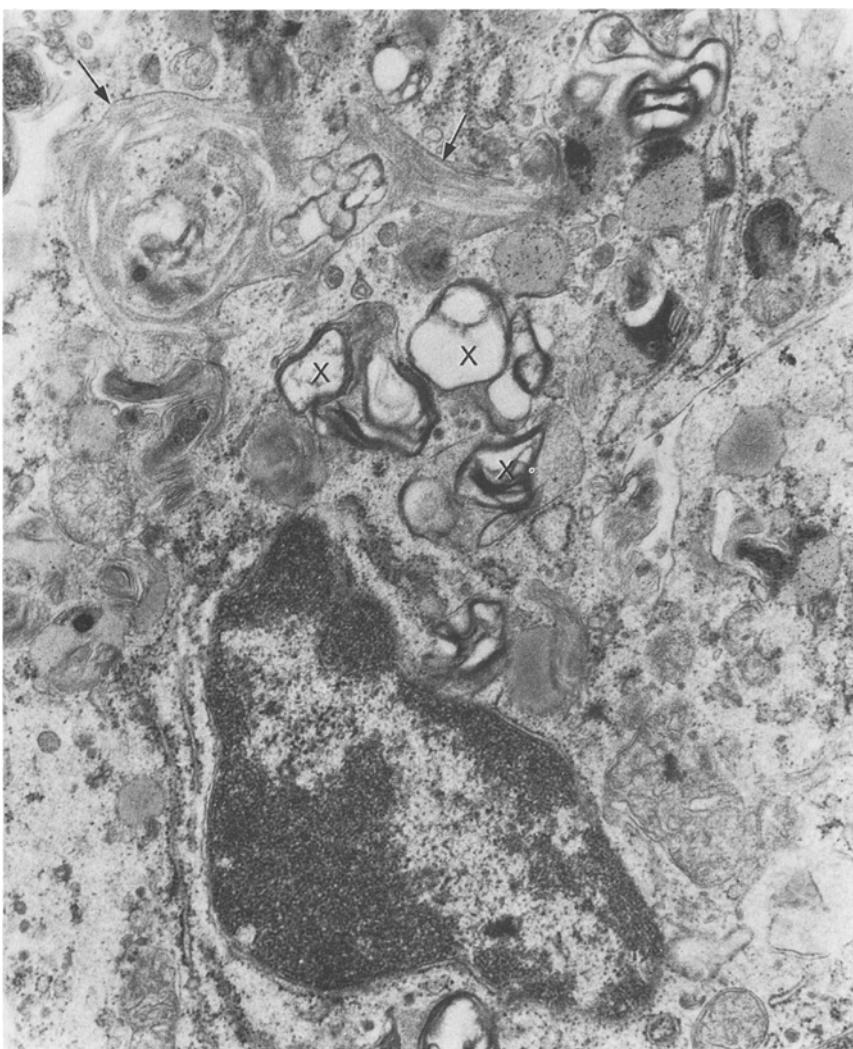


Abb. 4. Gebogene strähnige Einschlußkörper (↓) in Globoidzelle im Rückenmark von Fet Nr. 3 (Morbus Krabbe). Daneben zahlreiche Myelinfiguren (X). Vergrößerung: $\times 20\,000$

Fet 3: Morbus Krabbe

Untersucht wurde das Rückenmark. Lichtmikroskopisch sieht man in der Marksubstanz einzelne markhaltige Nervenfasern und reichlich Gliazellen, überwiegend Mikrogliazellen. Unter diesen kommen mehrkernige plasmareiche Elemente vor (Globoidzellen). Elektronenmikroskopisch enthalten sie neben Myelinabbauprodukten längliche und rundliche Einschlußkörper mit linearen, gestreckt oder zirkulär verlaufenden oder verzweigten Strukturen ohne regelmäßigen Periodenabstand (Abb. 4). Mehrfach trifft man auf markhaltige Nervenfasern, die teilweise lamellär aufgesplittert sind, jedoch ohne Myelinballenbildung, vermutlich handelt es sich um Artefakte. In der Umgebung der Mark-

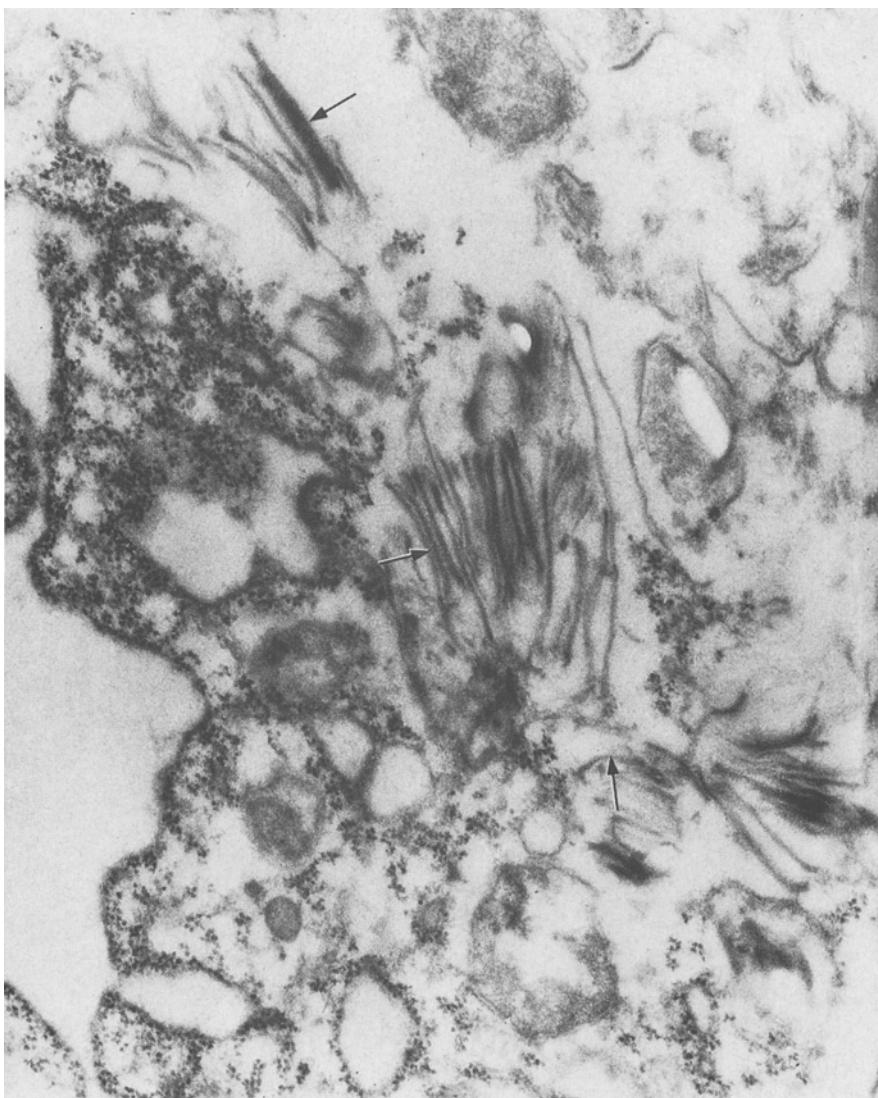
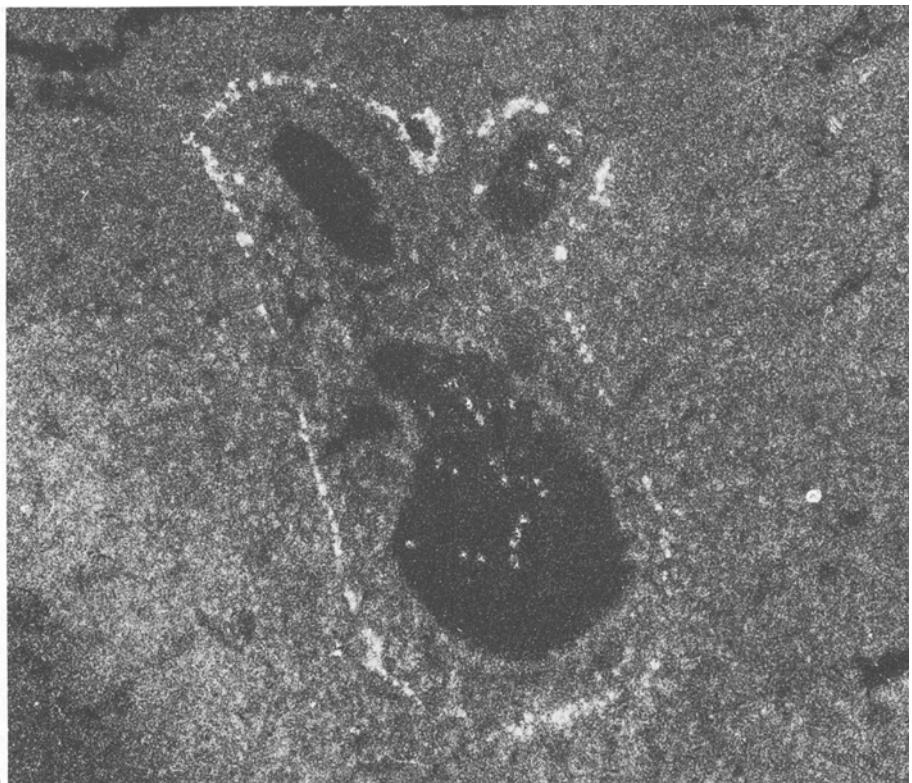


Abb. 5. Speicherkörper („Zebratyp“) in Form parallel geschichteter Stapel (↓), im rechten unteren Bildrand von unvollständiger Membran umgeben, in einer Nervenzelle des Hirnstamms von Fet Nr. 4 (GM₁-Gangliosidose). Daneben erweitertes endoplasmatisches Retikulum. Vergrößerung: $\times 60\,000$

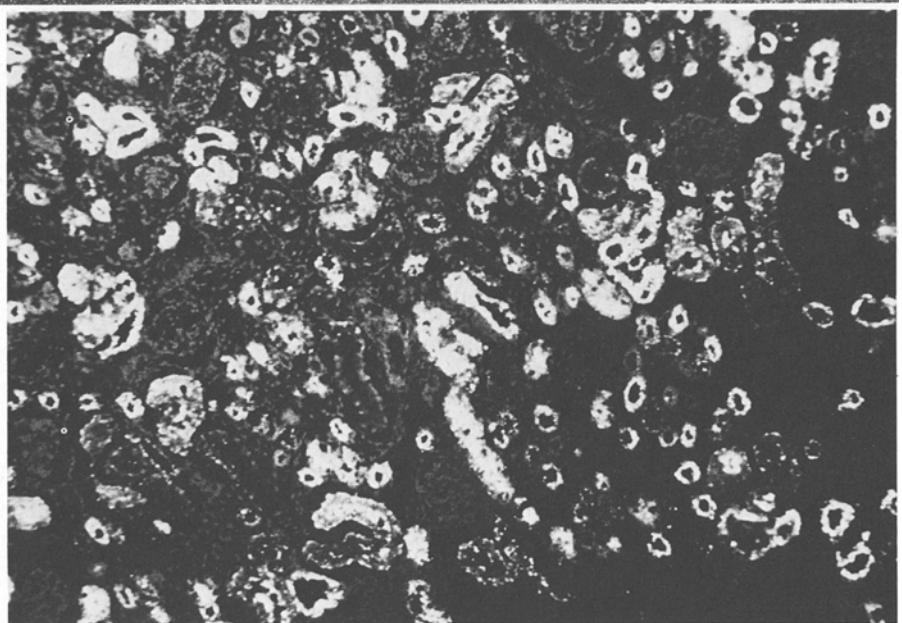
fasern kommen reife Synapsen vor, die präsynaptischen Anteile sind von Bläschen erfüllt, postsynaptisch finden sich Dendritenanteile.

Fet 4: GM₁-Gangliosidose

Es standen zur Verfügung Lunge, Großhirnrinde, Hirnstamm, Rückenmark (weiße Substanz), Niere, Leber und Milz. Nur Hirnstamm und Milz sind mor-



6



7

Abb. 6. Leber von Fet Nr. 5a mit metachromatischer Leukodystrophie. In der Grenzmembran des Glisson'schen Dreiecks zum Parenchym findet sich mit der Fluoreszenztechnik nach Pseudoisocyaninfärbung dargestelltes metachromatisches Material. Der hell aufleuchtende Saum dürfte Sulfatid-Ablagerungen entsprechen. Vergrößerung: $\times 70$

Abb. 7. Niere von Fet Nr. 5a. Wie in Abb. 9 wurde das metachromatische Material in den Nierentubuli dargestellt. Vergrößerung: $\times 20$

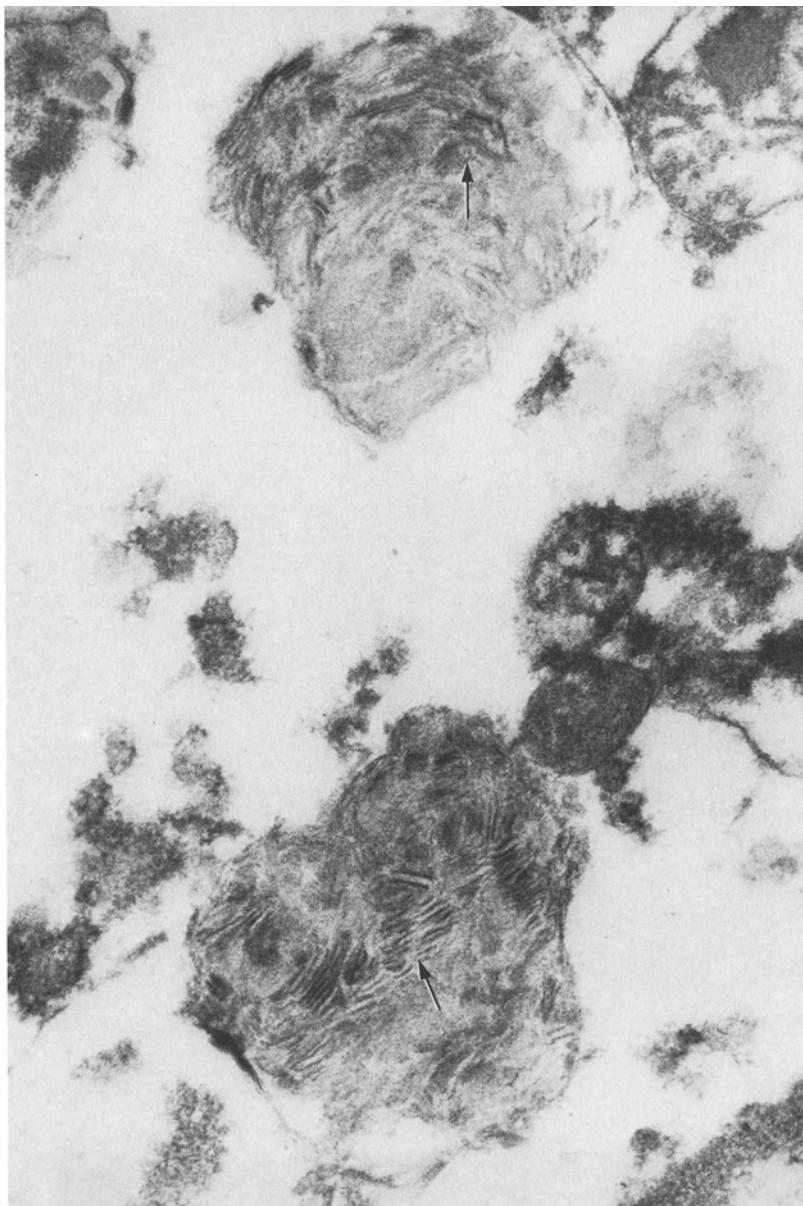


Abb. 8. Unregelmäßig begrenzte Speicherkörper in autolytisch veränderter Nierentubuluszelle von Fet Nr. 5a (metachromatische Leukodystrophie). Sie enthalten neben dichter granulärer Matrix hauptsächlich parallel, aber auch divergierend orientierte linerare Strukturen (↓). Vergrößerung: $\times 80\,000$

phologisch auffällig. Im Hirnstamm findet man einige relativ gut erhaltene Nervenzellen mit erweitertem endoplasmatischen Retikulum. Eine derartige Zelle enthält Stapel parallel geschichteter Linien bzw. Lamellen (Abb. 5). Die Lamellen sind nicht so gleichmäßig angeordnet, daß sich ein Periodenabstand



Abb. 9. Speicherkörper von „Zebratyp“: meist parallel geschichtete, teils gerade, teils gebogene Lamellenstapel (X) verschiedener Breite und Höhe. Sie befinden sich im Zytoplasma einer Nierentubuluszelle von Fet Nr. 6a (metachromatische Leukodystrophie). Vergrößerung: $\times 50\,000$

angeben ließe. Ein Lamellenkörper ist von einer unvollständigen Membran umschlossen, die die lysosomale Natur der Speicherkörper anzeigt. Bei den anderen Speicherkörpern ist die Hüllmembran wahrscheinlich durch Autolyse zerfallen. Die gefundenen Lamellenkörper entsprechen dem für die GM₁-Gangliosidose typischen Zebratyp.

In der Milz fallen bei schwacher Vergrößerung voluminöse Zellen mit multiplen Vakuolen verschiedener Größe auf. Einige dieser Zellen sind durch Schrumpfung verkleinert und verdichtet, die Vakuolen sind hier besonders dicht gelagert. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man in den Vakuolen Reste eines amorphen Materials sowie kleine Granula. Diese vakuolären Einschlüsse sind charakteristisch für die GM₁-Gangliosidose.

Fet 5a: Metachromatische Leukodystrophie

Lichtmikroskopisch ist das Speichermaterial in den Glissonschen Dreiecken der Leber und in den Nierentubuli und Sammelrohren durch seine metachromatische Eigenschaft deutlich darstellbar (Abb. 6 und 7). Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung lag nur Material aus der Niere vor. In den Tubuluszellen finden sich (Abb. 8) unregelmäßig begrenzte, von Membranen umschlossene Speicherkörper, auffälligerweise nur in den Tubuluszellen mit Mikrovilli. Der Inhalt der Speicherkörper besteht aus in verschiedenen Richtungen angeordneten linearen oder multilinaren Strukturen. Dazwischen findet sich granuläre Matrix.

Fet 5b: Metachromatische Leukodystrophie

Bei dem Geschwisterfeten von Fet 5a wurden Niere, Leber, Gehirn und Rückenmark untersucht. Elektronenmikroskopisch enthalten die Tubuluszellen der Niere reichlich Mitochondrien, zwischen denen unregelmäßig begrenzte, etwas größere membranumgrenzte Einschlüsse mit dichter granulärer Matrix und parallel oder divergierend orientierte, unregelmäßig verteilte lineare Strukturen angetroffen werden. Diese Einschlüsse treten nur in einer relativ kleinen Zahl von Tubuluszellen auf. In einzelnen Epithelzellen der Sammelrohre finden sich intracytoplasmatische runde Einschlüsse mit zirkulär angeordneten Doppellinien. Sie sind nicht membranumgrenzt. Die übrigen Organe sind unauffällig.

Fet 6a: Metachromatische Leukodystrophie

Zur Verfügung stand Material aus Kleinhirn, Großhirn, Medulla oblongata, Rückenmark, Nebenniere, Niere, Leber, Retina sowie Hypophyse. Eindeutige Speicherungsprozesse zeigt nur die Niere; in den Tubuluszellen der Nierentubuli, die keine Mikrovilli bilden (im Gegensatz zur Niere beim Feten Nr. 5a, siehe dort) treten gehäuft multilamelläre Körper auf, die teils längs-, teils quer geschichtet erscheinen (Zebrakörpertyp). Bei stärkerer Vergrößerung bestehen diese Körper aus breiten und schmalen Linien in meist unregelmäßiger Folge (Abb. 9). Bei regelmäßiger Schichtung lässt sich ein Periodenabstand von 30 nm

bestimmen. In der Medulla oblongata mehrere bereits bemerkte Axone ohne Anzeichen für einen Myelinzerfall. Geschwisterfet Nr. 6b wurde nicht morphologisch untersucht und nur der Vollständigkeit halber in Tabelle und Kasuistik aufgenommen.

Fet 7: Morbus-Niemann-Pick Typ C

Untersucht wurden Stammganglien, Hirnstamm, Rückenmark und Kleinhirn. In den Stammganglien enthalten einzelne große Nervenzellen mit voluminösen Nukleoli multiple intrazytoplasmatische membranöse Einschlüsse mit unregelmäßiger zirkulärer Schichtung. Die Nervenzellen sind reich an Ribosomen und enthalten nur relativ wenige granuläre endoplasmatische Zisternen. Die Zellkerne sind unregelmäßig konfiguriert, die Kernmembran ist mehrfach invaginiert. Einige Nervenzellen im Rückenmark enthalten ebensolche Einschlüsse. Großhirn, Hirnstamm und Kleinhirn zeigen keine Besonderheiten.

Fet 8: Morbus Gaucher

Untersucht wurde nur Lebergewebe. Die Leberparenchymzellen zeigen aufgelockerte Plasmastruktur infolge Autolyse, die Zellgrenzen sind noch gut erkennbar. Die Mikrovilli sind gut erhalten. Die Zellen enthalten keine atypischen Organzellen oder Speicherkörper.

Diskussion

Die Ultrastruktur der Lipidspeicherkörper (meist sekundäre Lysosomen) bei Neurolipidosen ist vielfach untersucht worden (Terry 1970; Martin und Ceutrick 1978; Johannessen 1978).

Bei den vorwiegend neuronalen Speicherprozessen (GM_2 -Gangliosidosen, GM_1 -Gangliosidosen, Morbus-Niemann-Pick Typ A und C, Morbus Gaucher Typ 2) treten konzentrisch oder parallel, „zebraförmig“, geschichtete Einschlußkörper auf („membranous cytoplasmic bodies“, MCB; Samuels et al. 1963). Bei den nicht-neuronalen, leukodystrophischen Lipidspeicherprozessen findet man unterschiedliche Zelleinschlüsse; bei der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) treten Tuffstein- oder fischgrätenartige Einschlüsse in Oligodendrozyten und Schwannschen Zellen, aber auch in den Abräumzellen (Makrophagen) im Gehirn auf (Dulaney und Moser 1978). Bei Morbus Krabbe trifft man auf spießförmige, strähnige oder tubuläre Einschlüsse, jedoch nur in spezifischen Speicherzellen (Globoid- und Epitheloidzellen mikroglialer Herkunft) in degenerierenden Markbezirken und in den Schwannschen Zellen peripherer Nerven.

Begleitende extraneurale Speicherprozesse bei manchen Neurolipidosen führen zu Speicherkörpern wie MCB, amorphen oder granulären Einschlüssen in histiozytären Zellen von Milz, Leber, Lymphknoten beim Morbus-Niemann-Pick, Morbus Gaucher und GM_1 -Gangliosidose, oder zu membranösen, tuffsteinartigen Körpern in Nieren- und Leberparenchymzellen bei MLD.

Beim Fet 1 mit GM_2 -Gangliosidose Typ 2 (= Variante 0, Morbus Sandhoff, Aktivitätsdefekt der Hexosaminidasen A und B) gelang der Nachweis

von konzentrisch geschichteten MCB in der Hirnrinde (Abb. 1); die Größe der MCB erschien zwar gegenüber postnatalen Fällen geringer, entsprach aber sonst den bekannten Strukturen. Sie lassen sich als Anhäufungen von GM₂-Gangliosiden und weiteren Stoffen auffassen. Ein fetaler Vergleichsfall aus der Literatur (Nørby et al. 1980) zeigt nicht so deutlich geschichtete, jedoch ebenfalls membranbegrenzte Speicherkörper in Retina und Purkinjezellen des Kleinhirns, dagegen nicht in der Großhirnrinde.

Bei den Feten 2a, 2b und 3 mit Morbus Krabbe (Cerebrosid- β -Galaktosidase-Mangel) waren nur im Rückenmark, also in bereits myelinisierten Regionen, charakteristische ein- bis dreikernige Epitheloid- bzw. Globoidzellen, teils mit Gefäßbeziehung, zu entdecken. Sie enthielten völlig analog zu den postnatalen Verhältnissen spießförmige, strähnige und tubuläre Einschlüsse (Abb. 2-4), die vermutlich angehäuften Galaktocerebrosiden entsprachen. Der Befund stimmt mit pränatalen Beobachtungen anderer Autoren bei Morbus Krabbe überein (Ellis et al. 1973; Farrel et al. 1978; Okeda 1979; Martin et al. 1981). Okeda et al. fanden die genannten Einschlüsse in myelinisierten Gebieten des Lemniscus medialis, Pons, Nucleus gracilis, Medulla oblongata und Pyramidenbahn-Kreuzung. Das Vorkommen der spezifischen Speicherzellen ist bei Morbus Krabbe streng mit der fortschreitenden Myelinisierung korreliert. Wo noch kein Myelin gebildet ist, entstehen die Zellen offenbar nicht. Trotzdem scheint der Enzymdefekt schon vorher ein Ungleichgewicht der Myelinlipide herzurufen, so daß dieses instabil wird und wieder zerfällt.

Bei GM₁-Gangliosidose (Fet 4) trafen wir auf zebraartig parallel geschichtete intrazytoplasmatische Membraneinschlüsse in Nervenzellen des Hirnstamms (Abb. 5) und auf reichlich vakuoläre Einschlüsse in histiozytären Speicherzellen der Milz. Die intraneurale multilamellären membranumgrenzten Einschlüsse wurden in Vorderhornzellen auch von Kaback et al. (1973) gefunden, Lowden et al. (1973) beschrieben sie in Spinalganglienzellen und vereinzelt in der Großhirnrinde. Den multivakuolären Speicherzellen in der Milz lassen sich die von Lowden et al. beschriebenen Vakuolen in Nierenendothelzellen und Glomerulum-Deckzellen an die Seite stellen. Booth et al. (1973) beobachteten Vakuolen und elektronendichte Granula in den Leberzellen eines 20 Wochen alten Feten.

Bei metachromatischer Leukodystrophie, (MLD; Defekt der Arylsulfatase-A-Aktivität; Feten 5a, 5b und 6a) waren im fetalen Nervengewebe ultrastrukturrell keine Zelleinschlüsse oder degenerative Strukturen feststellbar, wie sie von postnatalen Fällen als Folge der spezifischen Lipidstauung (Anhäufung von Sulfolipiden=Sulfatiden) in der Marksubstanz bekannt sind. Diese Befunde würden wohl eine weiter fortgeschrittene Markreifung voraussetzen. In der Niere (Tubulusepithelien und Sammelrohre) bzw. Leber aller 3 Feten mit MLD war jedoch fluoreszenzmikroskopisch eine Sulfatidspeicherung nachweisbar (Abb. 6 und 7). Elektronenmikroskopisch zeigten sich intrazytoplasmatische multimembranöse Einschlüsse (Abb. 8 und 9). Im pränatalen Stadium ist also die MLD eher als Viscero- denn als Neurolipidose aufzufassen. In den membranösen Strukturen der Tubuluszellen der Niere spielt der Sulfatid-Umsatz durch die Arylsulfatase A offensichtlich viel früher eine ausschlaggebende Rolle. Bemerkenswerterweise wurden bei einem Feten Speicherkörper nur in den mit

Mikrovilli besetzten Tubuluszellen, bei einem anderen bevorzugt in den nicht mit Mikrovilli besetzten Tubuluszellen gefunden.

Das Fehlen von Speicherkörpern im Zentralnervensystem der hier untersuchten Feten mit MLD steht im Gegensatz zu Beobachtungen an zwei um zwei Wochen älteren Feten (Wiesmann et al. 1975; Meier und Bischoff 1976), die typische Tuffsteinkörper vor allem in den Oligodendrozyten des bereits deutlich myelinisierten Rückenmarks und ähnliche Einschlüsse in den Schwannschen Zellen peripherer Nerven zeigten. Selbst im kaum myelinisierten Groß- und Kleinhirn wurden weniger typische, jedoch pathologische osmiophile unstrukturierte Einschlüsse beschrieben. Dagegen fielen den Autoren in der Niere keine Speicherkörper auf, was trotz der bekannten Variabilität der ultrastrukturellen Befunde bei MLD (Dulaney und Moser 1978) nicht ohne weiteres verständlich ist.

Bei dem Feten mit Morbus-Niemann-Pick Typ C war die morphologische Strukturerhaltung unzureichend, so daß nur wenige sicher pathologische Befunde erhoben werden konnten, die allerdings die neuronalen Speicherprozesse in den Stammganglien und im Rückenmark eindeutig belegen. Bei den Speicherkörpern handelt es sich um rundliche multimembranöse Einschlüsse, die fast das ganze Zytoplasma ausfüllen. Im post- und pränatalen Stadium ist diese Neurolipidose zwar mit morphologischen Daten gut charakterisierbar, jedoch ist die Ursache der Lipid-Stoffwechselstörung bisher nicht geklärt. Die Zuordnung der Lipidose zum Kreis des Morbus-Niemann-Pick ist noch immer problematisch (vgl. Harzer et al. 1978).

Bei dem Feten mit Morbus Gaucher war ultrastrukturell kein pathologischer Befund zu erheben, obwohl die biochemische pränatale Diagnose nicht angezweifelt werden kann. Es dürfte sich um ein frühes, noch nicht morphologisch manifestiertes Stadium der Erkrankung gehandelt haben.

Außer der Bestätigung der pränatalen Diagnosen ergeben die Befunde bei fetalen Neurolipidosen Einblick in frühe Krankheitsstadien der Prozesse.

Die Dokumentation der unaufhaltsamen Lipidspeicherprozesse bereits im pränatalen Stadium soll jedoch in erster Linie dazu anregen, neuro-degenerative Krankheitsbilder im Kindesalter genau daraufhin zu untersuchen, ob eine pränatale Diagnostik möglich und damit die unheilbare Erkrankung nachgeborener Geschwister entweder auszuschließen (75% Wahrscheinlichkeit bei im allgemeinen rezessivem Erbgang) oder durch vorsorgliche Abruptio graviditatis zu unterbinden ist (25%).

Literatur

- Benz HU, Harzer K (1974) Metachromatic reaction of pseudoisocyanine with sulfatides in metachromatic leukodystrophy (MLD). *Acta Neuropathol* 27:177-180
- Booth CW, Geberle AB, Nadler HL (1973) Intrauterine detection of GM₁-gangliosidosis type 2. *Pediatrics* 52:521-524
- Dubois G, Harzer K, Baumann N (1977) Very low arylsulfatase A and cerebroside sulfatase activities in leukocytes of healthy members of a metachromatic leukodystrophy family. *Am J Hum Genet* 29:191-194
- Dulaney JT, Moser HW (1978) Sulfatide lipidosis: metachromatic leukodystrophy. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 4th edn. McGraw-Hill Blakiston Div, New York, pp 770-809

- Ellis WG, Schneider EL, McCulloch JR, Suzuki K, Epstein CJ (1973) Fetal globoid cell leukodystrophy (Krabbe Disease). *Arch Neurol* 29: 253-257
- Farrell DF, Sumi SM, Scott CR, Rice G (1978) Antenatal diagnosis of Krabbe's leukodystrophy: enzymatic and morphological confirmation in an affected fetus. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 41: 76-82
- Galjaard H (1980) Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal analysis. Elsevier/ North-Holland Biochemical Press, Amsterdam New York Oxford
- Harzer K (1977) Prenatal diagnosis of globoid cell leukodystrophy. Third documented case. *Hum Genet* 35: 193-196
- Harzer K (1979) Erkennung unheilbarer, erblicher Stoffwechselkrankheiten vor der Geburt. Pränatale Diagnose von Fettstoffwechselstörungen. *Med Welt* 30: 1810-1860
- Harzer K (1979) Stoffwechseldefekte in der Schwangerschaft. *Infor Arzt* 7: 94-102
- Harzer K (1980) Enzymic diagnosis in 27 cases with Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 106: 9-15
- Harzer K, Hayashi K (1981) Genetic variation of hexosaminidase A and arylsulfatase A activity. *Hum Genet* 57: 394-398
- Harzer K, Stengel-Rutkowski S, Gley E-O, Albert A, Murken J-D, Zahn V, Henkel KB (1975) Pränatale Diagnose der GM₂-Gangliosidose Type 2. *Dtsch Med Wochenschr* 100: 106-108
- Harzer K, Benz HU, Knörr-Gärtner H, Jonatha WD, Knörr K (1976) Pränatale Diagnose der Globoidzell-Leukodystrophie. *Dtsch Med Wochenschr* 102: 821-824
- Harzer K, Anzil AP, Schuster I (1977) Resolution of tissue sphingomyelinase isoelectric profile in multiple components is extraction-dependent: evidence for a component defect in Niemann-Pick disease type C is spurious. *J Neurochem* 29: 1155-1157
- Harzer K, Schlotte W, Peiffer J, Benz HU, Anzil AP (1978) Neurovisceral lipidosis compatible with Niemann-Pick disease type C: morphological and biochemical studies of a late infarctive case and enzyme and lipid assays in a prenatal case of the same family. *Acta Neuropathol* 43: 97-104
- Heilbronner H, Wurster KG, Harzer K (1981) Pränatale Diagnose der Gaucher-Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr* 106: 652-654
- Johannessen JV (1978) Electron microscopy in human medicine, Vol 2. Cellular pathology, metabolic and storage diseases. McGraw-Hill Blakiston Div, New York
- Kaback MM, Sloan HR, Sonneborn M, Herdon RM, Percy AK (1973) GM₁-Gangliosidosis type I: In utero detection and fetal manifestation. *J Pediatr* 82: 1037-1041
- Lowden JA, Cutz E, Conen PE, Rudd N, Doran T (1973) Prenatal diagnosis of GM₁-Gangliosidosis. *N Engl J Med* 288: 225-228
- Martin JJ, Ceuterick C (1978) Morphological study of skin biopsy specimens: a contribution to the diagnosis of metabolic disorders with involvement of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 41: 232-248
- Martin JJ, Leroy JG, Ceuterick C, Libert J, Dodinval P, Martin L (1981) Fetal Krabbe leukodystrophy. *Acta Neuropathol* 53: 87-91
- Meier C, Bischoff A (1976) Sequence of morphological alteration in the nervous system of metachromatic leukodystrophy. *Acta Neuropathol* 36: 369-379
- Nørby S, Jensen OA, Schwartz M (1980) Retinal and cerebellar changes in early fetal Sandhoff disease (GM₂-gangliosidosis type 2). *Metab Pediatr Ophthalmol* 4: 115-117
- Okeda R, Suzuki Y, Horiguchi S, Fuji T (1979) Fetal globoid cell leukodystrophy in one of twins. *Acta Neuropathol* 47: 151-154
- Pease DC (1964) Histological techniques for electron microscopy, 2nd edn. Academic Press, New York London, pp 51-56
- Samuels S, Korey SR, Gonatas J, Terry RD, Weiss M (1963) Studies in Tay-Sachs disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22: 81-94
- Terry RD (1970) Electromicroscopy of selected neurolipidoses. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds) *Handbook of clinical neurology*, Vol 10. Leucodystrophies and poliodystrophies. North-Holland Publish Co, Amsterdam, pp 362-384
- Wiesman UN, Meier C, Spycher MA, Schmidt W, Bischoff A, Gautier E, Herschkowitz N (1975) Prenatal metachromatic leukodystrophy. *Helv Paediatr Acta* 30: 31-42