

(Aus der Physiologischen Anstalt der Universität Jena.)

Über die Verteilung des Glykogens und der Lipoide in der quergestreiften Muskelfaser.

Von
A. Noll.

(Eingegangen am 24. April 1937.)

Durch Anwendung histochemischer Untersuchungsmethoden läßt sich nicht nur die chemische Zusammensetzung vitaler Zellstrukturen erkennen, sondern man vermag auch maskierte Plasmabestandteile sichtbar zu machen, wenn es gelingt, eine Phanerose derselben durch tiefgehende chemische Eingriffe hervorzurufen.

So ließen sich in den Muskelfasern vordem mikroskopisch nicht nachweisbare Lipoide durch künstliche Verdauung mit Pepsinsalzsäure, Lipoide und Glykogen durch 5% Kalilauge darstellen und quantitativ beurteilen¹.

Die mikroskopisch wahrnehmbare Wirkung der Kalilauge auf quergestreifte Muskulatur besteht darin, daß infolge eines Entmischungsvorganges Tröpfchen bzw. Granula innerhalb der Fasern zur Ausscheidung gelangen. Hierzu sei auf die früheren Beschreibungen und Abbildungen verwiesen (l. c.). Diese Ausscheidungsprodukte färben sich nach Alkoholhärtung an Celloidinschnitten mit Jodlösung braun und mit der Bestschen Carminmethode rot und erweisen damit ihren Gehalt an Glykogen; nach Behandlung der Schnitte mit Speichel kommen die Färbungen nicht mehr zustande. Andererseits gelingt es, in mit Osmiumsäure fixierten Fasern schwarze Granula darzustellen. Ein Vergleich der nach beiden Verfahren gewonnenen Präparate machte es wahrscheinlich, daß es sich beide Male um dieselben Tropfen und Granula handeln müsse.

Um hierfür sichere Beweise zu bringen und Schlüsse auf die Herkunft der Tropfen ziehen zu können, stellte ich weitere Beobachtungen an frischer Muskulatur an, wozu wegen ihres verhältnismäßig bedeutenden Lipoid- und Glykogengehaltes Pferdemuskulatur sich besonders gut eignete.

Gibt man zu frisch zerzupften Muskelfasern unter dem Deckglas 5% wäßrige Kalilauge hinzu, so tritt sofort die Ausscheidung der Tröpfchen ein, die durch ihr starkes Lichtbrechungsvermögen sehr deutlich sind. Hierbei handelt es sich nicht etwa um ein Sichtbarwerden vital (?) vorhandener Sarcosomen, die im Pferdemuskel überhaupt nur in verschwindender Anzahl, meist gar nicht vorkommen. Die granulaartigen

¹ Noll, A.: Arch.f.(Anat. u.) Physiol. **1913**, 35. — Virchows Arch. **293**, 409 (1934).

Tröpfchen liegen in regelmäßigen Längsreihen in der Faser angeordnet. Die einzelnen Fasern unterscheiden sich sehr auffallend durch ihren verschiedenen Gehalt an ihnen. Die meisten Fasern sind wie mit Tröpfchen besät, eine viel geringere Anzahl enthält nur wenige Granula. Die ersten, schmäleren, sind zweifellos die sarcoplasmareichen, trüben Fasern. Das Auftreten dieser Tröpfchen läßt sich noch besser verfolgen, wenn man statt der 5% eine dünnere, etwa 1% Kalilauge verwendet. Man sieht dann, wie die anfangs noch sichtbare Querstreifung allmählich verschwindet, während unter der stürmischeren Wirkung der 5% Kalilauge das anfängliche Nebeneinanderbestehen beider Strukturen weniger deutlich in Erscheinung tritt. Die 5% Kalilauge nun verändert im weiteren Verlauf das ursprüngliche Bild, die Tröpfchen verlieren ihre regelmäßige Anordnung in Längsreihen und lagern zu Gruppen zusammen, zwischen denen granulafreie Partien auftreten. Es können sich auch größere Tropfen bilden. Später sieht man stellenweise die Körnchen aus den Fasern austreten, wobei eine Art Fließen, ähnlich der Körnchenströmung pflanzlichen Protoplasmas, auftritt.

Wird einem der Kalilauge entnommenen Zupfpräparat 96% Alkohol unter dem Deckglas zugegeben, dann verlieren die Tröpfchen an Deutlichkeit, sie werden schwächer lichtbrechend, sind aber noch vorhanden.

Zur Fettfärbung verwendete ich Osmiumsäure und Sudan III. Die Osmiumsäure färbte am besten, wenn das Muskelstückchen nach der Behandlung mit Kalilauge ausgiebig gewässert worden war. Kam es nach 18ständigem Wässern auf 24 Stunden in 1% Osmiumsäure, dann trat eine Braufärbung der Tropfen ein, die bei nachfolgender Einwirkung von 70% Alkohol in Schwarz überging. Die Färbung war bei rasch vor genommener Einbettung in Celloidin haltbar. Im Zupf- wie im Schnittpräparat ließ sich in Übereinstimmung mit der Beobachtung der frischen Fasern erkennen, daß die Fasern nicht alle gleich viele Tropfen enthalten.

Mit Sudan III gelingt die Färbung aller ausgeschiedenen Tropfen vollkommen, ohne daß man die Kalilauge erst durch Wasser zu entfernen braucht. Es läßt sich unter dem Deckglas verfolgen, wie vom Rand her bei dem Eindringen der Farblösung die Färbung fortschreitet und daß auch die kleinsten Formen der Färbung nicht entgehen. Eine Verwechse lung größerer, aus der Faser ausgetretener Tropfen mit Bindegewebsfett ist auszuschließen, da das letztere eine mehr gelbliche Farbe annimmt. Es ist nun auffallend, daß wenn man die Stückchen aus der Kalilauge auf einige Stunden in 96% Alkohol legt, im Zupfpräparat die Tröpfchen sich nicht mehr färben lassen. Daß sie trotzdem noch vorhanden sind, läßt sich ohne weiteres erkennen. Eine vollständige Lösung ist also nicht eingetreten, doch kann sehr wohl die vorangegangene Behandlung mit Kalilauge die sonst gegen kalten Alkohol resistenten Lipide löslicher gemacht haben. Jedenfalls ist es unmöglich, im Celloidinschnitt die Tropfen noch mit Sudan zu färben. Dies gelang auch nicht, wenn die

Muskelstückchen aus der Kalilauge in Formol-Alkohol (10% Formol in 70% Alkohol) übergeführt waren und dann in 96% Alkohol kamen; dann nimmt nur das Bindegewebsfett die Sudanfärbung an. Der Formol-Alkohol an sich bewirkt noch nicht das Versagen der Färbung, denn an Zupfpräparaten aus Formol-Alkohol läßt sich sehr wohl noch die Färbung der Tropfen erzielen.

Zum Nachweis des Glykogens erwies sich am Zupfpräparat alkoholische Jodlösung geeigneter als wäßrige Jodlösung. Nach Zusatz von Jodtinktur zu einem aus Kalilauge entnommenen Zupfpräparat konnte ich freilich eine so vollkommene Färbung der Tropfen, wie sie mit dem *Bestschen Carmin* gelingt, nicht erzielen, die Braunfärbung war aber an günstigen Stellen deutlich, sie erfolgte jedoch langsam. Indessen besteht kein Zweifel darüber, daß es dieselben Gebilde sind, die die Fett- und die Glykogenfärbung geben. Im Celloidinschnitt kommt die Braunfärbung sowohl der kleinen als der größeren Ausscheidungsprodukte sehr viel besser zustande, und hier auch mit *Lugolscher Lösung*. Die besten Färbungen lieferten die Formolpräparate. Mit Speichel vorbehandelte Schnitte gaben keine Färbung mehr, die Lipoidbestandteile der Tröpfchen traten aber noch hervor, wenn der Schnitt nur mit *kaltem* Alkohol in Berührung gekommen war. Die *Bestsche Carminfärbung* lieferte die vollkommensten Bilder, die Schnitte zeigen die Tropfen in allen Größen bis zu Kerngröße und darüber und alle Übergänge vom Anfangsstadium der Kalilaugewirkung bis zu den durch die Destruktion des Faserinhalts gewordenen Veränderungen, die am stärksten an den Schnitträndern sind. Hier sind die Fasern infolge der lösenden Wirkung der Lauge außerordentlich verschmälert, dann aber auch die Granula zum Teil verlorengegangen. Zur quantitativen Schätzung des Glykogens können solche Stellen nicht benutzt werden. Die Kerne der Muskelfasern sind überall erhalten, aber nicht mehr so gut färbbar mit Hämalaun.

Will man die vorstehenden Beobachtungen für die Histochemie der quergestreiften Muskelfaser verwerten, so ist vorweg zu betonen, daß die Tröpfchen bzw. Granula absichtlich gewonnene Kunstprodukte im Sinne der Histologen sind.

Ob man die Wirkung der Kalilauge so aufzufassen hat, daß sie Adsorptionsbindungen oder chemische Bindungen löst, sei dahingestellt. Im letzteren Falle hätte man an Lecithin-Eiweißverbindungen zu denken, die allerdings nicht allgemein anerkannt werden, sowie an die Glykogenproteinsymplexe, die *Willstätter* und *Rohdewald*¹ im Pferdemuskel in bedeutend größerer Menge als das freie Glykogen fanden. Das Auftreten der Tröpfchen, wie man es nach Zusatz der Kalilauge unter dem Mikroskop wahrnimmt, geht so rasch und gleichmäßig vor sich, daß in diesem ersten Stadium schwerlich eine tiefergehende chemische Umwandlung

¹ *Willstätter, R. u. M. Rohdewald:* Hoppe-Seylers Z. 225, 103 (1934).

statthat. Im weiteren Verlauf der Wirkung aber wird sicherlich Muskeleiweiß aufgelöst, was sich durch die starke Verschmälerung der Fasern kundgibt. Die Kalilauge hat schließlich eingreifende chemische Veränderungen hervorgebracht, die über ähnliche Wirkungen anderer Agentien, auch der Autolyse, weit hinausgehen.

Das Ergebnis der Entmischung sind also die aus Lipoiden und Glykogen bestehenden Tropfen, die anfangs wohl auch Eiweiß, später aber kaum noch solches enthalten dürften.

Die Granula und Tropfen verdanken ihr Sichtbarwerden im ungefärbten Präparat so gut wie ausschließlich ihrem Lipoidgehalt. Das geht ohne weiteres daraus hervor, daß sie in den lipoidreichen Fasern der roten Muskeln viel deutlicher als in den weißen hervortreten, obgleich gerade in den letzteren das Glykogen überwiegt¹. Hiervon habe ich mich durch den Vergleich der roten Schenkel- und der weißen Brustmuskulatur des Huhnes überzeugt. Man könnte das Lipoid als die Trägersubstanz im Sinne *Ehrlichs*² bezeichnen.

Schon die älteren histologischen Befunde wie auch die chemischen Bestimmungen führten zu der Annahme, daß die Lipoide in der Hauptsache Bestandteile des Sarcoplasmas sind. Man stützte sich auf den Vergleich der roten, sarcoplasmareicher, und der weißen, sarcoplasmärmeren Muskeln³. Mit Hilfe der künstlichen Verdauung mit Pepsinsalzsäure konnte ich⁴ zeigen, daß die sarcoplasmareicher Fasern die lipoidreicher sind. Ich habe mich jetzt auch mit der Kalilaugemethode davon überzeugt, daß die Lipoide in den oben geschilderten Formen sich im frischen Präparat sowie nach Färbung mit Sudan oder Osmiumsäure in den roten Muskeln in viel größerer Menge als in den weißen darstellen lassen. Quantitative chemische Bestimmungen führten zum gleichen Ergebnis⁵. Nach *Sorg* beträgt die Phosphatidphosphorsäure im weißen Kaninchenmuskel bis zu 0,128%, im roten bis 0,173% der feuchten Muskulatur. Da also Sarcoplasma- und Lipoidgehalt parallel gehen, muß man

¹ *Noll, A. u. M. Becker:* Biochem. Z. **287**, 88 (1936). — ² *Ehrlich, P.:* Z. klin. Med. **6**, 33 (1883).

³ Den mikroskopischen Unterschied im Sarcoplasmagehalt beider Faserarten möchten *Weber* und *Meyer* [Biochem. Z. **266**, 127 (1933)] auf die verschiedene Verteilung der Muskeleiweißkörper zurückführen, da sie in den roten Muskeln mehr Stromaeiweiß („unlösliches Sarcoplasma“), in den weißen entsprechend mehr lösliches Myogen und Globulin X fanden. — Dagegen soll die Fibrillenmasse in beiden Faserarten nicht verschieden sein. Dies schloß *Schiefferdecker* (Muskeln und Muskelkerne. Leipzig 1909) aus seinen histologischen Messungen und *Weber* und *Meyer* (l. c.) nach ihren quantitativen Bestimmungen des Myosins. Dieses, das als das Fibrilleneiweiß zu betrachten ist, fanden sie in beiden Faserarten in gleicher Menge vorhanden.

⁴ l. c. S. 45.

⁵ *Embden, G. u. E. Adler:* Hoppe-Seylers Z. **113**, 201 (1921). — *Sorg, K.:* Hoppe-Seylers Z. **182**, 97 (1929). — *Bloor, W. R. u. R. H. Snider:* J. of biol. Chem. **107**, 459 (1934).

folgern, daß die Lipoide hauptsächlich dem Sarcoplasma, nicht den Fibrillen zukommen.

Die ausgeschiedenen Tropfen enthalten aber, wie oben gezeigt wurde, nicht nur die Lipoide, sondern auch das Glykogen. So liegt die Annahme am nächsten, daß auch das Glykogen in der Hauptsache im Sarcoplasma sitzt.

Bezüglich des Mengenverhältnisses des Glykogens im roten und weißen Muskel stimmen die histologischen Befunde mit den chemischen überein (s. oben).

Nicht vereinbar aber sind die histologischen Befunde mit der Annahme, daß in der lebenden Muskelfaser Glykogen-Myosinverbindungen quantitativ vorherrschen. Durch neuere Arbeiten sind solche Symplexe bekannt geworden¹. Diese müßten, da das Myosin als Bestandteil der Fibrillen zu betrachten ist, sich in den Fibrillen befinden. Das widerspräche den vorstehenden Beobachtungen, es sei denn, daß im Verlauf des geschilderten Entmischungsvorganges Fibrillenglykogen sich mit den Sarcoplasma-bestandteilen verbände.

Zusammenfassung.

Durch Einwirkung von 5% Kalilauge auf Zupfpräparate frischer Pferdemuskeln (Pectoralis) wird eine tropfige Entmischung des Faser-inhalts hervorgerufen. Nach den angestellten histochemischen Färbungen erweisen die ausgeschiedenen Tröpfchen sich als lipid- und glykogen-haltig. Es wird die Annahme begründet, daß die Tropfen dem Sarcoplasma entstammen und, da nach den bisherigen Feststellungen die Lipoide im wesentlichen im Sarcoplasma sitzen, gefolgert, daß auch das Glykogen in der Hauptsache dem Sarcoplasma angehört. Die Befunde stehen mit den Ergebnissen der quantitativen chemischen Bestimmungen in Einklang, nur ist die Lokalisation des Glykogens im Sarcoplasma nicht ohne weiteres vereinbar mit der Annahme, daß bedeutende Mengen von Glykogenmyosin in der Faser sind, da das Myosin nicht Bestandteil des Sarcoplasmas, sondern der Fibrillen ist.

¹ Przyłęcki, St. J. v. u. R. Majmin: Biochem Z. 273, 262 (1934). — Mystkowski, E. M.: Biochem. Z. 278, 240 (1935). — Mystkowsky, E. M., A. Stiller u. A. Zysman: Biochem. Z. 281, 231 (1935).