Aus dem Karolinen-Kinderspital der Stadt Wien (Vorstand: Prim. Dr. H. Zimprich), dem Institut für med. Chemie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. F. Seelich), der neurolog,-psychiatrischen Universitätsklinik Wien, der Univ.-Kinderklinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. H. Aspericer) und der I. med. Univ.-Klinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. Deutseh)

Neurologische und biochemische Untersuchungen bei vier Kindern mit hepatolenticulärer Degeneration unter besonderer Berücksichtigung des Aminosäurestoffwechsels

Von

H. Zimprich, E. Gründig, F. Gerstenbrand, M. Simanyi, S. Widhalm, H. Hajek und H. Schnack

(Eingegangen am 22. November 1969)

Zusammenfassung

1. 4 Kinder, darunter ein Geschwisterpaar, mit hepatolentikulärer Degeneration wurden klinisch und neurologisch untersucht: während bei 2 Patienten eine neurologische Symptomatik im Vordergrund stand, die bei einer Patientin eingehend geschildert wird, tritt diese bei dem Geschwisterpaar mehr in den Hintergrund. Bei diesen fällt die haemorrhagische Diathese besonders auf. Alle Patienten wiesen jedoch eine neurologische Symptomatik wechselnder Ausprägung und eine Verminderung der Intelligenz auf. Unter den geschilderten Therapieversuchen, vor allem nach Penicillamin kommt es zu deutlicher klinischer Besserung.

 In einem Fall ergab die chemische Untersuchung des Serums, daß nur bei der Patientin, nicht aber bei Eltern und Geschwistern erniedrigte Cu- und Coeruloplasmin-

werte vorlagen.

3. Im Liquor war bei den Patienten der Glutaminsäure + Glutamingehalt stark

erniedrigt, Serin, Threonin und Methioningehalt erhöht.

4. 13 Stunden nach i. v.-Verabreichung von L-Dopa war Serin und Methioningehalt normalisiert, hingegen waren Argminspiegel und Aktivität der GOT angestiegen. Akinese und Amimie waren 6 Stunden lang vermindert, die Beweglichkeit verbessert.

5. D-Penicillamin (1,2 g bzw. 0,9 g/die) verursachte eine entscheidende Besserung des klinischen Zustandsbildes, bei einer Patientin war eine Berufsausbildung möglich, bei den übrigen Schulbesuch. Bei den Patienten kam es außerdem zu einer Besserung der Leberfunktion, der Serum-Cu-Gehalt zeigte Normalisierungstendenz und die haemorrhagischen Krisen des Geschwisterpaares wiederholten sich nicht. Das Liquor-

bild war einige Wochen bzw. Monate nach Beginn der D-Penicillamintherapie erst wenig verändert, es erfolgte jedoch eine Normalisierung des ursprünglich stark vermindert gewesenen Ketosäurespiegels.

Summary

Neurological and Biochemical Investigations on Four Children with Hepatolenticular Degeneration with Special Consideration of the Amino Acid Metabolism

1. 4 children, two of them siblings, with hepatolenticular degeneration were examined elinically and neurologically. Neurological symptoms predominated in two patients, those of the girl being described in detail. The reverse was true of the siblings, where hemorrhagic diathesis predominated. All patients, however, showed neurological symptoms in varying degrees, and intellectual deterioration. Noticeable clinical improvement occurred as a result of the therapeutic measures described, in particular after penicillamine.

2. In one case chemical tests of the serum showed that only the patient and not

her parents and siblings had decreased Cu- and coeruloplasmin values.

 The glutamic acid + glutamine content was significantly diminished in the cerebro-spinal fluid of the patients, while the serine, threonine and methionine content was raised.

4. 13 hours after intravenous administration of L-Dopa the serine and methionine content was normalized, while the arginine level and GOT activity had risen. Akinesia

and amimia were alleviated for six hours and mobility improved.

5. D-penicillamine (1.2 g and 0.9 g/d respectively) produced a significant improvement in the clinical condition. One female patient was able to undergo occupational training, while the others were able to attend school. The liver function of the patients also improved and the Cu content of the serum showed a tendency towards normalisation. The hemorrhagic crises of the siblings did not recur. The cerebrospinal fluid changed only slightly for several weeks or months after D-penicillamine therapy was initiated, while, however, the originally severely diminished keto acid level normalized.

Einleitung

Die hepatolenticuläre Degeneration (Morbus Wilson) ist eine rezessiv erbliche Stoffwechselstörung mit Verminderung des Plasmaproteins Coeruloplasmin, an das ca. 95% des Serum-Kupfers gebunden ist. Die dadurch stark verminderte Kupferbindungskapazität zusammen mit der vermehrten Kupferresorption führt zu Kupferablagerungen in verschiedenen Organen und progredienten Symptomen, die meist erst im Erwachsenenalter manifest werden. In der pädiatrischen Literatur finden sich einschlägige Fälle relativ selten; deshalb soll im folgenden über 4 Patienten berichtet werden.

Außer den üblichen neurologischen Tests im Rahmen der klinischen Untersuchung mit Kupfer- und Coeruloplasminbestimmung wurde die Aminosäure-konzentration im Liquor cerebrospinalis und im Serum bestimmt, weil bei den zitierten Patienten extrapyramidalmotorische Störungen auftraten und unsere Arbeitsgruppe bei Dysfunktion im Bereich der Basalganglien (Morbus Parkinson, postencephalitischer Parkinsonismus, Chorea, Huntington) stets charakteristische Störungen in der Aminosäurezusammensetzung des Liquor cerebrospinalis aufzeigen konnte [Bruck et al. (1964), Gründig (1965), Bruck et al. (1967)]. Darüber hinaus wird die Änderung der neurologischen und biochemischen Befunde während der Behandlung mit Tioctan, L-Dopa und Penicillamin, das seit den Arbeiten von Walshe (1956, 1956 a) in steigendem Umfang therapeutisch eingesetzt wird, mitgeteilt. L-Dopa wurde deshalb verabreicht, weil es in der Behandlung der

Parkinson-Symptomatik mit Erfolg angewendet wurde und außerdem die mit einem Parkinson-Syndrom verbundenen Anomalien der Aminosäurezusammensetzung des Liquor cerebrospinalis teilweise zum Verschwinden bringt [Gerstenbrand et al. (1962), (1963), Gründig et al. (1969)].

Neurologisch-klinische Befunde

M. C., geboren am 29. 6. 1961; ein kräftig entwickeltes 14jähriges Mädchen in gutem Ernährungszustand, normale Cor- und Kreislaufverhältnisse, Pulmo und

Abdomen unauffä'lig, beginnende sekundäre Geschlechtsmerkmale.

Bis zum 12. Lebensjahr war die Patientin gesund. Angeblich waren keinerlei Nervenkrankheiten in der Familie gewesen. Als erste Beschwerden traten Amimie und Akinesen auf, die Handlungen waren verlangsamt, der Blick unbelebt. Kurze Zeit später kamen Sprachstörungen in Form einer monotonen, verlangsamten und tonlosen Sprache hinzu, die sich durch Aufregungen verstärkten; gleichzeitig kam es zu Schluckschwierigkeiten mit Regurgitieren und Flüssigkeitsaustritt durch die Nase. Nach einigen Wochen ergaben sich Schwierigkeiten beim Schlucken fester Speisen. Der neurologische Befund zum Zeitpunkt der Aufnahme ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Klinische Leitsymptomatik bei der Patientin C. M.

Dauer 6 Monate vor Klinikeinweisung mit 13 1/2 J.

Extrapyr, Sy. Akinese, Amimie, Rigor, Salivation, Zahnradphänomen

Spast, Sy. Hyperreflexie UE Stärker (Babinski) Zerebell, Sy. Hypodiadochokinese, Endstückataxie

Primitivrefl. Faszikulieren d. Zunge, Enthemmung v. Palmomentalrefl.

Psyche Abbau, IQ (Hamburg-Wechsler) 75

Hirnnerven Schluckschwierigkeiten

Ophthalmol. Kaiser-Fleischer'scher Ring in der Cornea nur mit Spaltlampe sichtbar

Hepatale Sy. Klinisch nicht faßbar

Während des Klinikaufenthaltes kam es zunächst innerhalb von 4 Wochen zu einer Zunahme der Symptomatik und zwar zu einer Verstärkung der Primitivschablonen, der Haltungsanomalie und der Parkinsonsymptome. Nach Applikation von L-Dopa — 7 Tage täglich 25 mg intravenös — war schon nach der ersten Injektion eine Verminderung der Akinesen und Amimie aber auch eine Besserung der Beweglichkeit und eine geringere Ausprägung der Primitivschablonen zu beobachten. Die Wirkung trat ca. 30 Minuten nach den Injektionen ein und hielt 6 Stunden an.

Nachdem vorübergehend Tioctan mit geringem Erfolg verabreicht wurde, erfolgte die Einstellung auf D-Penicillamin, anfangs mit einer Tagesdosis von 1,2 g. später von 0,9 g. Die Penicillamintherapie wird seit 5 Jahren ununterbrochen fortgesetzt.

Der Zustand der Patientin hat sich seit dem Beginn der Behandlung mit Penicillamin entscheidend gebessert. Im Behandlungsverlauf — bereits in der 2. bis 3. Woche — stellte sich zunächst eine Verminderung der Haltungsanomalie, gleichzeitig mit einer Abnahme der Parkinsonsymptomatik und der Primitivschablonen ein. Die Patientin verlor die starke Antriebshemmung, wurde in ihrer Motorik und auch Vigilanz lebhafter. In der Folgezeit kam es dann zu einer Abnahme der pseudobulbärparalytischen Symptome und schließlich auch der Spastizität, gleichzeitig damit verschwanden die Primitivschablonen bis auf geringe Reste. Die cerebrale Symptomatik zeigte erst nach der 5. Woche eine deutlichere Verminderung, blieb aber am längsten nachweisbar. Die Patientin hat in der Zwischenzeit eine Berufsausbildung erhalten, die neurologische Symptomatik ist bis auf leichte Parkinsonzeichen, einer geringen Spastizität und leichten cerebellaren Symptomen sowie einer emotionellen Enthemmung abgeklungen.

Geschwister: F. E., ein zehnjähriges Mädchen, wurde in akut lebensbedrohlichem Zustand an der Univ.-Kinderklinik Wien aufgenommen. Eine hämorrhagische Diathese mit ausgeprägten hepatal und renal bedingten Symptomen stand im Vordergrund des klinischen Bildes. Das Kind war hochgradig debil (besuchte zum drittenmal die erste Klasse Sonderschule) ohne neurologische Symptomatik.

Unter D-Penicillamin-Dauertherapie trat eine völlige Normalisierung der hepatal bedingten Symptome ein. Auch bezüglich der Debilität ist eine geringe Besserung eingetreten (weitere Befunde s. HAYEK et al.).

Bei F. F., dem 14jährigen Bruder, stand ebenfalls die haemorrhagische Diathese im Vordergrund. Die interessanten Gerinnungsbefunde wurden zusammen mit 6 anderen Patienten von Fischer und Mitarb. 1968 veröffentlicht, Außerdem bestanden bei F. F. auch deutliche neurologische Symptome. Dabei waren bei der Aufnahme vor allem die monotone Sprache, vermehrter Speichelfluß und die Amimie im Vordergrund, Außer cerebellaren (Hypodiadochokinese, Endstückataxie) und extrapyramidalen (s. oben sowie Rigor, Zahnradphänomen) Veränderungen, fanden sich auch vermehrt Primitivschablonen. Ein normaler Schulbesuch war möglich.

Auch bei F. F. trat unter D-Penicillamin-Dauertherapie eine Normalisierung der hepatal bedingten Symptome ein. Die neurologischen Veränderungen bestehen weiter-

hin, sind jedoch deutlich gebessert.

Der klinische Effekt der L-Dopa-Gabe ist leider nicht mehr rekonstruierbar.

Biochemische Befunde

a) Ergebnisse der üblichen Serumuntersuchungen bei der Familie der Patientin M. C.

Die Ergebnisse dieser mit den üblichen Methoden durchgeführten Analysen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß nur bei der Patientin selbst pathologische Veränderungen nachweisbar waren: Cu-Gehalt 27 $\gamma\%$, Coeruloplasmin 2 mg%, γ -Globuline 28 rel%.

b) Ergebnisse der Untersuchung der Aminosäurekonzentration in Liquor cerebrospinalis.

Tabelle 2. Ergebnis der Serumuntersuchungen bei der Familie der Patientin C. M.

	CU COERULO GOT THYMOL	CE 1930 147 y PLASMIN 43 m 19	19% 4	C.L. 1928 131 7% ALB 58.0% 49 mg% \(\alpha_1 \) 4.0 24 \(\alpha_2 \) 6.5 1 \(\beta_3 \) 12.5 \(\gamma \) 19.0			
THYMOL	C. M. 1951 27 y % ISMIN 2 mg % 28	H. 1952 129 y % 45 mg % 19	L. 1954 140 y % 33 mg % 19	H. 1956 124 y % 51 mg % 14	E. 1958 205 y % 80 mg % 24		
ALB.	51,8% 3,2 6,5 10,5 28,0	59,0 % 4,0 9,0 10,5 17,5	65,0 % 2,8 6,7 8,0 17,5	53.5% 3.5 8.5 13.5 21.0	52.5% 5.5 10,8 11,2 20,0		

Tabelle 3. Die Abweichung der Konzentration einiger Liquoraminosäuren bei den untersuchten Patienten von den normalen Durchschnittswerten (Werte in mg%)

		Morbus Wilson			
	Normalwerte	C. M.	O. S.	F. F.	F. E.
"Gesamt-Aminosäuren"	10.0 ± 3.9	8,1	7.2	12.7	9,8
Glutaminsäure + Glutamin	$3,04 \pm 0,96$	1,48	1,50	1,65	1,21
Serin	0.32 ± 0.15	0.57	0.95	-	
Threonin	0.28 ± 0.09	0.47	0.85	_	-
Methionin	0.09 ± 0.03	0,45	==	_	-

Tabelle 3 zeigt die Ausgangssituation im Liquor. Bei normaler Konzentration der Summe der mit Ninhydrin färbbaren Substanzen — kurz "Gesamt-Aminosäuren" genannt — fanden wir bei den Patienten deutlich verminderte Werte für Glutaminsäure-Glutamin, erhöhte für Serin, Threonin und Methionin. Die Konzentration der übrigen Aminosäuren war normal, desgleichen die Aktivität der Transaminasen. Das Bild entspricht nur teilweise den bei anderen extrapyramidalen Bewegungsstörungen (Morbus Parkinson, postencephalitischer Parkinsonismus und Chorea Huntington) gefundenen; bei letzteren fanden wir erhöhte Konzentrationen von Serin, Threonin, Methionin, Glycin und Cystein bei erniedrigtem Glutaminsäurespiegel.

Nach i. v.-Verabreichung von 40 bzw. 50 mg L-Dopa (Tab. 4) an 2 Patienten, blieb die Konzentration der "Gesamt-Aminosäuren" unverändert, Serin und Methionin sanken bei Pat. C. M. auf Normalwerte ab. Gleichzeitig fanden wir bei den beiden untersuchten Patienten ein Ansteigen des Argininspiegels und der Aktivität der GOT.

Wenn man diese Ergebnisse mit der gebotenen Vorsicht zu interpretieren sucht, könnte man auch bei Morbus Wilson auf eine Reduzierung des Kohlehydrat- und Aminosäureumsatzes schließen, die stets durch Abnahme des Glutaminsäurebzw. Glutaminspiegels im Liquor ausgedrückt wird (siehe z. B. Gründig 1966). Dafür spricht auch, daß bei der Patientin M. C. — die anderen wurden nicht daraufhin untersucht — der Ketosäurespiegel im Liquor sehr niedrig lag: Pyruvat $0.09~{\rm mg}\,\%$, Oxalacetat $0.01~{\rm mg}\,\%$, Ketoglutarat nicht nachweisbar.

(Normalwerte: Pyruvat $0.56\pm0.09~{\rm mg}\%$, Oxalacetat $0.09\pm0.02~{\rm mg}\%$, Ketoglutarat $0.07\pm0.01~{\rm mg}\%$). Die erhöhten Serinwerte würden dann folgerichtig als Kompensation in Form eines erhöhten Lipidumsatzes zu deuten sein. Für eine Störung der Kohlehydratverwertung spricht auch, daß die Arbeitsgruppe um

Tabelle 4. Die Änderung der Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis nach i. v.-Verabreichung von L-Dopa (Werte in mg%) bzw. mE/ml)

	C. M.		F. F.	
	vorher	13 Std. nach 40 mg L-Dopa	vorher	13 Std. nach 50 mg L-Dopa
"Gesamt-Aminosäuren"	8,1	8,6	12,7	12,3
Serin	0,57	0,36		-
Methionin	0.45	0.17		-
Arginin	0.49	0,85	0.80	1,35
GOT	12,0	17.5	14,9	17,0

Walshe eine Blockierung der Pyruvatoxydation und der Membran-ATP-ase nachweisen konnte [Walshe (1966), Peters et al. (1966, 1966 a)].

Nach L-Dopa, das u. a. eine Umsatzsteigerung im Kohlehydratstoffwechsel verursacht [Gründig et al. (1969)], käme es zu einer Normalisierung des Serinspiegels. Ein Ansteigen des Aminosäureumsatzes wäre dann durch ein Ansteigen des Argininspiegels und einer Erhöhung der Transaminaseaktivität ausgedrückt.

Die Therapie mit D-Penicillamin (Tabelle 5) ändert in den ersten Monaten wenig an der Aminosäurezusammensetzung des Liquor cerebrospinalis: Die Konzentration der "Gesamt-Aminosäuren" bleibt normal, die Glutaminsäure + Glutamin erniedrigt; von Serin, Threonin zu hoch. Bei der Patientin M. C. erhöhte

Tabelle 5. Die Änderung der Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis während der Therapie mit D-Penicillamin (Werte in mg% bzw. mE/ml)

	C. M.		F. F.		F. E.	
	vorher	10 Monate Peni- cillamin	vorher	5 Wochen Peni- cillamin		2 Wochen Peni- cillamin
"Gesamt-Aminosäuren"	8,1	11,3	10.7	11,0	0.0	541.072
Glutaminsäure $+$ Glutamin	1.48	1,54	1,65	1,56	9,8	9,4
Serin	0.57	0.50	1,00	1,50	1,21	1,65
Threonin	0.47	0.69				
GOT	12.0	12,5	77.0	-	-	
		12,0	14.9	9,0	-	10.2

sich jedoch die Glycinkonzentration von 0,45 auf 0,76 mg% (Normalwerte 0,68 \pm 0,21 mg%). Die stark erniedrigten Ketosäurekonzentrationen stiegen auf Normalwerte an, (Oxalacetat von 0,01 auf 0,07 mg%, Ketoglutarat von 0 auf 0,02 mg%). Demnach scheint sich durch D-Penicillamin allmählich eine Normalisierung des Kohlehydratstoffwechsels anzubahnen. Eine Nachuntersuchung des Liquors nach mehrjähriger Applikation des Medikamentes war bisher leider nicht möglich.

Methodik zur Untersuchung des Liquor cerebrospinalis

Zur Untersuchung wurden 3 ml Liquor eingesetzt, im Verhältnis 1:1 mit 20%iger TCE enteiweißt und der Niederschlag abzentrifugiert. In den Überständen erfolgte zunächst die Messung der Konzentration der mit Ninhydrin färbbaren Substanzen. Dazu wurden 0,05 ml des Überstandes sowie eine Vergleichlösung auf Filterpapier Whatman Nr. 1 aufgetragen, mit Ninhydrin gefärbt und der Cu-Ninhydrinkomplex photometrisch bestimmt (Рампытский und Gründig [1958]).

Die Trennung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch eine Kombination von Säulen- und Papierchromatographie (Al₂O₃ nach Brockmann, Dowex 2×8, Dowex 50×4), Papierchromatographie (Whatmann Nr. 1, Steigmittel Phenol, gesättigt mit 0,2 m HCl-KCl-Puffer von pH 1) und Papierelektrophorese (0,1 m Acetat-Puffer pH 3,8, 300 V, 3 Stunden). Die Papierstreifen wurden mit Ninhydrin gefärbt und im Beckman Spinco-Analytrol ausgewertet. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mittels Eichkurven und Eichehromatogrammen bzw. Pherogrammen (Gründig [1962]). Die Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase wurden mittels Testpackung der Fa. Böhringer, Mannheim, und nach der beigepackten Arbeitsvorschrift bestimmt. Die BTS, KGS und OES-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Gründig (1962).

Literatur

Bruck, J., F. Gerstenbrand, H. Gnad, E. Gründig und P. Prosenz: Über Veränderungen der Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis beim choreatischen Syndrom. J. neurol. Sci. 5, 257—265 (1967).

— E. Gründig und R. Teuflmayr: Über Ergebnisse von Liquoranalysen beim

Parkinson-Syndrom. Acta Neuropathologica 3, 638-644 (1964).

FISCHER, M., H. HAYEK, H. SCHNACK, W. SCHENCK, B. BAUER und W. KÜNZER: Veränderungen der Blutgerinnung bei Morbus Wilson. Dtsch. med. Wschr. 93, 1229-1232 (1968).

- Gerstenbrand, F., und K. Pateisky: Über den L-Dopaeffekt auf motorische Störungen beim Parkinsonsyndrom. Eine elektromyographische Studie, Wi. Z. Nervenheilk. 20, 90 (1962).
- und P. Prosenz: Erfahrungen mit L-Dopa in der Therapie des Parkinsonismus, Psychiatr. Neurol. (Basel) 146, 246 (1963).
- Gründig, E.: Über die Aminosäurezusammensetzung des Liquor eerebrospinalis. Wi. klin. Wschr. 77, 246—54 (1965).
- Der Stoffwechsel der Aminosäuren im Zentralnervensystem, Wi. klin, Wschr. 78, 625 (1966).
- Trennungsgang zur quantitativen Bestimmung von Keto- und Aminosäuren in kleinen Mengen des Liquor cerebrospinalis. Clin. chim. Acta 7, 498 (1962).
- F. Gerstenbrand, J. Bruck, H. Gnad, P. Prosenz und R. Teuflmayr: Der Einfluß der Verabreichung von Aminosäuren, speziell von L-Dopa und α-Methyldopa, auf die Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis bei extrapyramidalen Syndromen. I. Veränderungen der Liquorzusammensetzung nach L-Dopagaben bei Parkinsonpatienten und Gesunden. Dtsch. Z. Nervenheilk. 196, 236—266 (1969).

HAYEK, H., H. SCHNACK, S. WIDHALM und H. ZIMPRICH: Familienuntersuchungen bei einem Geschwisterpaar mit Morbus Wilson. In Vorbereitung.

Peters, R., M. S. Shorthouse, and J. M. Walshe: Studies on the toxicity of copper I:
The toxic action of copper in vivo and in vitro. Proc. Roy. Soc. Ser B. 166, 273-284

(1966).

- Studies on the toxicity of copper II: The behaviour of microsomal membrane AT Pase of the pigeon's brain tissue to copper and some other metallic substances. Proc. Roy Soc. Ser. B. 166, 285—294 (1966a).
- WALSHE, J. M.: Penicillamine: a new oral therapy for Wilsons disease. Amer. Med. 21. 487 (1956).
- Wilson's disease: a new oral therapy. Laucet 1, 25 (1956 a).
- Biochemistry of copper, p. 487. New York: Academic Press Inc. 1966.

Anschrift der Verfasser: Prim. Dr. H. Zimprich, Karolinen-Kinderspital der Stadt Wien, Sobieskigasse 31, A-1090 Wien.