

Mukopolisakkaridozis I H (Hurler Sendromu)

*Karaciğer Işık ve Elektron Mikroskopu Bulgularının Değerlendirilmesi**

Dr. Ülken Örs / Dr. Memnune Yüksel*****

Giriş

Mukopolisakkaridozis I H ya da başka adıyla Hurler Sendromu, birbirini tamamlayan kalıtsal hastalık, doğuştan metabolizma bozukluğu, depo hastalığı ve lizozomal hastalık tanımlamalarıyla tanınan, fenotipik olarak birbirinden ayrı, bir grup hastalıktan (genetik mukopolisakkaridozis), özellikle üzerinde oldukça çeşitli araştırma yapılmış ve yapılmakta olan az olmasına göre başlıca bir tanesidir.

Mukopolisakkaridozisler bağ dokusu mukopolisakkaritlerinin yıkımı sonucu ortaya çıkan kalıtsal hastalıklardır. Basit Mendel kurallarına göre, aile ağacı boyunca genç nesillere iletilirler. Doğuştan metabolizma bozukluğu hastalığı oluşları, moleküler düzeyde her zaman mukopolisakkaritleri yıkan enzim eksikliği kusurunun aranmasına neden olmuştur. Yapı bilim ve ışık mikroskobu düzeyinde hastalık bütün depo edici hücrelerin stoplazmalarında mukopolisakkaritlerin birikimiyle kendini gösterir. İnce yapıda ise depolanma yeri lizozomlardır.

Mukopolisakkaridozisleri kapsayan ilk klinik tanımlamalar Hunter²⁶, Hurler²⁵ ve daha sonra aynı yıl içinde (1929) Brailsford⁵ ve Morquio⁴¹ tarafından yapılmıştır. İlk otopsi çalışmasını 1934'de Hurler'in vakalarından birinde Tuthill⁵² gerçekleştirmiştir. Hurler sendromuna aid ince yapı düzeyinde ilk araştırmalar karaciğer dokusuna aittir.^{44,54} Daha sonraki yıllarda aynı dokuda ince yapı çalışmaları çoğunlukla enzim çalışmaları ile birlikte yapılmıştır.^{8,10,22,27,28,29,45} Son

* Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Enstitüsü ile Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği ortak çalışmasıdır.

** Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Profesörü.

*** Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği Doçenti.

yıllardaki araştırmalar kıkırdak ve deri gibi çeşitli dokuları içine almaktadır.^{1,2,3,12,49,50}

Aynı zaman süreci içinde histokimyasal araştırma bulguları, depo maddesinin lipid⁵² olabileceği düşüncesini yıktı. Hastalığın nedeninin bir mukopolisakkarit olduğu saptandı⁶. Bu çalışmada Hurler hastalığına ilk kez mukopolisakkaridozis adı verildi. Aynı hastaların dokularından başka araştırmacıların daha sonraki yıllardaki yoğun çalışmaları bu mukopolisakkaritlerin cinsini ortaya çıkardı (heparan sulfat ve dermaten sulfat).^{7,51,53} Bu hastalarda idrarla aşırı mukopolisakkaritlerin atıldığı ve bunun çeşidinin dokularda birikenlerle aynı olduğunun bulunması^{13,39,40} klinik tanı yönünden büyük olanaklar sağladı. Daha sonraki araştırmalarda, hastalığın oluşunda mukopolisakkaritlerin yıkımında bir eksiklik ya da bozukluk olduğu,^{18,19} bunun bir enzim^{32,33,34,43} hem de lizozomlarda yerleşik bulunduğu ve orada oluştuğu ileri sürüldü.^{23,24} Doku kültürü çalışmaları bu grup hastalıkların nedenlerinin anlaşılmasında büyük yardımcı olmuştur.^{11,17,42}

Kısaca özetlemeye çalışılan bu bilgi birikimi, adım adım Hurler hastalığının birçok yönlerine açıklık getirmişse de hastalığın ara ya da atipik biçimlerinin bulunduğu her zaman vurgulanarak belirtilmiştir.^{20,30,31,35,36,37,38}

Ülkemizde bu konuda elektron mikroskopu düzeyinde tek bir çalışma vardır.⁴⁶ Bu çalışmada da belirtildiği gibi karaciğer metabolik işlevleri açısından çok yönlü bir organdır, bir enzim bozukluğunda ya da eksikliğinde verdiği cevaplarda az çok çeşitlilik gösterebilmektedir.

Klinik olarak tanısı konmuş olan vakamızda, karaciğer iğne biopsi materyelinin yukardaki bilgi ve bulgulara göre ince yapı düzeyinde bir kez daha araştırılmasına ve değerlendirilmesine çalışılmıştır.

Materyel ve Metot

Hasta 6 yaşında kız çocuk (Prot.No. 3392/1973). Zeka geriliği, gelişme bozukluğu, konuşamama, sürekli burun akıntısı ve sık sık ateşlenme nedenleriyle Çocuk Hastalıkları Kliniğine başvurulmuştur.

Öz ve Soy Geçmişi: Ailenin dördüncü çocuğuymuş. Normal bir gebelik sonunda, zamanında ve normal olarak doğmuş. İki yaşına kadar oldukça iyi gelişmiş. Zeka ve hareket gelişmesinde gecikme ve bozulma iki yaşından sonra belirgin olmuş, 18 aylık emeklemiş, iki yaşında yürüyebilmiş. Üç, beş sözcük dışında konuşamıyor ve kendisine söylenenlerin ancak çok az bir bölümünü anlıyabiliyormuş. Bir yıl öncesine kadar zorlukla da olsa yürüyebilen hasta, bir süredir ayakları üzerinde ancak güçlkle durabiliyor; fakat yürüyemiyormuş. Hasta sık sık solunum sistemi hastalıklarına yakalanırmış.

Anne 30 yaşında, böbrek taşı var. Baba 32 yaşında sağlıklı. Anne, baba kardeş çocukları. Ailenin birinci çocuğu ölü doğmuş. İkinci çocuk sağlıklı doğmuş ve büyümüş, 10 yaşında erkek. Üçüncü çocuk sağlıklı, gelişmesi iyi, 1,5 yaşında kız.

Fizik Muayene bulguları: Boy 103 cm, ağırlık 14,5 kg (normaline göre % 30 altında) baş çevresi 52 cm. İleri derecede gelişme bozukluğu ve zeka geriliği var. Ayakları üzerinde duramıyor. Söyledikleri anlaşılmıyor. Sesi kalın, ancak bazı basit emirleri yerine getirebiliyor. Dış görünüşünde (Şekil 1) baş büyük, kule biçiminde, saçları kırmızı, kaba, kuru, ve dik, yüz çizgileri kaba, göz kapakları şişkin, kaşlar kalın ve birbirine yakın, burun kökü basık, delikleri geniş ve ucu yassı. Ağız açık, dudaklar kalın, dil büyük, ucu dışarda ve dil papillaları kaba. Dişler düzensiz, yanaklarda pigmentasyon gözlemlendi. Boyun kısa, göğüs kafesi dar, kunduracı göğsü biçiminde. Bel kamburluğu ve göbek fıtığı var. Karın şiş. Bütün vücutta deride kalınlaşma, kılınma gluteal bölgede mongol lekeleri saptandı. Kollar ve bacaklar kısa ve kalın, eller büyük, pençe görünümünde.

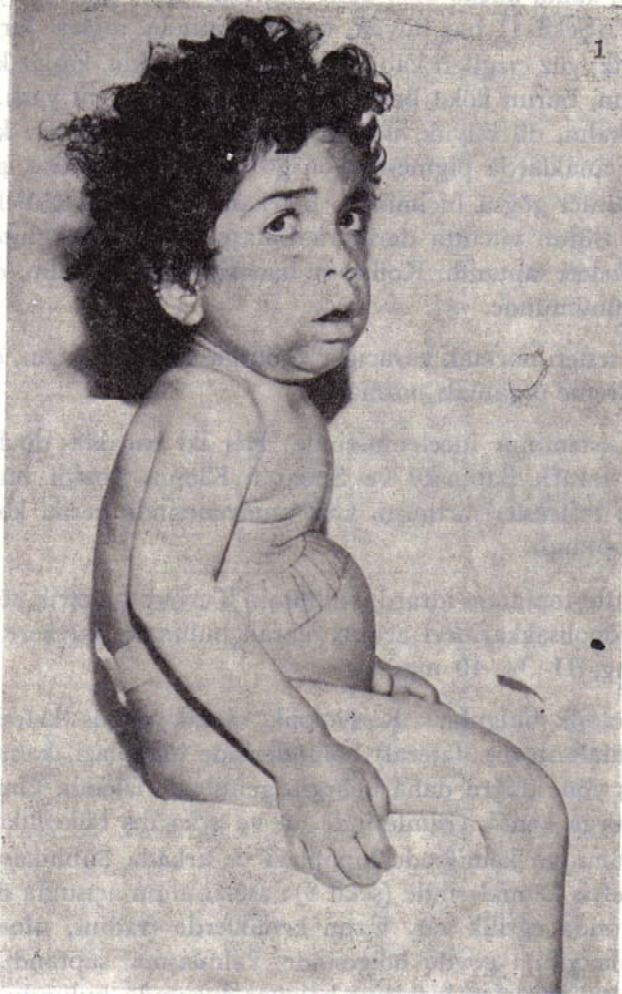
Kalp sesleri normal, karaciğer kaburga kenarını 8 cm., dalak 4 cm. geçiyor. Üreme organları normal.

Sinir sisteminin incelenmesinde: Her iki bacakta dizden aşağıda atrofi, iki taraflı Babinsky ve Spontan Klonus pozitif bulundu. Derin tendon refleksleri artmıştı. Göz muayenesinde heriki korneada bulanıklık saptandı.

24 saatte toplanan idrarda, albumin Turbidimetrik yöntemle göre idrar mukopolisakkaritleri artmış olarak bulundu (iki kere yapıldı: I- % 12,3 mg, II- % 40 mg.).

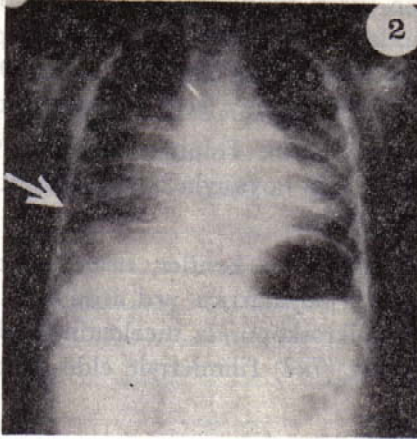
Radyolojik bulgular: Radyolojik olarak göğüs kafesinde (Şekil 2); klavikülaların dış (lateral) bölümlerinde hipoplazi, kaburga kemiklerinde dış yöne doğru daha belirgin genişleme izlendi. Omurga grafisinde; omurga kemik cisimlerinde ön ve arka dış büyüklükte artma, ikinci bel omurga kemiğinde hipoplazi ve arkada Sublukasyon dikkati çekiyor. Pelvis kemiklerinde (şekil 3): asetabulum açısında daralma, femur boynunda eğrilik var. Uzun kemiklerde (radius, ulna, humerus, tibia, fibula gibi): gövde bölgesinde kalınlaşma saptandı. Radius ve ulnanın distal epifizleri birbirine bakıyor durumda bulundu. El kemiklerinde özellikle metakarpalarda (şekil 4) genişleme ve proksimal uçlarında sivrilme (mermi ucu ya da kama biçimi) gözlemlendi. Kafa iskeletinde: üçgen kafa görünümü, omega harfi biçiminde yassı ve uzun sella saptandı.

Elektron Mikroskop Materyel ve Metodu: Karaciğer iğne biyopsi parçasığı, hastadan elde edildikten sonra, hemen % 2,5'luk glutaraldehit (Ph. 7,2'ye fosfat tamponuyla ayarlanmış) içine alındı ve yeterli küçük parçalara bölündü. Birinci tesbit sıvısı içinde parçalar 1,5 saat oda ısısında bırakıldı. İkinci tesbit sıvısı aynı tampon sıvısıyla Ph. 7,2'ye ayarlı % 1'lik OSO_4 dür. İkinci sıvıya geçmeden % 7,5'luk ve Ph. 7,2'ye ayarlanmış sukrozlu sıvıda yıkama yapıldı. İkinci sıvıda doku



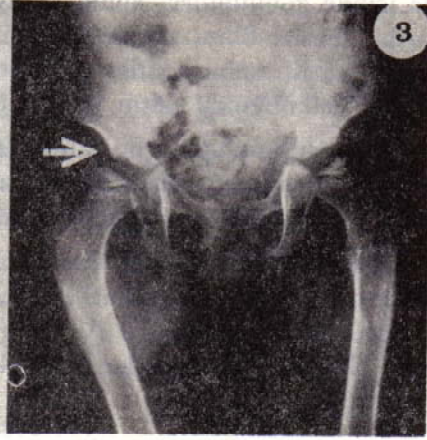
Şekil 1

Altı yaşında kız çocuk. İleri derecede gelişme bozukluğu ve zeka geriliği var. Karaciğer, dalak büyüklüğü yanında göbek fitiği, bel kanburu ve kunduracı göğsü belirgin biçimde görülüyor. Kollar ve bacaklar kısa, kalın. Eller pençe biçiminde. Baş büyük, kule biçimli, yüz çizgileri kaba, burun basık, burun kökü geniş, ağız açık olarak izleniyor.



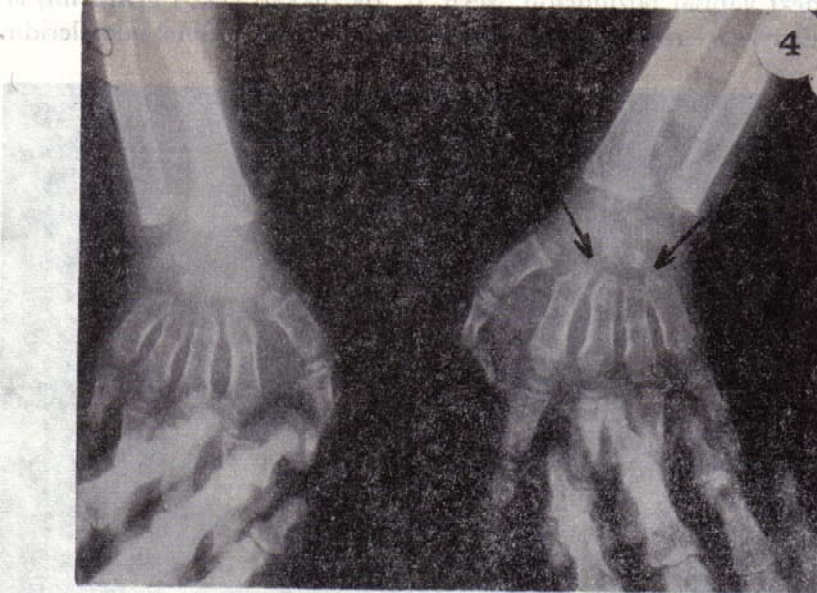
Şekil 2

Hastanın göğüs grafisinde, kaburga kemiklerinde özellikle dış yönde genişleme var.



Şekil 3

Hastanın pelvis grafisinde, asetabulum açısında daralma ve femur boynunda eğrilik görülüyor.



Şekil 4

Hastanın el-bilek grafisinde, her iki elde üçüncü metakarpal kemiklerin proksimal uçlarında sivrileşme (mermi ucu yada kama biçimi) izleniyor.

parçacıkları 1 saat soğukta tutuldu. Parçalar dereceli alkollerden ve propilenoksitten geçirilerek suları alındı. Araldit gömme maddesiyle ilgili işlemler uygulandıktan sonra 00 No'lu jelatin kapsüllere aynı mad-

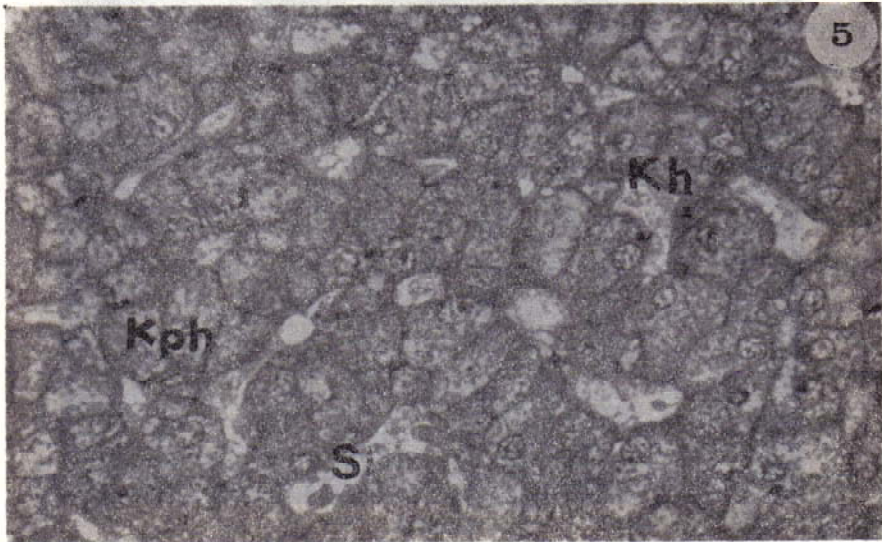
de içinde gömüldüler. Polimerizasyon süresi sonunda, tıraşlanan bloklardan Porter-Blum ultramikrotomunda, cam bıçakla, ışık mikroskopu için 1-1,5 M. kalın kesitler ve elektron mikroskopu gözlemleri için 300-500 Å kalınlığında (altın ya da gümüş rengi) ince kesitler elde edildi.

Işık mikroskopu için kalın kesitler % 1'lik Toluidin mavisi ve % 1'lik Metilen mavisi-Azur II - Boraks birleşik boyasıyla boyandılar. Resimler Carl-Zeiss foto mikroskopunda çekildi.

Çıplak bakır gritler üzerine toplanan ince kesitler, uranil asetat (Watson)⁵⁵ ve kurşun sitrat (Reynolds)⁴⁷ boyaıyla ard arda boyandıktan sonra Carl-Zeiss 9 A Elektron mikroskopunda incelendiler. Negatif elektron mikrograflar Agfa-Gevaert (7x7) filimleriyle elde edildi.

Gözlemler

Işık mikroskopu düzeyinde: Araldit bloklardan elde edilen ve % 1'lik Metilen mavisi-Azur II - Boraks birleşik boyası ve % 1'lik Toluidin mavisiyle boyanan karaciğer kesitlerinde, karaciğer dokusunda, ışık mikroskopu büyötmelerinde kolaylıkla izlenen, doku ve hücre düzeyindeki yapısal bozulmadır (şekil 5). İlk dikkati çeken genişlemiş sinuzoidler ve içlerini dolduran, büyümüş Kupffer ve endotel hücreleridir.



Şekil 5

Karaciğer iğne biopsisinden elde edilen bir kesitin ışık mikroskopu düzeyindeki görünümüdür. Çok kenarlıdan, yuvarlağa ya da ovale kadar değişen biçimli, şişmiş karaciğer parankima hücre (Kph) dizileri arasında genişlemiş sinuzoidler (Si) ve içlerinde büyümüş Kupffer hücreleri (Kh) dikkati çekmektedir. Kupffer hücrelerinin sitoplazmaları kabarcıklıdır. Metilen mavisi-Azur II-Boraks. x 1300

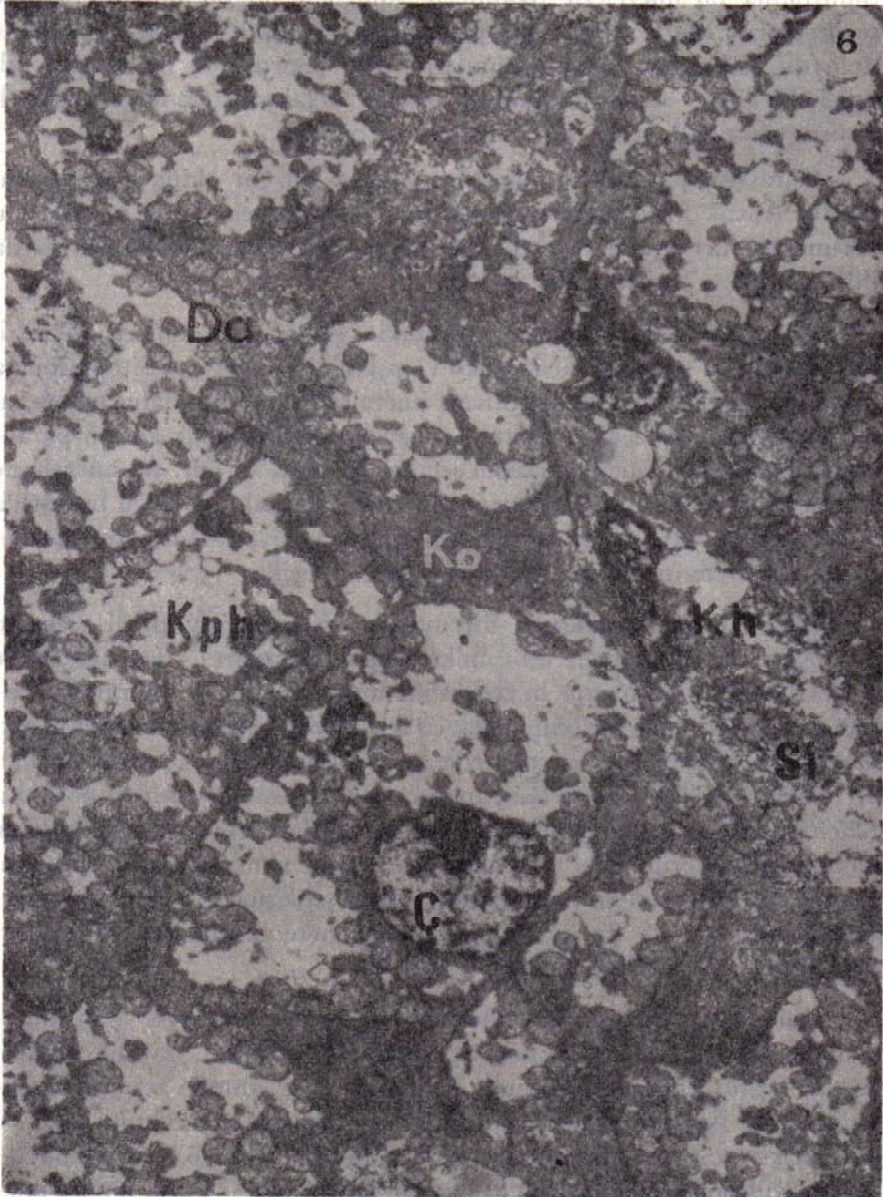
Sinuzoidler bu hücrelerle tıkanmıştı, sinuzoide ait bir boşluk çoğunda seçilmiyordu. Bu hücrelerin sitoplazmaları çeşitli büyüklükte vakuollerle doluydu, kabarcıklı bir görünümü vardı, çekirdekleri bir kenara itilmişti. Birbirine benzer görünümlü, soluk metakromatik boyalı vakuollerin, çoğunlukla içleri boş izlemine veriyordu.

Karaciğer parankima hücreleri lobcuk düzeni oldukça iyi korunmuştu. Ancak bazı bölgelerde yalnızca hücrelerden yapıli odaklar bu korumanın her yerde başarılı olmadığını gösteriyordu. Nekroz ya da iltihabi hücre toplulukları gözlenmedi.

Parankima hücrelerinde çoğunlukla çekirdekler kenara itilmişti. Sitoplasma yer yer daha açık renkli ve şişkin görünüyordu. Sitoplasmada saptanan vakuoller, sinuzoid duvarı hücrelerinkine göre daha büyük, ama sayıca çok daha azdı. Normal insan karaciğerlerinde komşu parankima hücrelerinin hücre zarlarını seçmek oldukça zordur. Bu hücrelerde ise hücre çevresini kuşatan hücre zarından daha kalın ve koyu bu zarıda içine alan bir yapı ya da kalınlaşma dikkati çekiyordu. Bu görüntü nedeniyle hücrelerin sınırları belirgin biçimde seçikti.

Elektron mikroskopu düzeyinde: Küçük büyüttmeli elektron mikrograflarda bulgular, ışık mikroskopu bulgularını doğruluyor ve destekliyordu. Parankima hücrelerinin unit zarları çok belirgindi. Bunun nedeninin bazı yerlerde kollagen telciklerden oluşan demetlerin artmasından (şekil 6,7), bazı yerlerde ise genişlemiş hücreler arası aralığı, bir düze görünümlü koyu bir yapının doldurmasından olduğu görüldü. Küçük hücre adaları çevrelerinde kollagen telciklerin artımı daha açık biçimde seçiliyordu. Yer yer Disse aralığı da aynı yapılarla doluydu. Parankima hücrelerinin biçimlerinde çok köşelilikten öte çeşitlilik vardı. Hücrelerin oval ya da yuvarlak, oldukça heterokromatik çekirdekleri çoğunlukla bir kenara itilmişti (şekil 6).

Karaciğer parankim hücrelerinin stoplazmalarında yer alan, mitokondrionlar hem biçimleri hem iç yapıları yönünden çeşitlilik gösteriyordu. Çoğu çekirdek çevresinde ya da unit zar altında toplanma eğilimindeydi. Azalma gösteren granüllü endoplasma retikulumu kese ve borularıyla çok sıkı komşulukta ve ilişkideydiler (şekil 6,7). Bazı hücrelerde sayılarında azalma bazılarında ise artma vardı. Daha büyük mikrograflarda büyük bir çoğunluğun biçimleri oval ve yuvarlaktı. Bunların yanında lobut, tokmak ya da derin çentikliler görülmüyordu (şekil 8,9, 10). Çoğunun matriksleri koyu tanecikli ya da yer yer alacalı, kristalları ve iç tanecikleri sayıca azalmış ve silikleşmişti ya da aksine oldukça kabalaşmış ve irilmişti. Bir çoğunun dış zarlaesrında dışı doğru şişme (balonlaşma) vardı.



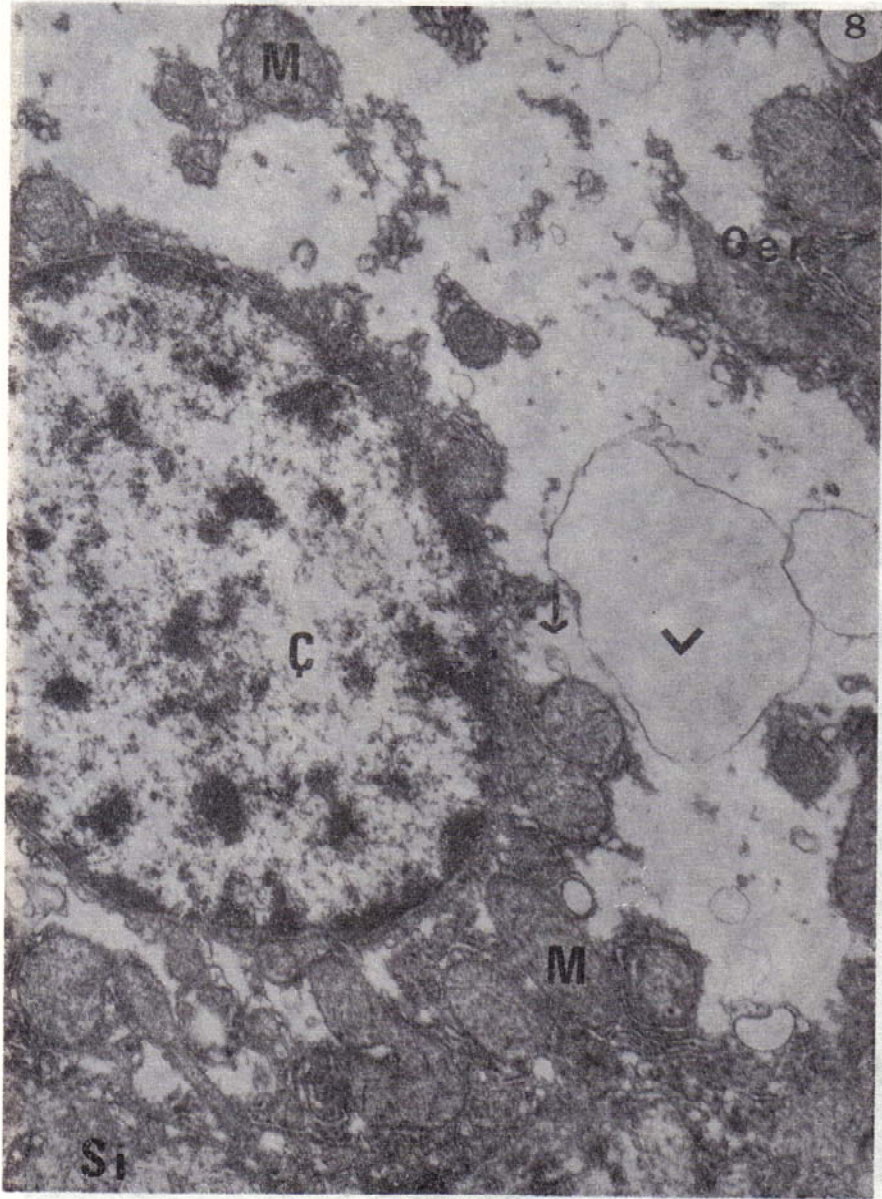
Şekil 6

Küçük büyütmede parankima hücrelerinin (Kph) ve aralarında yer alan sinuzoidlerin (Si) elektronmikrografıdır. Parankima hücrelerinin çevrelerinde özellikle sinuzoide bakan yüzlerine komşu alanda kollagen (Ko) telciklerde artma dikkati çekmektedir. Disse aralıkları (Da) seçilememektedir. Sinuzoidin içini Kupfer hücresi (Kh) bütünüyle doldurmuştur. x 5000



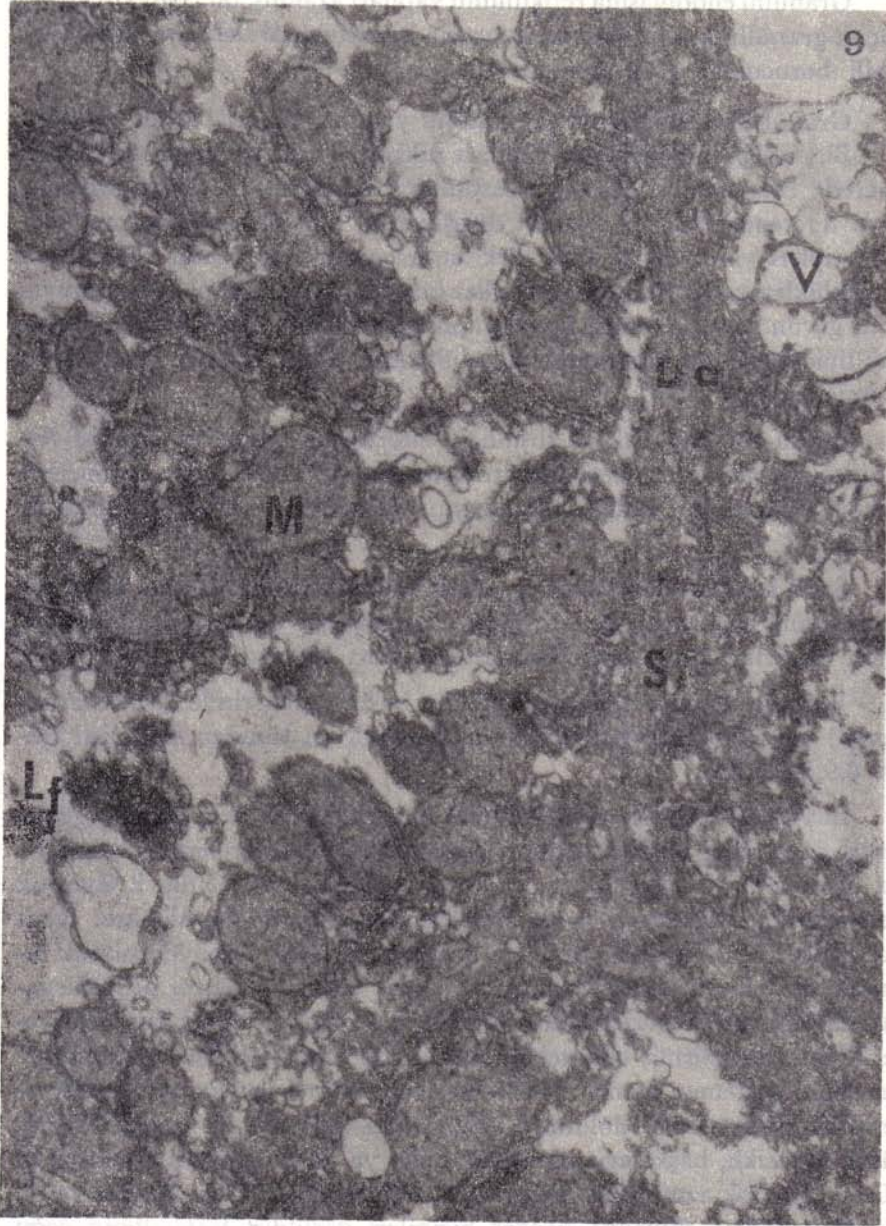
Şekil 7

Genişlemiş bir sinüzoid ve çevresindeki parankima hücrelerini kapsayan küçük büyütmede elektronmikrograftır. Sinüzoid içini Kupffer hücresi (Kh) doldurmuştur. Hücrenin çekirdeği (C) bir kenara itilmiştir. Sitoplasma çeşitli büyüklükte ve iç yapıda vakuollerle (V) sıkıca doldudur. Bu vakuoller hücrenin sitoplasmasını genişletmişlerdir. Normal sitoplasma organel ve yapıları çok daralmış olan kenar bölgelere sıkıştırılmıştır. Disse aralığı (Da) yer yer kollagen (Ko) demetlerle kapatılmıştır. x 5000



Şekil 8

Büyük büyütmede bir karaciğer parankima hücresinin elektron mikroskopi düzeyinde görünümüdür. Çekirdek (Ç) kromatin dağılımıyla normal görünümündedir. Sitoplazmada mitokondrionlarda (M), kümelenmeler ve biçim bozuklukları (at nalı, tokmak, saplı topuzcuk gibi) saptanmaktadır. Mitokondrionların iç yapılarında matriks yoğunlaşması, kristallerin sayıca azalması ya da tersine çoğalması ya da dış zarla dışa doğru balonlaşma (↓) gibi değişiklikler vardır. Granüllü endoplazma retikulumu (Ger) yapılarıyla mitokondrionlar sıkı ilişkidir. Çevreleri bir zarla çevrili çeşitli büyüklükte vakuoller (V) izlenmektedir. Vakuollerin içleri az ya da çok ince tanecikli bir maddeyle dolu görülmektedir. Bazıları boş gibidir. x 18000



Şekil 9

iki karaciğer parankima hücresinin sinuzoid duvarıyla olan komşuluğunu gösteren elektron mikrograftır. Her iki parankim hücresinin sinuzoidal yüzünde mikrovillusların sayısı iyice azalmıştır. Disse aralığı (Da) yoğun bir madde ile doludur. Sinuzoid (Si) duvarını, sitoplazması vakuollerle (V) dolu bir Kupffer hücresi oluşturmaktadır. M.: mitokondrion; Lf.: lipofuscin pigmenti. x 18000

Granüllü endoplasma retikulumu yapıları azalmış, bir çoğu yuvarlak, küçük granüllü keseler biçiminde ya da birbirine paralel ince, uzun, sıkı dizili borucuklar görünümündeydi.

Granülsüz endoplasma retikulumu yapıları çok az olarak görüldü.

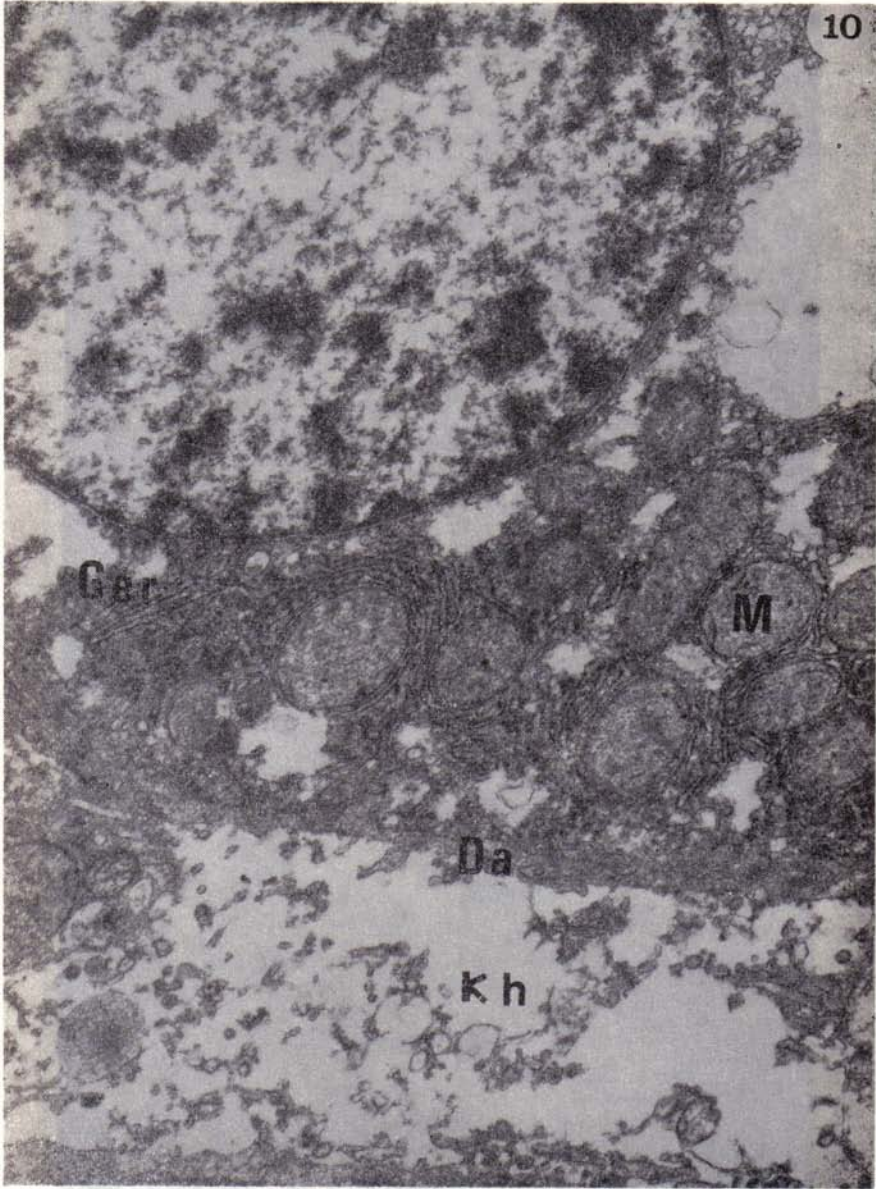
Biz Golgi bileşiğine ait yapıları dikkatli gözlemlerimize göre çoğu hücrede izliyemedik. Birincil lizozomlar çok azalmıştı. İkinci lizozomların hücreden hücreye sayıları değişiyordu, hem heterofajik hem oto-fajik tipleri vardı (şekil 8,9). Tek zarla çevrili kese ya da vakuollerin büyüklükleri çeşitliydi, içleri çoğu kez boş gibi ya da çok soluk bir yapıyla dolu görünüyordu. Bazan zarsal yapılar ya da ince tanecikler ya da küçük lipidik yapılar içlerinde bulunabiliyordu. Mikrocisimler ya da koyu cisimler çok az olarak izlendi.

Bütün bu organellerin dışındaki sitoplasma alanlarını negatif boyanmış glikojen tanecikleri doldurmuştu. Hatta yer yer hücre organelleri glikojen adalarının baskısı altındaymış izlenimini veriyordu (şekil 8, 9,10).

Safra kanalikülleri bazı hücrelerde normal görünümdeydi. Hücreler arası aralığı genişlemiş ve içi yoğun bir maddeyle dolu olanlarda kanalcığın duvarlarındaki mikrovillusların sayıları artmıştı.

Parankima hücrelerinin sinuzoide bakan yüzlerinde (Disse aralığında) çoğunlukla mikrovilluslar azalmış ya da tümünden silinmişti (şekil 8,9,10,11,12).

Büyümüş Kupffer ya da endotel hücrelerinin baskısı altında genişlemiş sinuzoidler içinde bu hücrelerden başka bu hücrelerin iç yapılarına uyan serbest örnekler ya da hücre artıkları vardı. Yüksek fagositik yeteneklerini düşünerek geniş sitoplasmaları, çeşitli büyüklükte: fakat daha çok küçük keselerle dolu bu hücreleri Kupffer hücreleri olarak tanımladık. Ama hücre stoplasmaları o kadar birbirine benzer biçimde yapılarla doluyduki eğer bunların bir bölümü zorunlu olarak fagositoz yeteneklerini geliştirmiş endotel hücresi idiyse bunları diğerlerinden ayırma olasılığı hemen hemen yoktu. Retikuloendotel sisteme ait bu hücrelerin sitoplasmalarını dolduran vakuollerin çoğunun içi boştu. Bir bölümü tanecikli, başkaları çok ince tubuler ya da fibriller yapıydı (şekil 10,11,12). Çok azında bir düzeye görünümlü küçük koyu alanlar ya da zarsal yapıların miyeline benzer biçimleri görüldü. Vakuollerin çoğu birbiriyle birleşme eğilimindeydi. Vakuoller nedeniyle hücrenin kendi sitoplasma matriksi ve organelleri sağa sola itilmişti ve hücre zarları büyük olasılıkla bu şişkinliğe dayanamıyarak yer yer patlamıştı. Hemen çevrelerinde görülen aynı görünümdeki serbest yapılar bunu belirliyordu. Bu tip hücrelerde çekirdekte piknotik değişiklikler saptandı (şekil 9).



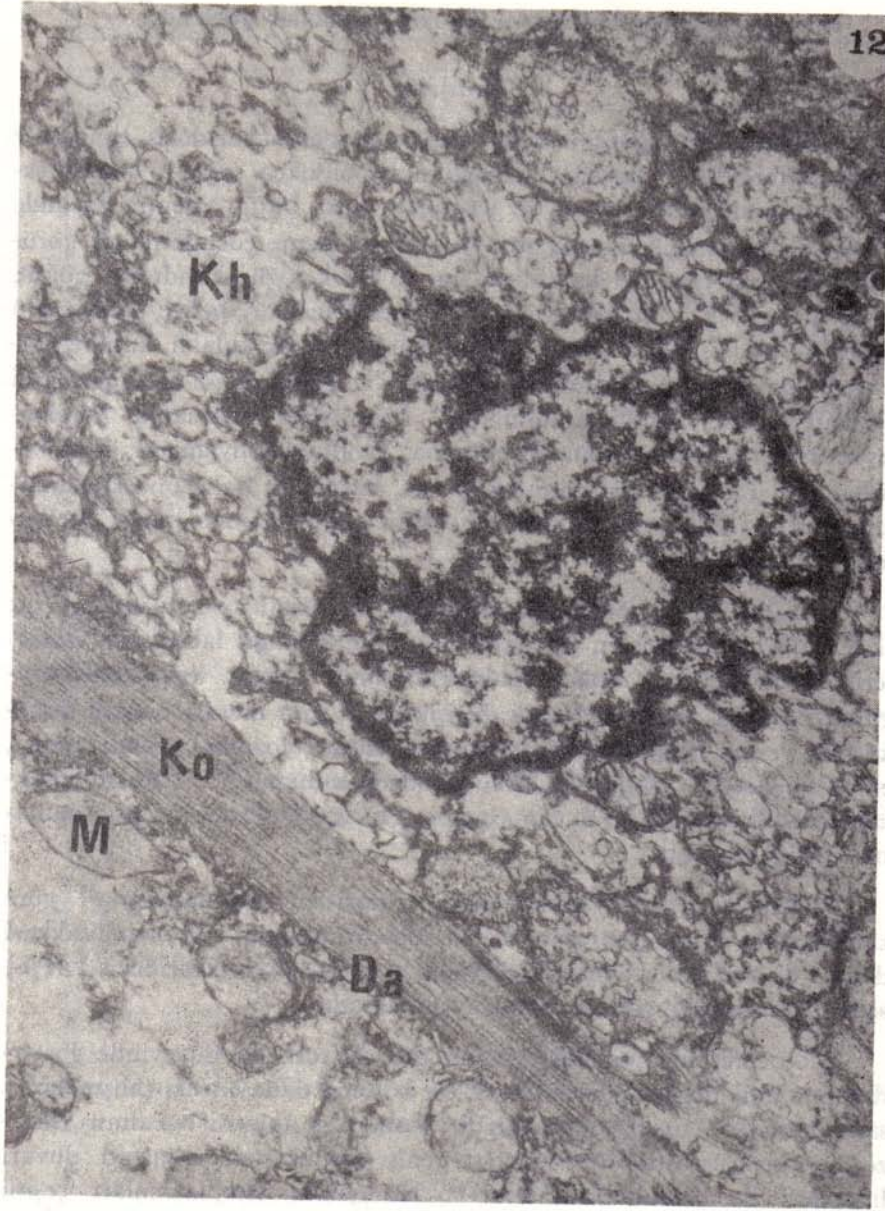
Şekil 10

Karaciğer parankima hücresi, Disse aralığı (Da) ve sinuzoid duvarını yapan Kupffer hücresi (Kh) komşuluğu özelliklerini belirliyen büyük büyütmeli bir elektronmikrograftır. M.: mitokondrion; Ger: granüllü endoplazma retikulumu yapıları. x 18000



Şekil 11

Sinuzoid boşluğunu dolduran büyümüş bir Kupffer hücresi ve komşu karaciğer parankima hücrelerinin büyük büyütmede, ince yapı düzeyinde görünümleridir. Kupffer hücresinin sitoplasması çeşitli büyüklükte vakuollerle (V) doldurur. Vakuollerin içleri boş ya da irice tanecikli yapıdadır. Aralarda, hücrenin kendi organelleri seçilmektedir. Disse aralığı (Da) yer yer kollagen (Ko) telciklerin uzunlamasına ve enine demetleriyle işgal edilmiştir yer yer de iyice daralmıştır ve içinde koyu görünümlü bir madde varlığı dikkati çekmektedir. Karaciğer parankima hücrelerinin bu aralığa bakan unit zarların da mikrovilluslar hemen tümüyle silinmiştir. x 12000



Şekil 12

Sitoplasmasını dolduran çok çeşitli iç yapıdaki ve büyüklükteki vakuollerin bulunuşu nedeniyle büyümüş bir Kupffer hücrenin (Kh), Disse aralığının (Da) ve karaciğer parankima hücrenin büyük büyütmede elektron mikrofıdır.

Ko: Kollagen. x 18000

İtonun yağ hücrelerinde de benzer vakuoller gözlemlendi.

Tartışma

Hastanın öz geçmişi bütün öteki mukopolisakkaridozis tiplerinde olduğu gibi^{20,35,37,38} normal bir doğum ve oldukça sağlıklı bir bebeklik tanımlamaktadır. Ancak bir yaşından sonra bütün vücutta özellikle iskelet gelişmesindeki duraklama ve hızlı gerileme, çocuğun fizik görünümünü (kısa boy, bel kamburu, dar ve basık göğüs, kunduracı göğsü, şiş karın, göbek fıtığı, kısa ve kalın kol ve bacaklar, pençe görünümlü eller, büyük baş, kaba çizgili basık burunlu, büyük kulaklı, kılı ve pigmentli yüz), sinir sistemindeki duraklama ve gerileme ise zeka geriliğini (birkaç sözcük dışında konuşamama, konuşulanı anlamama, hareketlerde aşırı sınırlılık, ayakta duramama, kendini besliememe gibi) belirlemiştir. Bu genel görünümüyle hasta, hastalığın daha önceki tanımlamalarında kullanılmış olan Gargoylism adının hemen bütün özelliklerini taşımaktadır.^{9,16}

Vakanın klinik yönden gösterdiği gittikçe artan ve kötüleşen gidişi: fizik muayene bulguları, özellikle kornea bulanıklığı: laboratuvar değerleri, özellikle idrar mukopolisakkaridlerinde artma: radyolojik bulgular, omurga, kaburga kemik değişiklikleri, kısa mermi biçimli metakarpalar ve bel kamburu ve hastanın kız oluşu (otozomal çekinik geçiş), en çok benzerlik gösterdiği Hunter Sendromundan^{20,37} (Mukopolisakkaridozis II A ve II B) ayrılmasına ve Hurler Sendromu tanısı konmasına neden olmuştur.

Vaka son genetik Mukopolisakkaridozisler sınıflanmasına³⁷ göre kendi grubu içinde yer alan Scheie Sendromundan (Mukopolisakkaridozis I S) ve Hurler-Scheie Birleşiginden (Mukopolisakkaridozis I H/S) **aşırı** zeka geriliği göstermesiyle ayrılmaktadır.

Karaciğer biyopsi materyelinin ışık mikroskopu düzeyinde gösterdiği patolojik değişikliklerin büyük bir bölümü daha önceki çalışmalarda saptananlarla uyum göstermektedir. Lobcuk iç düzeni bozulmuş, sinuzoidler genişlemiştir.^{8,29,44,54} İçleri geniş sitoplazmalı sinuzoid duvarı hücreleri ile doludur.^{8,22,28,29,44,45,54} Hücrelerin sitoplazmaları çeşitli büyüklükte vakuollerle kaplanmıştır.

Karaciğer parankima ve sinuzoid duvarı hücre sitoplazmalarında yeralan vakuollerin sayısı, büyüklük ve yayılışında ayrılıklar vardır. Bazı çalışmalarda, parankim hücrelerinde gözlenen vakuoller daha azdır: ama hacimleri büyüktür.^{22,29} Başka vakalarda tersine sinuzoid duvarı hücrelerindeki vakuoller küçük ve az sayıdadır.^{20,46} Yine başka araş-

tırmalarda ise dikkati çeken hem parankim hem sinuzoid duvarı hücreleridir. ^{8,22,28,44,45,54} Birincilerin vakuelleri çok sayıda ve büyüktür, ikincilerinin ise çok sayıda: fakat küçük ve sıkı düzenlidir.

İncelediğimiz doku kesitlerinde sinuzoid duvarı hücreleri daha çok patolojik değişiklikler göstermektedir. Parankim hücre değişiklikleri birincilere göre daha azdır. Hücreler arasında, Disse aralığında ve sinuzoid boşluğu içinde depo maddesinin hücre dışına çıktığını gösteren yapı bilim bulguları saptanmıştır (toluidin mavisiyle metakromatik boyalı, belli bir biçimi ve yapısı olmayan madde). Aynı bulguları başka araştırmacılar da gözlemişlerdir. ^{8,21,22,28,29,44,45,54}

Işık mikroskopu düzeyinde patolojik değişiklikler, hücre olarak, parankim hücrelerinde, sinuzoid duvarı hücrelerinde ve portal aralık fibroblastlarında izlenmektedir. ^{8,22,27,28,29,44,45,46,54} Bizim doku kesitlerimizde de aynı hücrelerde hastalık belirtileri olan yapısal bozukluklar vardır.

Hastadan alınan biyopsi örneği çok küçük olduğundan vakuoller içindeki maddenin mukopolisakkarit olduğunu doğrulayacak özel tesbit ve boyama yöntemleri ^{14,21,28} uygulanamamıştır. Ancak kalın kesitlerin metilen mavisi (birleşik boya içinde) ve toluidin mavisi ile boyanmalarında, vakuollerin hafif de olsa metakromatik boyandığı ^{21,22,28,29} saptanmıştır.

İlk elektron ^{44,54} mikroskopik araştırmadan beri hastalık çeşitli yaş gruplarında (3 ve 15 yaş), biyopsi ve otopsi örneklerinde incelenmiş, doku ve hücre düzeyinde, kendine özgü denebilecek patolojik değişiklikler saptanmıştır. ^{8,22,27,28,29,44,45,54} En genç hastaya ait çalışma yedi aylık bir bebeğe aittir. ⁴⁶ Ancak bu bulgular Haust ve arkadaşlarının ²² da belirttikleri gibi biyopsinin alındığı ya da otopsinin yapıldığı dönemleri saptar. Daha doğru bir deyişle hastalığın o dönemlerini tanımlayan yapısal kesitleri verir. Ayrıca kanımıza göre her hastanın kişisel yapı özelliklerine bağlı olarak hastalığın ortaya çıkış, ilerleyiş ve bitiş farklılıklarına ait doku ve hücre değişikliklerini de bunlara katmamız gereklidir. Hastalığın az görülür oluşu da bütün bunlara eklenirse, eldeki patolojik yapıbilim değerlerinin yeterli ve hastalığı baştan sona tanımlayıcı olduğunu kabul etmek oldukça zordur ve araştırmalar arasındaki ayrılıkların nedenlerini bir ölçüde açıklayıcıdır.

Elektron mikroskopu bulguları değerlendirmelerimiz Haust ve arkadaşlarının ²² 6 yaş civarı bulgularıyla uyum göstermektedir. Parankim hücrelerinde mitokondrion değişiklikleri açıktır. Granüllü endoplazma retikulumu yapıları azalmıştır. Granülsüz endoplazma retikulumu borucukları ise çok daha azdır.

Mitokondrionlarda gözlenen patolojik değişikliklerin büyük bölümü, kendi iç yapıları ve granüllü endoplazma retikulumu borucuklarıyla olan ilişkilerine göre, artan enerji gereksinmesini karşılamak üzere hızlanmış olan işleve ait olmalıdır. Bu organelin hastalığın daha ileri döneminde hastalığın belirtisi ve nedeni olan depo vakuollerine dönüştüğüne ait bir belirti saptanamamıştır. Oysa bir grup araştırmacı mitokondrion değişikliklerinin ileride depo vakuollerini oluşturunca yönde olduğunu ileri sürmüşlerdir.²²

Parankim hücrelerinde sitoplazmada yer alan tek zarla çevrili çeşitli büyüklükteki vakuoller depo materyelinin yapıldığı ve içinde biriktirildiği organeller yani ikincil (sekonder) lizozomlardır.¹¹

İkincil lizozomlar ışık mikroskopu değerlerinin tartışmasında da kısaca belirttiğimiz gibi parankim hücrelerinde, sinuzoid duvar hücrelerinde (Kupffer, endotel ve Ito yağ hücreleri) ve Portal aralık bağ dokusu fibroblastlarının sitoplazmalarında ortak olarak görülen yapılardır. Sayıları, iç yapıları ve hacimleri yönünden çeşitlilik göstermektedirler.^{8,22,27,28,29,44,45,46} Yukardaki hücrelerden hangisinde ilkdeğişikliğin ortaya çıktığı gösterilmemiştir.^{8,22,27,28,29,44,45,46} Ancak ilk hastalık belirtisinin fagositik hücrelerde başlamış olması, sonra bu hücrelerin aşırı birikmeyi taşıyamayıp, bu patolojik ürünlerini (yarı yıkılmış mukopolisakkaritler) sinuzoide boşaltmaları ve bunların yeniden başka hücrelerce endositosis yoluyla toplanmaları varsayımını kabul etmek oldukça doğru olmalıdır.⁴⁸ Kan yoluyla bir bölüm mukopolisakkarit ise böbreklerden süzülerek idrarla atılmaktadır. Bu atılma idrarda saptanmaktadır.^{13,39,40}

Klinik belirtilerin ortaya çıkması ve süregelen ilerleyici olması mukopolisakkaritlerin birikimine bağlıdır. Örneğin gittikçe artan kemik genişlemeleri ve biçim bozuklukları, karaciğer-dalak büyümesi, kornea bulanıklığı gibi.

Elektron mikroskopta izlenen yapıbilim bulguları yukardaki varsayımı doğrulayıcı yöndedir. Kupffer ve endotel hücreleri sitoplazmaları çok sayıda, çeşitli büyüklükte, bazıları birleşik ikincil lizozom tipi, tek zarla sarılı vakuollerle doludur. Bazı hücrelerin hücre zarları yırtılmış ve ikincil lizozomları iç yapılarıyla sinuzoide ve Disse aralığına geçmiştir. Hücreler arasındaki, daralmış sinuzoid boşluğundaki ve Disse aralığındaki bir düze görünümlü yapı bunun görüntüsüdür.^{14,21}

Normal koşullarda, hücre içinde, lizozomlarda sindirilen maddelerden ortaya çıkan son ürünler ya hücrece yeniden kullanılır ya da artık madde olarak kalır. Bu artıklar ya hücreden atılır (hücre defekasyonu) ya da artık ürün olarak örneğin lipofüksin pigmenti biçiminde sitoplazmada kalırlar.

Golgi birleşiginden sitoplazmaya geçen birincil (primer) lizozomlardaki enzimlerin ard arda işleme girişleri sindirimi sağlar. Enzim dizisindeki bir kusur ya da eksiklik sindirilecek maddenin enzimin eksik ya da kusurlu olduğu basamakta işlevin durmasına ve sindirilen maddenin daha küçük moleküllere ayırlamamasına neden olur. Yarı parçalanmış madde işlemin olaylandığı ikincil lizozom içinde kalır ve birikir.¹⁵

Birincil ve ikincil lizozomlar çok çeşitli sindirim enzimlerini taşıyan hücre sindirim organelleridir.³

Hurler sendromunda parçalanması gereken madde mukopolisakkaritlerdir.¹¹ Bu güne kadar olan bilgi birikimi^{18,19,33,34,43} alfa-L-iduronidase enzim eksikliğini saptamıştır.^{23,24,32} Bu enzim eksikliği kalıtsal olarak geçmekte ve mukopolisakkaritlerin ikincil lizozomlar içinde, daha alt ürünlerine parçalanamadan büyük heparan sülfat ve dermatan sülfat molekülleri halinde birikmesine neden olmaktadır.

Depolanan yarı yıkılmış mukopolisakkarit moleküllerinin elektronmikrograflarda görünüşleri oldukça çeşitlidir (ince tanecikli, çok ince fibrilli, miyelin benzeri zarlı ya da boş görünüm verecek biçimde bir düzeye).

Bizim ince kesitlerde ve elektronmikrograflarda inceliyebildiğimiz ikincil lizozomların iç yapı görünüşleri yukardakilerle uyum gösteriyordu.

Çok sayıdaki ikincil lizozoma karşın karaciğer parankim ve sinuzoid duvarı hücrelerinde birincil lizozom izleyemedik. Bunun nedeni oluşanların hızla ikincil lizozom haline dönüşmeleri olmalıdır. İncelediğimiz çalışmalarda da birincil lizozomlar izlenememiştir.^{8,22,28,29,44,45,46,54} Mitokondrion ve granüllü endoplazma retikulumu yapılarındaki değişikliklerde daha çok birincil lizozom yapma ihtiyacına bağlı olmalıdır.

Karaciğer parankima hücrelerinde izlenen vakuoller, sinuzoid duvarı hücrelerinde izlenenlerle aynı görünüm ve yapıda olup ikincil lizozomlardır. İçlerinde depo maddesi vardır. Bu vakuollerin oluşması bu hücrelerin az da olsa fagositik yetenekli oluşlarındanır.⁸ Ayrıca bu hücreler mukopolisakkarit metabolizmasına sınırlı da olsa katılan hücrelerdir.

Disse aralığının gösterdiği patolojik değişiklik, bu aralığın depo maddesiyle dolması sonucu, normal işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu dar aralığa bakan karaciğer parankima hücreleri sinuzoidal yüzlerinde de yapı bilim değişiklikleri ortaya çıkmıştır (mikrovillüsler çok

azalmıştır). Bu birbirine bağlı normal işlevi olumsuz etkileyici bozukluklar, karaciğer hücresinde beslenme yetersizliğine ve aralığın kollajen telciklerle tıkanmasına doğru gelişen ve birbirini izleyen kısır döngüye neden olmaktadır kanısındayız. Bu kanıyı doğrulayıcı kaynak bulgu saptanamamıştır.

Kısaca özetlemek gerekirse bugünkü bilgilere göre Hurler sendromu, hücre sindirim organelleri, lizozomlarda enzim düzeyindeki bir eksikliğe bağlı olarak gelişen ve süregelen olarak ilerleyen kalıtsal bir lizozom hastalığıdır. Karaciğer ince yapı düzeyindeki yapı bilim gözlemlerimiz bunu destekler ve doğrular yöndedir.

Özet

Klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguları nedeniyle Hurler sendromu (Mukopolisakkaridozis IH) tanısı konan bir hastadan elde edilen karaciğer iğne biopsi materyeli ışık ve elektron mikroskopu düzeyinde araştırılmıştır.

Işık ve elektron mikroskopu patolojik bulguları kaynak araştırma değerleriyle karşılaştırılmış ve kendi yaş grubuyla uyum gösterdiği saptanmıştır.

İnce yapı bulguları hastalığın lizozomlarda geliştiğini ve bir lizozom hastalığı olduğunu doğrular yöndedir.

KAYNAKLAR

1. Bartman, J. and Blanc, W. A.: Fibroblast cultures in Hurler's and Hunter's Syndromes. An Ultrastructural Study. Arch. Pathol. **89**: 279, 1970.
2. Belcher, R. W.: Ultrastructure of the Skin in Genetic Mucopolysaccharidoses. Arch. Pathol. **94**: 511, 1972.
3. Belcher, R. W.: Ultrastructure and Function of Eccrine Glands in the Mucopolysaccharidosis. Arch. Pathol. **96**: 399, 1973.
4. Bloom, W. and Fawcett, D. W.: A Textbook of Histology. W. B. Saunders Comp., p. 48, 1975.
5. Brailsford, J. F.: Chondro-osteo-dystrophy: Roentgenographic and Clinical Features of a Child with Dislocation of Vertebrae. Amer. J. Surg. **7**: 404, 1929.
6. Brante, G.: Gargoylism: a Mucopolysaccharidosis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. **4**: 43, 1952.
7. Brown, D. H.: Tissue Storage of Mucopolysaccharides in Hurler-Phaundler's disease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **43**: 783, 1957.
8. Callahan, W. P. and Lorincz, A. E.: Hepatic Ultrastructure in the Hurler Syndrome. Am. J. Path. **48**: 277, 1966.
9. Cockayne, E. A.: Gargoylism (chondro-osteo-dystrophy, hepatosplenomegaly, deaf ness) in two brothers. Proc. Roy. Soc. Med. **30**: 104, 1936.

10. Collina, A., Pirazzoli, P., Cicognani, A., Tassoni, P., Salardi, S., Cacciari, E.: Mucopolisaccharidosi: Moderni Orientamenti Diagnostici, Etiopatogenetici e Terapeutici. *Minerva Pediatrica*. **24**: 2072, 1972.
11. Danes, B. S. and Bearn, A. G.: Hurler's Syndrome: Demonstration of an Inherited Disorder of Connective Tissue in Cell Culture. *Science*. **149**: 987, 1965.
12. De Cloux, R. J. and Friederici, H. R.: Ultrastructural Studies of the Skin in Hurler's Syndrome. *Arch. Pathol.* **88**: 350, 1969.
13. Dorfman, A. and Lorinz, A. E.: Occurrence of Urinary acid Mucopolysaccharides in the Hurler Syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **43**: 443, 1957.
14. Dorfmann, A. and Matalon, R.: The Hurler and Hunter Syndromes. *Amer. J. Med.* **47**: 691, 1969.
15. Dorfman, A. and Matalon, R.: The Mucopolysaccharidoses, In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S. (ed. 3). New York, Mc Graw-Hill, p. 1218, 1972 (Kaynak 44'den alınmıştır).
16. Ellis, R. W. B.: Gargoylism (chondro-osteo-dystrophy, corneal opacities, hepatosplenomegaly and mental deficiency). *Proc. Roy. Soc. Med.* **30**: 158, 1936.
17. Foley, K. M., Danes, B. S. and Bearn, A. G.: White Blood Cell Cultures in Genetic Studies on Human Mucopolysaccharidoses. *Science*. **164**: 424, 1969.
18. Frantoni, J. C., Hall, C. W. and Neufeld, E. F.: The defect in Hurler's and Hunter's Syndromes, Faulty Degradation of Mucopolysaccharide. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **60**: 699, 1968.
19. Frontoni, J. C., Hall, C. W. and Neufeld, E. F.: Hurler and Hunter Syndromes: Mutual Correction of the Defect in Cultured fibroblasts. *Science*. **162**: 570, 1968.
20. Groover, R. V., Burke, E. C., Gordon, H. and Berdon, W. E.: The Genetic Mucopolysaccharidoses. *Seminars in Hematology*. **9**: 371, 1972.
21. Haust, D. M. and Landing, B. H.: Histochemical Studies in Hurler's Disease: A new Method for Localization of Acid Mucopolysaccharide, and an Analysis of Lead Acetate "Fixation". *J. Histochem. Cytochem.* **9**: 79, 1961.
22. auHst, M. D., Orizaga, M., Bryans, A. M. and Frank, H. F.: The Fine Structure of Liver in Children with Hurler's Syndrome. *Exp. Molec. Path.* **10**: 141, 1969.
23. Hers, H. G.: Inborn Lysosomal Diseases. *Gastroenterology*. **48**: 625, 1965.
24. Hers, H. G. and Van Hoof, F.: The Genetic Pathology of Lysosomes. *Progr. Liver Dis.* **3**: 185, 1970.
25. Hurler, G.: Über einen Typ Multipler Abortungen, Vorwiegend am Skelettsystem. *Z. Kinderheilk.* **24**: 220, 1919.
26. Hunter, C.: A Rare Disease in Two Brothers. *Proc. Roy. Soc. Med.* **10**: 104, 1917.
27. Lafon, J., Berard-Badier, M., Chamlian, A., Mariani, R., Casanova, P. et Adechy-Benkoel, L.: Étude Ultrastructurale des Cellules Périsinusoidales du Foie dans Trois Cas des Mucopolysaccharidoses. *Pathologie Biologie*. **20**: 15, 1972.
28. Lagunoff, D. and Gritzka, T. L.: The Site of Mucopolysaccharide Accumulation in Hurler's Syndrome an Electron Microscopic and Histochemical Study. *Lab. Invest.* **15**: 1578, 1966.
29. Loeb, H., Jonniaux, G., Resibois, A., Cremer, N., Dodion, J., Tondeur, M., Gregoir, P. E., Richard, J. and Cleters, P.: Biochemical and Ultrastructural Studies in Hurler's Syndrome. *J. Pediat.* **73**: 860, 1968.

30. Loeb, H., Topped, M. and Cremer, N.: Clinical, Biochemical and Ultrastructural Studies of an atypical Form of Mucopolysaccharidosis. *Acta Paediat. Scand.* **58**: 220, 1969.
31. Maroteaux, P. and Lamy, M.: Hurler's Pseudopolydystrophy. *La Press Médicale.* P. **I**: 74: 2889, 1966.
32. Matalon, R. and Dorfman, A.: Hurler's syndrome, $\alpha\alpha$ -L-iduronidase Deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **47**: 959, 1972.
33. Mc Brinn, M., Okada, S., Hu, C. C., Ho, M. W. and O'Brien, J. S.: Generalized Gangliosidosis: Impaired Cleavage of Galactose from Mucopolysaccharide and glycoprotein. *Science.* **28**: 946, 1968.
34. Mc Brinn, M., Okada, S., Woollacott, M. B. S., Vimal Patel, B. S., Mac Wan Ho., Tappel, A. L. and O'Brien, J. S.: Beta-Galactosidase Deficiency in the Hurler Syndrome. *New Eng. Med.* **281**: 338, 1969.
35. Mc Kusick, V. A.: Heritable Disorders of Connective Tissue (ed. 3). St. Louis. Mosby, 1966.
36. Mc Kusick, V. A.: Nosology of the Mucopolysaccharidoses. *Amer. J. of Med.* **47**: 730, 1969.
37. Mc Kusick, V. A.: Heritable Disorders of Connective tissue. The C. V. Mosby Comp. 4th ed. 1972.
38. Mc Kusick, V. A., Kaplan, D., Wise, D., Harley, W. B., Suddarth, S. B., Servick, M. E. and Maumane, A. E.: The Genetic Mucopolysaccharidoses. *Medicine (Balt).* **44**: 445, 1965.
39. Meyer, K.: Biochemistry and Biology of Mucopolysaccharides. *Amer. J. Med.* **47**: 664, 1969.
40. Meyer, K., Grumbach, M. M., Linker, A. and Hoffman, P.: Excretion of Sulfated Mucopolysaccharides in Gargoylism (Hurler's Syndrome). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **97**: 275, 1958.
41. Morquio, L.: Sur une Forme de Dystrophie Osseuse Familiale. *Bull. Soc. Pediat. Paris.* **27**: 145, 1929.
42. Neufeld, E. F.: Mucopolysaccharidoses: The Biochemical approach. *Hosp. Proct.* **7**: 107, 1972.
42. Neufeld, E. F.: Mucopolysaccharidoses: The Biochemical approach. *Hosp. Proct.* **7**: 107, 1972.
43. Okada, S. and O'Brien, J. S.: Generalized Gangliosidosis: β -galactosidase Deficiency. *Science.* **160**: 1002, 1968.
44. Orizaga, M., Haust, M. D., Bryans, A. M. and Frank, H.: Electron Microscopic Study of Liver in Hurler's Syndrome. *Fed. Proc.* **22**, II Suppl. **13**: 484, 1963.
45. Oudea, P., Terris, I. and Oudea, M. C.: L'ultrastructure Hépatique au cours de la Maladie de Hurler. *Parth. et Biol.* **13**: 315, 1965.
46. Özoran, Y., Kerse, İ., Demirağ, B., Berki, R., Abal, G., Yüksel, M., Erüreten, İ. ve Muhuttin, H.: Bir Hurler Sendromu vakası (Klinik, Işık ve Elektron Mikroskopik çalışma). *Hacettepe Tıp/Cerrahi Bül.* **7**: 455, 1974.
47. Reynolds, E. S.: The Use of Lead Citrate at High Ph as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208, 1963.
48. Robins, S. L.: Pathologic Basis of Disease, Mucopolysaccharidosis (M. P. S), W. B. Saunders Comp., p. 304, 1974.

49. Silberberg, R., Rimoin, D. L., Rosenthal, R. E. and Hasler, M. B.: Ultrastructure of Cartilage in the Hurler and Sanfilippo Syndromes. *Arch. Path.* **94**: 500, 1972.
50. Spicer, S. S., Garvin, A. J., Wohltmann, H. J. and Simson, J. A. V.: The Ultrastructure of the Skin in Patients with Mucopolysaccharidoses. **31**: 488, 1974.
51. Stacey, M. and Barker, S. A.: Chemical Analysis of Tissue Polysaccharides. *J. Clin. Path.* **9**: 314, 1956.
52. Tuthill, C. R.: Juvenile Amaurotic Idiocy, Marked Adventitial Growth Associated with Skeletal Malformations and Tuberculomes. *Arch. Neurol. and Psychiat.* **32**: 198, 1934.
53. Uzman, L. L.: Chemical Nature of the Storage Substance in Gargoylism: Hurler-Phaundler's disease. *Arch. Path. (Chicago)*. **60**: 308, 1955.
54. Van Hoof, F. and Hers, H. G.: L'ultrastructure des Cellules Hépatiques dans la Maladie de Hurler (Gargoylisme). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*. **259**: 1281, 1964.
55. Watson, M. L.: Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. **4**: 475, 1958.