

Histologische und histochemische Untersuchungen über den Einfluß von Prednisolonacetat auf den normalen und denervierten Skelettmuskel der Maus*

F. MITTELBACH und D. PONGRATZ

II. Medizinische Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL)

Eingegangen am 28. Juli 1967

Histological and Histochemical Studies on the Influence of Prednisolone Acetate on the Normal and Denervated Murine Skeletal Muscle

Summary. Denervation atrophy in mice is not unfavorably affected by therapy with prednisolone acetate at a dosage of 0,24 mg/kg body weight daily. There is, however, a remarkable evidence for a type-II-fibre-atrophy in muscle.

Zusammenfassung. Bei einer Dosis von 0,24 mg/kg/die wird durch Prednisolonacetat bei der Maus die nach Denervierung auftretende Muskelatrophie nicht ungünstig beeinflusst. Auffallend ist der Befund einer Typ-II-Faser-Atrophie.

Seitdem sich die Corticosteroide ein breites Feld in der Therapie der verschiedensten Krankheiten erobert haben, erschienen bis heute schon mehrere Berichte über myopathische Affektionen bei länger dauernder Medikation.

Von besonderem Interesse erscheinen in diesem Zusammenhang Befunde von MÜLLER und KUGELBERG (1959), die auch beim Morbus Cushing analoge Muskelaaffektionen nachweisen konnten.

Tiexperimentelle Arbeiten zum aufgezeigten Problemkreis der *Cortison-myopathie* erbrachten bislang folgende Ergebnisse: Bei der Applikation von täglich bis zu 10 mg Cortisonacetat pro kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 7—25 Tagen fand ELLIS (1953, 1956) bei Kaninchen regelmäßig myopathische Veränderungen. Die von ELLIS angewandten Dosen übersteigen aber die in der Therapie in der Regel verwandten Mengen wesentlich. Deshalb erschien es angebracht, in einem Tierversuch die Verhältnisse mit erheblich geringeren Dosen von Glucocorticoiden, wie sie aber den Erfordernissen der Langzeitbehandlung vieler Krankheiten entsprechen, noch weiter zu überprüfen. Dabei wurde Prednisolon verwendet, da dieses Corticosteroid heute in der Therapie wohl die größte Rolle spielt. Da bei vielen Prozessen, die mit einer Denervierung einhergehen (Polyneuropathien), häufig die der neurologischen Störung zugrunde liegende Grundkrankheit eine Steroidtherapie erfordert, sollte weiterhin untersucht werden, wie sich bei experimenteller Denervation die Muskulatur unter Prednisolon verhält, besonders im Vergleich zur nicht denervierten Muskulatur. Das gewonnene Material wurde histologisch und histochemisch untersucht.

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Friedrich Baur-Stiftung, München, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Methodik

Als Versuchstiere wurden männliche Albinomäuse verwendet. Bei der Hälfte der Tiere wurde der Nervus ischiadicus des rechten Hinterbeines reseziert. Zur Vermeidung einer Reinnervation wurde ein Stück des Nervs von mindestens 0,5 cm entfernt. Daraufhin wurden die Mäuse in vier Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1 + 2: denervierte Mäuse,

Gruppe 3 + 4: nicht denervierte Mäuse.

Die Tiere der Gruppen 2 und 4 erhielten zweimal wöchentlich Prednisolonacetat (= 1-Dehydro-17-Hydroxy-Corticosteronacetat). Die verwendete Kristallsuspension wurde zu diesem Zwecke mit steriler physiologischer Kochsalzlösung 1:100 verdünnt, so daß nun 1 ml, der ursprünglich 10 mg Substanz beinhaltete, 0,1 mg Prednisolonacetat enthielt. Davon wurden jeweils 0,25 ml subcutan am Rücken injiziert, wo eine großflächige und gleichmäßige Verteilung gewährleistet war. Die endgültige Dosierung betrug also pro Woche und Tier 0,05 mg. Da die Mäuse ein Durchschnittsgewicht von 30 g aufwiesen, ergibt sich daraus eine Dosis von 0,24 mg/kg/die.

Die Versuchsdauer betrug 8 Wochen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere dekapiert. Daraufhin wurden folgende Muskeln zur histologischen, beziehungsweise histochemischen Aufarbeitung entnommen:

M. gastrocnemius des rechten Hinterbeines,

M. gastrocnemius des linken Hinterbeines,

M. rectus femoris ventralis des rechten Hinterbeines,

M. rectus femoris ventralis des linken Hinterbeines.

Bei der Entnahme wurde besonders darauf geachtet, daß das Gewebe nicht durch Druck oder Zug mechanisch beschädigt wurde.

Im Rahmen der weiteren *histologischen* Aufarbeitung wurden die Muskeln nach Formalin-Fixierung nach der Methode von v. HIRSCH und BOELLAARD (1958), modifiziert von ERBSLÖH und DIETEL (1959), in Methacrylat eingebettet und zu 5 μ dicken Schnitten verarbeitet. Als Routinefärbung diente die van Gieson-Färbung. Von jedem Muskel wurden an einem genau orthograd getroffenen Querschnitt in mehreren Präparaten mit Hilfe des Ocularmikrometers jeweils 100 Muskelfaserdurchmesser ausgezählt.

Ein Teil des Gewebegutes wurde zur *histochemischen* Aufarbeitung sofort nach der Entnahme in flüssiger Luft eingefroren und anschließend in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt. An den im Kryostaten angefertigten Schnitten von 10–20 μ Dicke wurden folgende enzymhistochemischen Untersuchungen durchgeführt:

1. *Succinatdehydrogenase-Nachweis* nach NACHLASS u. Mitarb. (1958) mit Tetra-Nitro-BT als Indicator bei einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C .

2. *Cytochromoxydase-Nachweis* nach BURSTONE (1959) mit Paraaminodiphenylamin als Substrat bei einer Inkubationszeit von 120 min bei Zimmertemperatur.

3. *Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase-Nachweis* nach PETTE mit Tetra-Nitro-BT als Indicator und einer Inkubationszeit von 10 min bei Zimmertemperatur.

4. *Phosphorylase-Nachweis* nach TAKEUCHI (1956) mit 60 min Inkubationszeit bei 37°C .

Ergebnisse

Bei der histologischen Untersuchung zeigte der denervierte Muskel 8 Wochen nach Durchtrennung des Nervs das typische Bild der neurogenen Atrophie mit deutlich erkennbarer Verschmälerung der Faserdurchmesser und Abrundung der Einzelfasern. Unter der oben beschriebenen Prednisolonapplikation finden sich weder am normalen, noch am denervierten Muskel deutliche Zeichen einer Cortisonmyopathie. Fasernekrosen fehlen völlig. Im Sinne einer schwachen myopathischen Reaktion ist eine größere Zahl aktivierter und mittelständiger Kerne aufzufassen. Die Auszählung der Faserdurchmesser mit Hilfe des Ocularmikrometers ergab das in der Tabelle dargestellte numerische Ergebnis. Danach zeigt

der normale und der mit Prednisolon behandelte Muskel bei intakter Innervation myometrisch praktisch die gleiche statistische Faserverteilung. Bei der in vorliegender Arbeit gewählten Dosierung, die bewußt weit unter der von ELLIS verwandten liegt, finden sich also keine myometrisch faßbaren Veränderungen. Bei der infolge Denervation bedingten Atrophie verschiebt sich das Spektrum der Faserverteilung stark zugunsten der dünneren Fasern. Unter Prednisolon ergibt sich am denervierten Muskel annähernd das gleiche Bild, das heißt, auch hier sind unter dem Einfluß des Prednisolon keine myometrischen Veränderungen ablesbar.

Tabelle. Zahlenmäßige Verteilung der Muskelfaserdurchmesser (bezogen auf jeweils 100 Fasern)

μ	Denervierter Muskel	Denervierter Muskel + Prednisolon-acetat	Normaler Muskel	Normaler Muskel + Prednisolon-acetat
12	2	—	—	—
16	—	3	—	—
20	7	15	—	—
24	35	28	3	3
28	29	20	5	4
32	17	16	15	12
36	8	6	16	19
40	2	8	40	38
44	—	3	12	11
48	—	1	7	9
52	—	—	2	2
56	—	—	—	1
60	—	—	—	1

Deutlicher veranschaulichen lassen sich die Ergebnisse in der graphischen Darstellung. Dabei wurden auf der Ordinate die Faserzahl und auf der Abszisse der Faserdurchmesser aufgetragen (Abb. 1).

Unter der in vorliegender Arbeit gewählten Applikation von Prednisolon erleidet also weder der normale, noch der denervierte Muskel eine nennenswerte Veränderung der Faserdurchmesser. Daraus ergibt sich, daß in der angewandten Dosierung der katabole Effekt des Prednisolon nicht wesentlich ins Gewicht fällt.

Als Ausgangspunkt für die Beschreibung der *enzymhistochemischen Veränderungen* unter Corticosteroidtherapie muß das Verhalten des normalen M. gastrocnemius der Maus dargestellt werden. Es handelt sich um einen sog. gemischten Muskel, der charakterisiert ist durch die Anwesenheit zweier histochemisch genau differenzierbarer Fasertypen. Die meist dünneren Fasern vom *Typ I* sind durch einen besonderen Reichtum an oxydativen Enzymen (zum Beispiel Succinatdehydrogenase) gekennzeichnet, während die cytoplasmatische Phosphorylase und die myofibrilläre ATPase nur eine schwache Reaktion zeigen. Die meist dickeren Fasern vom *Typ II* zeigen das reziproke Verhalten, nämlich eine schwache Reaktion der oxydativen und eine starke der glycolytischen Enzyme (DUBOWITZ und PEARSE, 1960).

Der denervierte Muskel zeichnet sich durch eine weitgehende Uniformität des Enzymmusters sowohl der intramitochondrialen, als auch der cytoplasmatischen Enzyme aus. Das histochemische Bild ist durch die Angleichung der Fasern vom Typ I und II gekennzeichnet (BAJUSZ, 1965). Dabei ist die Reaktionsintensität insbesondere der oxydativen Enzyme deutlich reduziert, (BECKETT und BOURNE, 1960; MITTELBACH, 1966), die Phosphorylase dagegen erscheint in ihrem augenfälligen Reaktionsbild gegenüber dem normalen Muskel eher verstärkt.

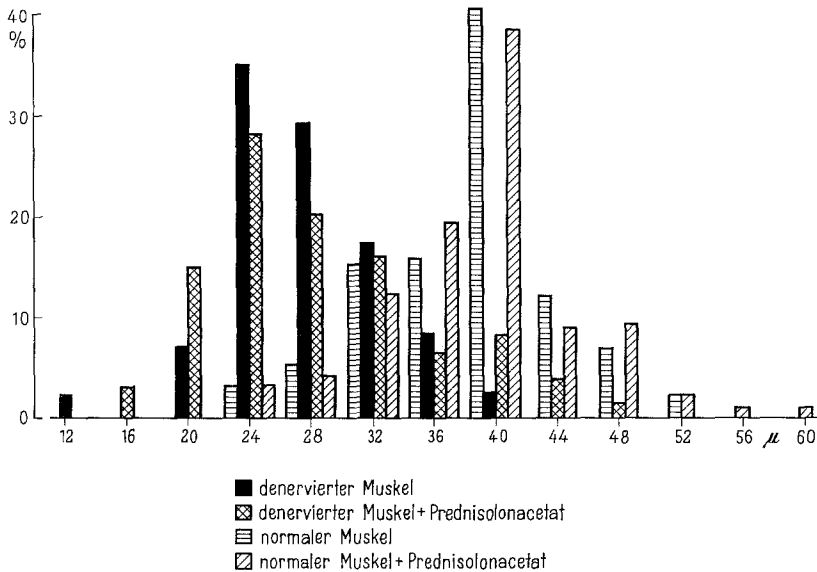


Abb. 1. Graphische Darstellung der Verteilung der Muskelfaserdurchmesser des normalen und denervierten Skelettmuskels der Maus unter Prednisolonacetat

Die scheinbare Diskrepanz zwischen diesem Befund und der Tatsache, daß die Phosphorylase am atrophischen Muskel bei biochemischer Untersuchung an Muskelextrakten vermindert ist (VALLYATHAN, CHERIAN, GEORGE, 1964), beruht darauf, daß die starke histochemische Reaktion durch das Kleinerwerden der Fasern vorgetäuscht wird. Es nimmt nämlich während der sich entwickelnden Denervationsatrophie der Wassergehalt des Muskels stärker ab, als der Proteingehalt, so daß die Einzelfaser „enzymreicher“ erscheint, die Enzyme des Gesamtmuskels aber insgesamt erniedrigt sind.

Unter der Applikation von Prednisolonacetat fällt am normalen Muskel bei der *Succinatdehydrogenase-Reaktion* (Abb. 2) eine erhöhte Aktivität bei sicher gesteigertem Kontrast der beiden Fasertypen auf. Am denervierten Muskel zeigt die SDH eine stark verminderte Reaktion mit uniformem Bild. Demgegenüber findet sich am denervierten Muskel unter Prednisolonacetat ein deutliches Wiederanstiegen der Faserdifferenzierung. Analoge Befunde zeigen die Cytochromoxydase und die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase.

Die *Phosphorylase-Reaktion* (Abb. 3) ergibt am normalen Muskel unter Prednisolon eine deutliche histochemische Reaktionsverstärkung einzelner Fasern

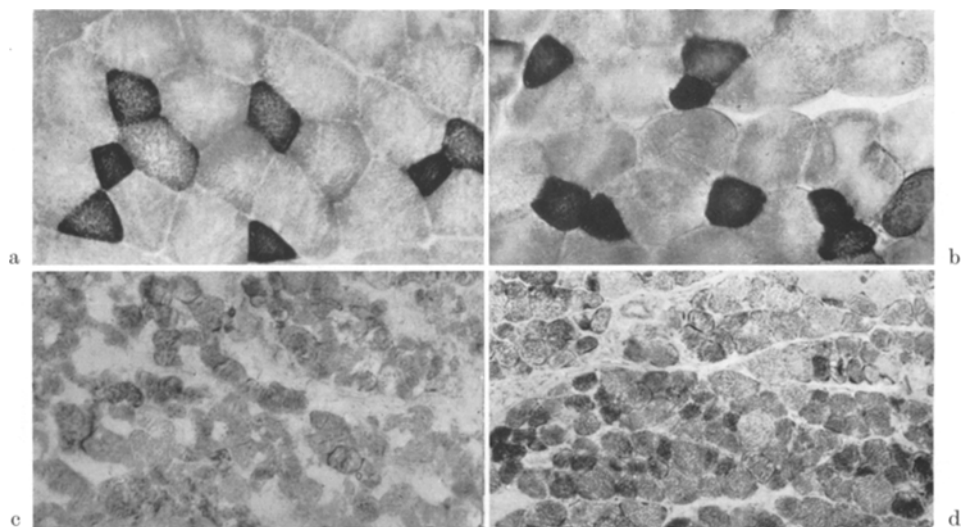


Abb. 2a—d. Succinatdehydrogenase-Nachweis, Vergr. 100 \times . a Normaler Muskel mit dem typischen schachbrettartigen enzymhistochemischen Muster; b normaler Muskel unter Prednisolonacetat mit leichter Aktivitätssteigerung und besonders deutlicher Faserdifferenzierung; c denervierter Muskel mit verminderter Aktivität und weitgehend uniformen Reaktionsmuster; d denervierter Muskel unter Prednisolonacetat mit wieder deutlich werdender Faserdifferenzierung

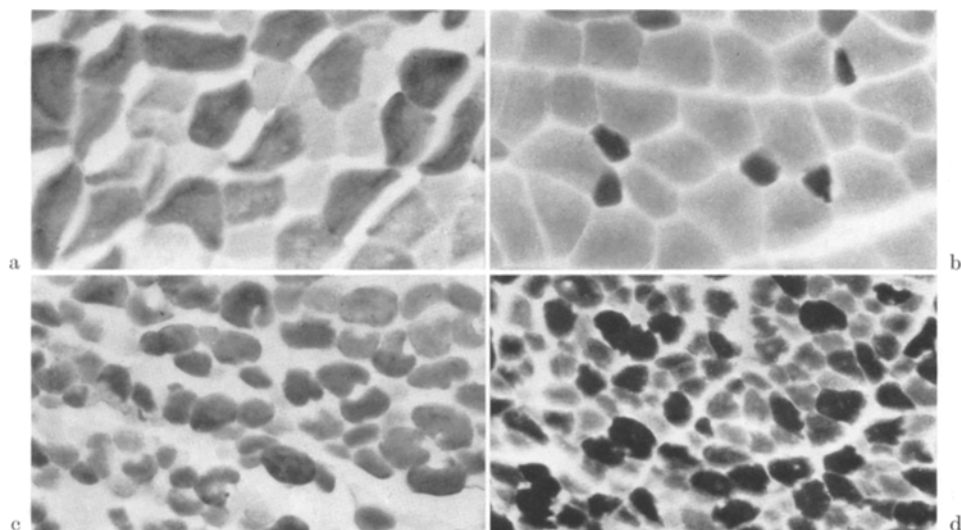


Abb. 3a—d. Phosphorylase-Nachweis, Vergr. 100 \times . a Normaler Muskel mit dem typischen Schachbrettmuster und dem reziproken Verhalten gegenüber den oxydativen Enzymen; b normaler Muskel unter Prednisolonacetat: Atrophie der Fasern vom Typ II; c denervierter Muskel mit fast aufgehobenem Schachbrettmuster, d. h. uniformer Aktivität; d denervierter Muskel unter Prednisolonacetat: wieder deutliche Differenzierung in die beiden Fasertypen

und dadurch eine besonders ausgeprägte Faserdifferenzierung. Auffallend ist dabei ein Enzymmuster, das vom üblichen Differenzierungsbild der Phosphorylase bei

einigen Tieren erheblich abweicht. Während am normalen Muskel vor allem die dickeren Fasern vom Typ II in der histochemischen Darstellung dieses Enzyms eine stärkere Anfärbung erkennen lassen, findet sich unter dem Einfluß von Prednisolon eine stärkere Reaktion der dünneren Fasern. Dies würde bedeuten, daß es unter der Gabe von Prednisolon isoliert zu einer Atrophie der Fasern vom Typ II kommen kann. Dieser aufgezeigte Befund läßt sich auf Grund der alleinigen histochemischen Untersuchungen noch nicht einordnen; weitere Untersuchungen sind im Gange.

Der denervierte Muskel zeigt unter Prednisolon im Vergleich zum nicht behandelten denervierten Muskel ebenfalls eine gesteigerte Reaktionsintensität bei angedeutetem Schachbrettmuster.

Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, verursacht Prednisolonacetat in der gewählten Dosierung von 0,24 mg/kg/die bei den Versuchstieren in keinem Falle das klassische Bild der Cortisonmyopathie. Der ausgeprägte *Katabolismus* der Corticosteroide vermag in vorliegender Versuchsanordnung noch keine Auswirkungen zu erzielen. Es erscheint verständlich, wenn die Muskulatur, die als der sog. Haupt-Eiweiß-„Speicher“ des menschlichen Körpers anzusprechen ist, im Rahmen einer katabolen Stoffwechsellage empfindlich geschädigt würde. Diese katabole Wirkung der Corticosteroide auf den Eiweiß-Stoffwechsel (WOOL und WEINSHELBAUM, 1959) bleibt aber offenbar bei der gewählten Dosierung noch ohne wesentliche Folgen. Ja selbst bei der Denervationsatrophie wird der Katabolismus nicht wesentlich verstärkt. Eine Begründung für dieses Verhalten ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß der Stoffwechsel des denervierten und somit nur mehr wenig funktionstüchtigen Muskels wesentlich verringert ist und deshalb der katabole Einfluß des Prednisolon sich nicht mehr auswirkt.

Die Steigerung der *oxydativen Enzyme* könnte man als Ausdruck für die cortisoninduzierte Stoffwechsellage ansehen, ohne daß unter den gewählten Versuchsbedingungen eine manifeste Substanzverminderung des Muskels statthat. Das erhaltene, beziehungsweise verstärkte Schachbrettmuster am nicht denervierten Muskel läßt schwerwiegende Funktionsstörungen des Muskels von vorne herein ausschließen und das eher regressiv beeinflusste histologische Bild des denervierten Muskels läßt keine Verschlechterung unter der Glucocorticoidtherapie erkennen.

Der auffallendste Befund der histochemischen Untersuchungen ist die *isolierte Atrophie der Fasern vom Typ II* unter der Steroidapplikation, so daß in diesen Fasern eine erhöhte Phosphorylase-Aktivität vorgetäuscht wird. Kürzlich beschrieben ENGEL und BROOKE (1966) bei der myotonischen Dystrophie, die ja mit sehr vielen Störungen von seiten des Endocrinium und des Stoffwechsels einhergehen kann, eine vorherrschende Typ-I-Faser-Atrophie. Es scheint also, daß möglicherweise bei Stoffwechselstörungen, bei denen der Muskel in seiner Gesamtheit nicht einer signifikanten Atrophie anheimfällt, jeweils nur einzelne Fasern von dem Prozeß betroffen werden. Im Gegensatz zu den Befunden von ENGEL und BROOKE ließ sich in unserem Falle das Vorliegen einer Typ-II-Faser-Atrophie wahrscheinlich machen. Über die Deutung dieses Befundes bei der eigentlichen Cortisonmyopathie, bei der ja auch mit konventionellen histologischen Methoden

Veränderungen gefunden werden, sind noch Untersuchungen im Gange. Offensichtlich sind die Fasern, die mit dem Glykogenstoffwechsel in Beziehung stehen, besonders betroffen.

Ein weiterer pathogenetischer Faktor für die Auslösung myopathischer Prozesse ist die Fähigkeit der Corticosteroide, die *Kaliumausscheidung* zu fördern. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhange, daß im Falle eines experimentellen Kaliummangels ähnliche myopathische Prozesse manifest werden, wie bei der Cortisonmyopathie (HORE, HERNDON, 1955). Allerdings gestattet die Elektromyographie, beide Prozesse voneinander zu differenzieren.

In vorliegender Arbeit war das Augenmerk insbesondere darauf gerichtet, ob am denervierten Muskel, bei dem besonders in den Anfangsstadien der Atrophie ein deutlicher Kaliumverlust zu beobachten ist (GUTMANN, 1962), durch die gleichzeitige Prednisolontherapie in einer Dosierung, die erfahrungsgemäß nicht instande ist, eine Myopathie hervorzurufen, eine Potenzierung bezüglich der Kaliumverarmung statthat. Es konnten aber nirgends morphologische Befunde des Kaliummangels, etwa eine vacuoläre Degeneration, beobachtet werden, so daß zumindest unter vorliegenden Versuchsbedingungen ein gefährlicher Kaliumverlust auf Grund des normalen histologischen Befundes nicht wahrscheinlich gemacht werden kann.

Wie die Untersuchungen insgesamt zeigen, ist bei einer *Langzeittherapie* mit Glucocorticoiden in der Größenordnung von etwa 15 mg Prednisolon pro Tag mit keinen wesentlichen myopathischen Komplikationen zu rechnen. Es treten weder wesentliche atrophische, noch nekrotische Veränderungen auf. Das ganze Problem der Cortisonmyopathie erweist sich damit als sehr stark dosisabhängig. Daraus ergibt sich, daß man mit den stärker wirksamen fluorhaltigen Steroiden, wie die Literatur zeigt, schon mit geringeren Mengen myopathische Veränderungen erzielt. Es darf also somit extrapoliert werden, daß bei Langzeitbehandlung mit Prednisolon in der Größenordnung von etwa 15 mg/die, sowie bei den anderen Glucocorticoiden in wirkungsentsprechenden Dosen mit dem Auftreten einer sog. Cortisonmyopathie auch dann nicht zu rechnen ist, wenn es sich um einen Denervationsprozeß handelt.

Literatur

- BAJUSZ, E.: Comparative enzyme histochemistry of myopathies: Similarities and differences between dystrophic and denervated muscle. In: *Muscle* (ed. PAUL, DANIEL, KAY, and MONCKTON). Oxford: Pergamon Press 1965.
- Succinic dehydrogenase in muscular dystrophy. An experimental study on secondary changes resulting from disturbances in neuromuscular integrity. *Exp. Med. Surg.* **23**, 169 (1965).
- Experimental myopathies: influence of various factors as reflected by histochemical and morphologic studies. In: *Myopathien* (ed. BECKMANN). Stuttgart: Georg Thieme 1965.
- BECKETT, E. B., and G. H. BOURNE: Histochemistry of skeletal muscle and changes in some muscle diseases. In: *The structure and function of muscle* (ed. BOURNE), vol. III. New York and London: Academic Press 1960.
- BURSTONE, M.: New histochemical technics for the demonstration of tissue oxydases. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112 (1959).
- DUBOWITZ, V., and A. G. E. PEARSE: Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature (London)* **185**, 701 (1960).
- — A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Z. Zellforsch. Abt. Histochem.* **2**, 105 (1960).

- ELLIS, J. T.: Studies on the nature and pathogenesis of muscular degeneration in cortisone treated rabbits. *Bull. N.Y. Acad. Med.* **29**, 814 (1953).
- Necrosis and regeneration of skeletal muscle in cortisone treated rabbits. *Amer. J. Path.* **32**, 993 (1956).
- ENGEL, W. K., and H. M. BROOKE: Histochemistry of the myotonic disorders. In: *Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie*. Symp., Hrsg. KUHN. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- ERBSLÖH, F., u. W. DIETEL: Die Bedeutung der Muskelbiopsie bei den sog. Kollagenosen. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **65**, 371 (1959).
- GUTMAN, E.: The denervated muscle. *Prag: Publ. House of Czechoslovak Acad. of Science* 1962.
- HIRSCH, TH. V., u. J. W. BOELLAARD: Methacrylsäureester als Einbettungsmittel in der Histologie. *Z. wiss. Mikr.* **64**, 1 (1959).
- HORE, E. L., and J. F. HERNDON: Potassium deficiency in the rabbit as a cause of muscular dystrophy. *J. Nutr.* **55**, 363 (1955).
- MITTELBACH, F.: Die Begleitmyopathie bei neurogenen Atrophien. In: *Monographie der Neurologischen Psychiatrie*, Bd. 113. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- MÜLLER, R., and E. KUGELBERG: Myopathy in cushing disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **22**, 314 (1959).
- NACHLASS, M. M., D. G. WALKER, and A. M. SELIGMAN: Histochemical method for the demonstration of DPN-diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 29, 169 (1958).
- PETTE, D.: Persönliche Mitteilung.
- TAKEUCHI, T.: Histochemical demonstration of phosphorylase. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 84 (1956).
- VALLYATHAN, N. W., K. M. CHERIAN, and J. C. GEORGE: Histochemical and quantitative changes in glycogen and phosphorylase during disuse atrophy of the pigeon pectoralis. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 721 (1964).
- WOOL, I. G., and E. I. WEINSHLBAUM: Incorporation of C¹⁴-amino acids into protein of isolated diaphragms: role of the adrenal steroids. *Amer. J. Physiol.* **197**, 1089 (1959).

Priv.-Doz. Dr. F. MITTELBACH
II. Med. Klinik der Universität München
8000 München 15, Ziemssenstr. 1