

Zur Ultrastruktur der Muskelfaser bei der experimentellen „Myotonie“ mit 20,25-Diazacholesterin

J. M. SCHRÖDER

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Neuropathologische Abteilung, Frankfurt a. M.
und Neurologisches Institut (Edinger-Institut) der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. W. KRÜCKE)

E. KUHN

Medizinische Universitäts-Poliklinik der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. H. PLÜGGE)

Eingegangen am 20. Januar 1968

The Ultrastructure of Muscle Fibers in Experimental “Myotonia” induced by 20,25-Diazacholesterol

Summary. Rats with electromyographic symptoms of “myotonia” and biochemical alterations (i.e. reduced hexokinase activity and alterations in the fatty acid components of phospholipids in skeletal muscles) after prolonged application of 20,25-diazacholesterol failed to show any generalized structural abnormalities in muscle fibers of the thigh. No light or electron microscopic changes responsible for the functional disturbance of myotonia were identified in our experimental animals. Occasionally hyaline degeneration, phagocytosis and vacuolar degeneration of single muscle fibers could be observed which presumably were caused by a non-specific, toxic effect of 20,25-diazacholesterol, or triparanol respectively. New ultrastructural abnormalities, not seen before, could be demonstrated in vacuolated muscle fibers.

Zusammenfassung. Nach Applikation von 20,25-Diazacholesterin traten bei Ratten im Verlauf von mehreren Wochen elektromyographische Symptome der „Myotonie“ und biochemisch nachweisbare Störungen des Stoffwechsels auf. Letztere bestanden in einer Reduktion der Aktivität der Hexokinase und in Veränderungen des Fettsäurengehaltes der Phosphatide der Skelettmuskulatur. Licht- und elektronenmikroskopisch waren keine Strukturveränderungen feststellbar, die alle Muskelfasern gemeinsam betrafen. Ein morphologisches Substrat der Myotonie konnte also entsprechend den negativen Befunden bei menschlichem Biopsiematerial von Myotonie-Patienten nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Wohl aber fanden sich, wenn auch spärlich, vermutlich unspezifisch-toxische Faserveränderungen wie vacuolare und hyaline Degenerationen von Muskelfasern. Neue elektronenmikroskopische Befunde konnten vor allem bei der vacuoligen Fasererkrankung erhoben werden.

Die Myotonie kann man als eine verzögerte Erschlaffung der Muskulatur mit repetitiven Spontanentladungen nach der Stimulierung definieren. Die meisten heute bekannten Befunde zum Phänomen der Myotonie lassen einen primären Defekt an den mit der De- und Repolarisation unmittelbar in Zusammenhang stehenden Membransystem der Muskelfaser vermuten, d.h. am Sarkolemm, am T-System und am sarkoplasmatischen Reticulum, insbesondere im Bereich der spezifischen Kontakte zwischen den beiden Systemen: an den Triaden. Es ist nicht geklärt, ob den genetisch bedingten und den metabolisch induzierten,

symptomatischen Myotonien ein gemeinsames Substrat bzw. eine gemeinsame pathogenetische Endstrecke zugrunde liegt. Möglicherweise führen unterschiedliche Noxen über verschiedene Mechanismen zu myotonischen oder myotonieähnlichen Symptomen.

WINER et al. (1965) berichteten über Myotonie nach 20,25-Diazacholesterin beim Menschen und bei Ziegen. Die Substanz führt zu einem Abfall des Cholesterins und zu einem Anstieg des Desmosterols im Serum, im Muskel und im Erythrocytenstroma. Da das Cholesterin neben anderen Substanzen am Aufbau des Sarkolemmms beteiligt ist (ABOOD et al., 1966), und da die primäre Funktionsstörung bei der Myotonie gerade in den Membransystemen des Muskels einschließlich dem Sarkolemm zu suchen sein dürfte, haben wir versucht, den Effekt von 20,25-Diazacholesterin morphologisch und, wie an anderer Stelle ausführlicher mitgeteilt wird, biochemisch (KUHN et al., 1968) näher zu analysieren. Letztere fanden im Rattenmuskel nach 20,25-Diazacholesterin 1. eine Reduktion der Aktivität der Hexokinase, 2. bei der Fettsäurenanalyse der Phosphatide eine Abnahme der Myristinsäure (C 14:0), Palmitinsäure (C 16:0) und der Palmitoleinsäure (C 16:1) und 3. eine Zunahme der Polyenfettsäuren C 18:2, C 20:4, C 22:6, der Plasmalogene sowie der von ihnen abstammenden Dimethylester. Diese Veränderungen waren an die Verabreichung von 20,25-Diazacholesterin gebunden und traten nach alleiniger Gabe von Triparanol, einer Substanz, die ebenfalls zur Senkung des Cholesterinspiegels im Serum, aber nicht zur „Myotonie“ führt (WINER et al., 1965; KUHN, 1966), nicht auf.

Im folgenden werden die morphologischen Befunde an der Rattenmuskulatur nach 20,25-Diazacholesterin sowie nach der Kombination von 20,25-Diazacholesterin mit Triparanol dargestellt und eine Korrelation der Ergebnisse mit den biochemischen Befunden diskutiert.

Material und Methode¹

Bei weißen Ratten vom Wistar-Stamm wurde der Einfluß von 20,25-Diazacholesterin allein (1. Gruppe) und von 20,25-Diazacholesterin in Kombination mit Triparanol (2. Gruppe) untersucht. Den Tieren der 1. Gruppe wurde über einen Zeitraum von 2—5 Monaten peroral durch eine Magensonde wöchentlich 6×28 mg/kg Körpergewicht 20,25-Diazacholesterin, den Tieren der 2. Gruppe wöchentlich 6×14 mg/kg Körpergewicht 20,25-Diazacholesterin zusammen mit 20 mg Triparanol pro kg Körpergewicht appliziert. Von der 1. Gruppe wurden 4, von der 2. Gruppe 5 Ratten phasenkontrast- und elektronenmikroskopisch untersucht. Zur Kontrolle dienten 4 Tiere vom gleichen Wurf wie die Experimentaltiere und 6 weitere Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm.

Bei allen Tieren wurden in Äther-Narkose 2 cm lange, etwa 3 mm dicke Bündel von Muskelfasern aus der Adduktoren- oder Abdunktorengruppe des rechten Oberschenkels in physiologischer Position nach der Methode von ENGEL, an einen Holzstift gebunden, excidiert und in 6%igem Glutaraldehyd mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (SÖRENSEN) vorfixiert. Nach 1 Std wurden die Muskelfaserbündel in 2% OsO₄ mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (SÖRENSEN) für weitere 3½ Std nachfixiert. Nach der Dehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Gewebsstücke in Epon eingebettet und mit dem Ultramikrotom MT 1 oder MT 2 (SORVALL-PORTER-BLUM) geschnitten. Zuerst wurden von jedem Block 2 µ dicke Schnitte angefertigt, von denen jeweils drei mit Toluidin-Blau, drei mit Paraphenyldiamin (ESTABLE-PUR) gefärbt wurden und drei ungefärbt blieben. Anschließend wurden von ausgewählten Blocks Dünnschnitte mit einem LKB-Ulrotom geschnitten, mit Bleicitrat kontrastiert (VENABLE und COGGESHALL) und mit einem Siemens-Elmiskop I photographiert.

¹ Wir danken Herrn BURGER für seine Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Fräulein I. ECKSTEIN für ihre Hilfe bei der Präparation und Photographie.

Ergebnisse

Licht- und phasenkontrastmikroskopische Befunde

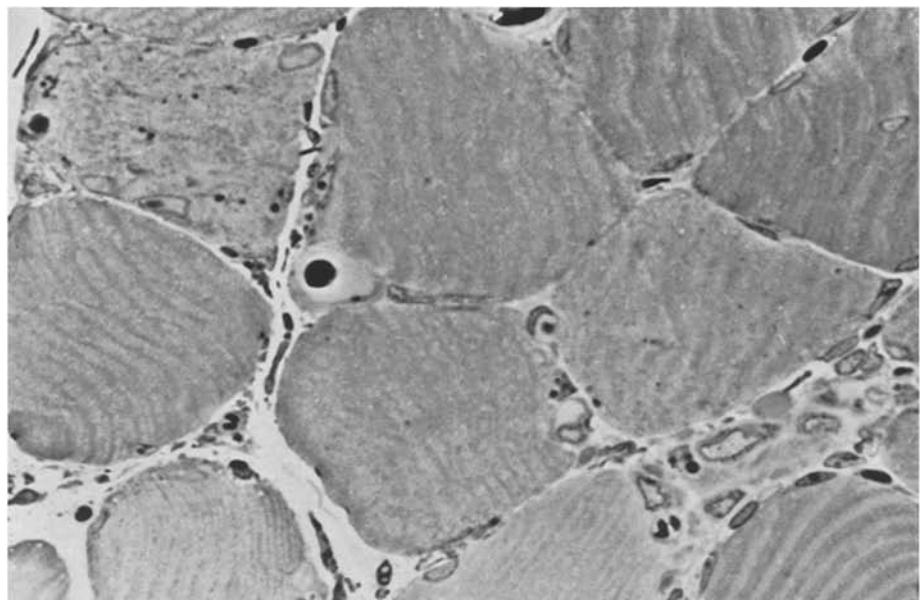
Kontrolltiere. Beträchtliche Kaliberschwankungen einzelner Muskelfasern auf dem Querschnitt, Zenkersche Degenerationen und Phagocytosevorgänge haben wir bei der Ratte ganz vereinzelt auch in normalen Muskeln gefunden. Auch Aufsplitterungen von Muskelfasern kommen gelegentlich vor. Vacuolisierungen konnten wir in normalen Muskeln nicht nachweisen.

Tiere mit elektromyographisch nachgewiesener „Myotonie“. Pathologische Faserveränderungen bei den erkrankten Tieren sind spärlich (Abb. 1). Ihre Häufung in bestimmten Arealen ist jedoch so auffällig beim Vergleich mit den Kontrolltieren, daß sie als Folgeerscheinung der Gabe von 20,25-Diazacholesterin oder der Kombination von 20,25-Diazacholesterin mit Triparanol angesehen werden müssen. Die Unterschiede zwischen den mit 20,25-Diazacholesterin allein und den mit 20,25-Diazacholesterin und Triparanol behandelten Tieren sind allerdings bei der gewählten Dosierung so gering, daß wir daraus keine sicheren Schlüsse ziehen können. Die Differenzen liegen noch im Rahmen der vermutlich individuell bedingten Streubreite. Am häufigsten ließen sich verschiedene Stadien der Phagocytosevorgänge nachweisen entsprechend der langen Zeit der Verabreichung. Akute Stadien der Degeneration kamen weniger häufig vor. Auffällig sind dabei im p-Phenyldiaminpräparat besonders deutlich hervortretende dichte „Körner“ (Lipidtropfen oder Lipofuscin ?) und der Verlust der Myofibrillen- und Sarkomer-muster auf dem Quer- und Längsschnitt. Neben der hyalinen Degeneration sahen wir wiederholt, wenn auch selten, eine vacuolige Degeneration einzelner Fasern. Manche Fasern scheinen fast nur noch aus Vacuolen zu bestehen, während das restliche Sarkoplasma lediglich schmale Substanzbrücken zwischen den Vacuolen bildet. Gelegentlich finden sich zellige Elemente im Innern der Vacuolen. Auf Schnittserien ist zu erkennen, daß die Vacuolen zumindest teilweise miteinander in Verbindung stehen (Abb. 2). An manchen Stellen läßt sich nachweisen, wie die Zellen in die vacuolierte Faser hinein (oder aus der erkrankten Faser hinaus) wandern. Das Sarkoplasma der vacuolierten Fasern erscheint in fortgeschrittenen Fällen verdichtet. Spezifische Faserveränderungen, die nicht auch bei anderen Muskelerkrankungen vorkommen, ließen sich phasenkontrastmikroskopisch nicht nachweisen.

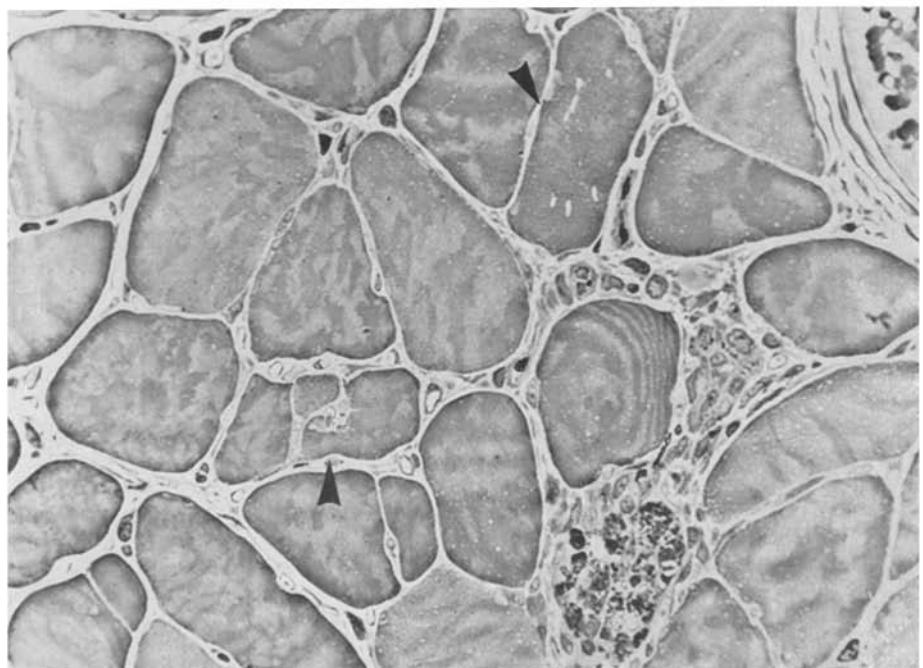
Elektronenmikroskopische Befunde

Die meisten Muskelfasern zeigen eine normale Struktur der Myofibrillen, der Mitochondrien, der Lipidtropfen, der Glykogengranula, der Kerne, des Sarkolemm, des transversalen tubulären (T-)Systems und des sarkoplasmatischen Reticulums (Abb. 3a). Pentaden (REVEL, 1962) wurden gelegentlich beobachtet, doch kommen sie auch in normalen Muskelfasern vor.

Sehr variabel ist das Bild degenerierender Muskelfasern je nachdem, in welchem Stadium und in welcher Schnittebene man die Muskelfaser untersucht. Auch scheinen verschiedene Formen der Degeneration vorzukommen, deren Abgrenzung nicht immer leicht ist. Einerseits gibt es *schwere Faserveränderungen*, die am ehesten dem lichtmikroskopischen Bild der hyalinen oder wachsartigen (Zenkerschen) Degeneration entsprechen. Nach MILHORAT et al. ist die Auflösung der Muskelmembran ihr wichtigstes Kennzeichen. Wir haben diesen Befund bereits



a



b

Abb. 1. a Eine stark geschädigte (links) und eine bereits phagocytierte Muskelfaser (rechts) liegen im gleichen Ausschnitt. Die übrigen Fasern sind, von einem zentralständigen Kern im Bild oben rechts abgesehen, normal. $770 \times$. b Im Bild unten zwei phagocytierte Muskelfasern. Die Pfeile markieren weniger stark geschädigte Fasern. Die übrigen Fasern zeigen keinen sicher pathologischen Befund. $500 \times^2$

² Die Abb. 1a, 3, 4a, 5a und c stammen von Tieren, die ausschließlich 20,25-Diazacholesterin über 5 Monate, die Abb. 1b, 2, 4b, 5b und d, 6 und 7 von Tieren, die eine Kombination von 20,25-Diazacholesterin mit Triparanol über 3 Monate erhalten hatten. Die Abb. 1 und 2 sind Phasenkontrastaufnahmen von 2μ dicken, in Epon eingebetteten Schnitten, die Abb. 3—7 elektronenmikroskopische Aufnahmen.

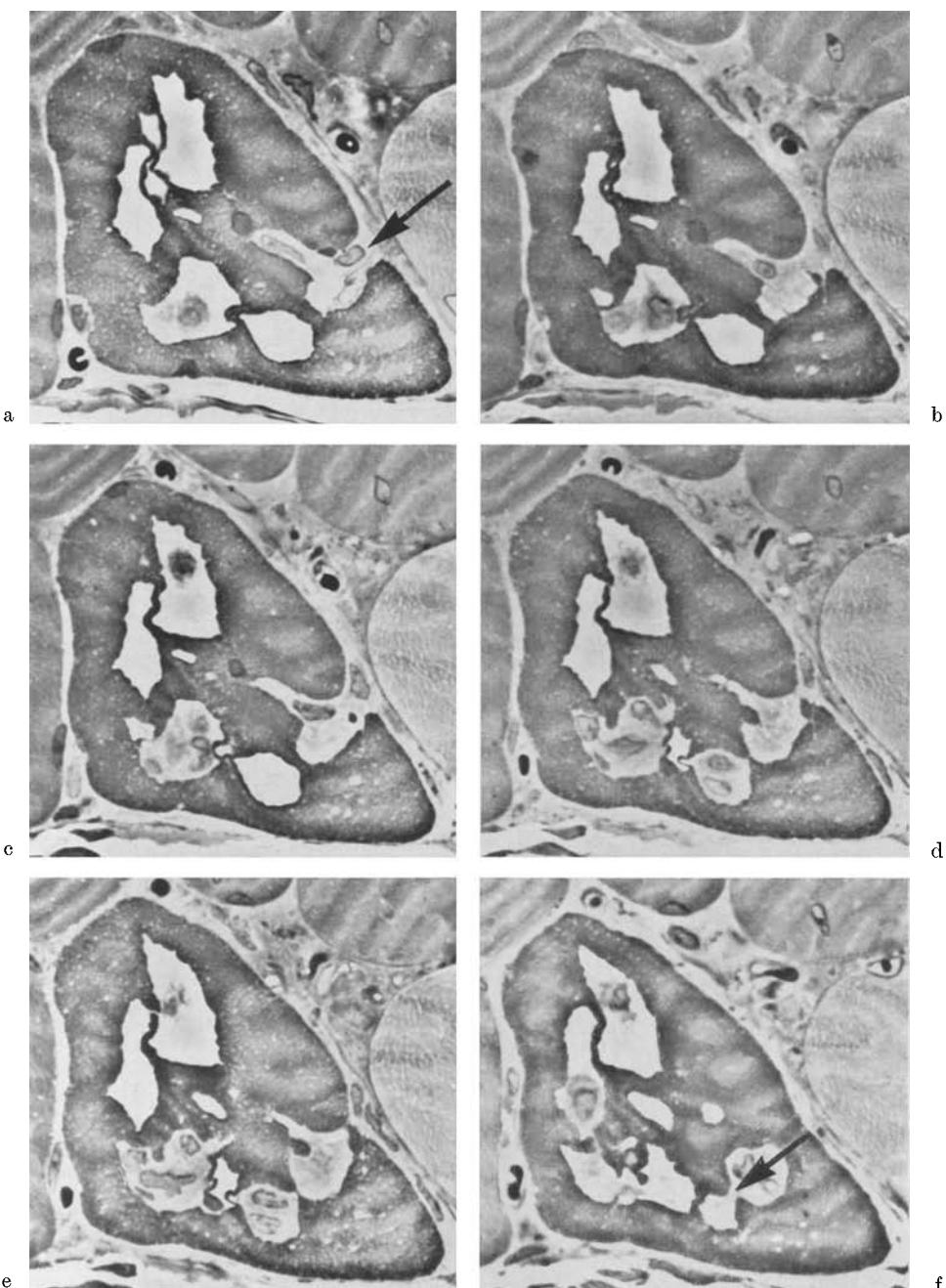


Abb. 2a—f. Eine vacuolierte Faser ist in sechs verschiedenen Schnittebenen dargestellt. Histiocyten liegen im Innern einzelner Vacuolen, wobei sie an einer Stelle in a (Pfeil) aus dem Endomysium in eine derartige Vacuole hinein (bzw. aus ihr heraus) zu treten scheinen. In d und e ist diese Vacuole fast geschlossen. In f scheint sie vollständig von dem extracellulären Raum des Endomysiums abgegrenzt zu sein. Sie kommuniziert hier mit einer vorher getrennt gelegenen Vacuole (Pfeil). Das Sarkoplasma der vacuolisierten Faser erscheint dichter als das der benachbarten Muskelfasern. Die Faser im Bildwinkel rechts oben zeigt zentralwärts verlagerte Kerne. 800 ×

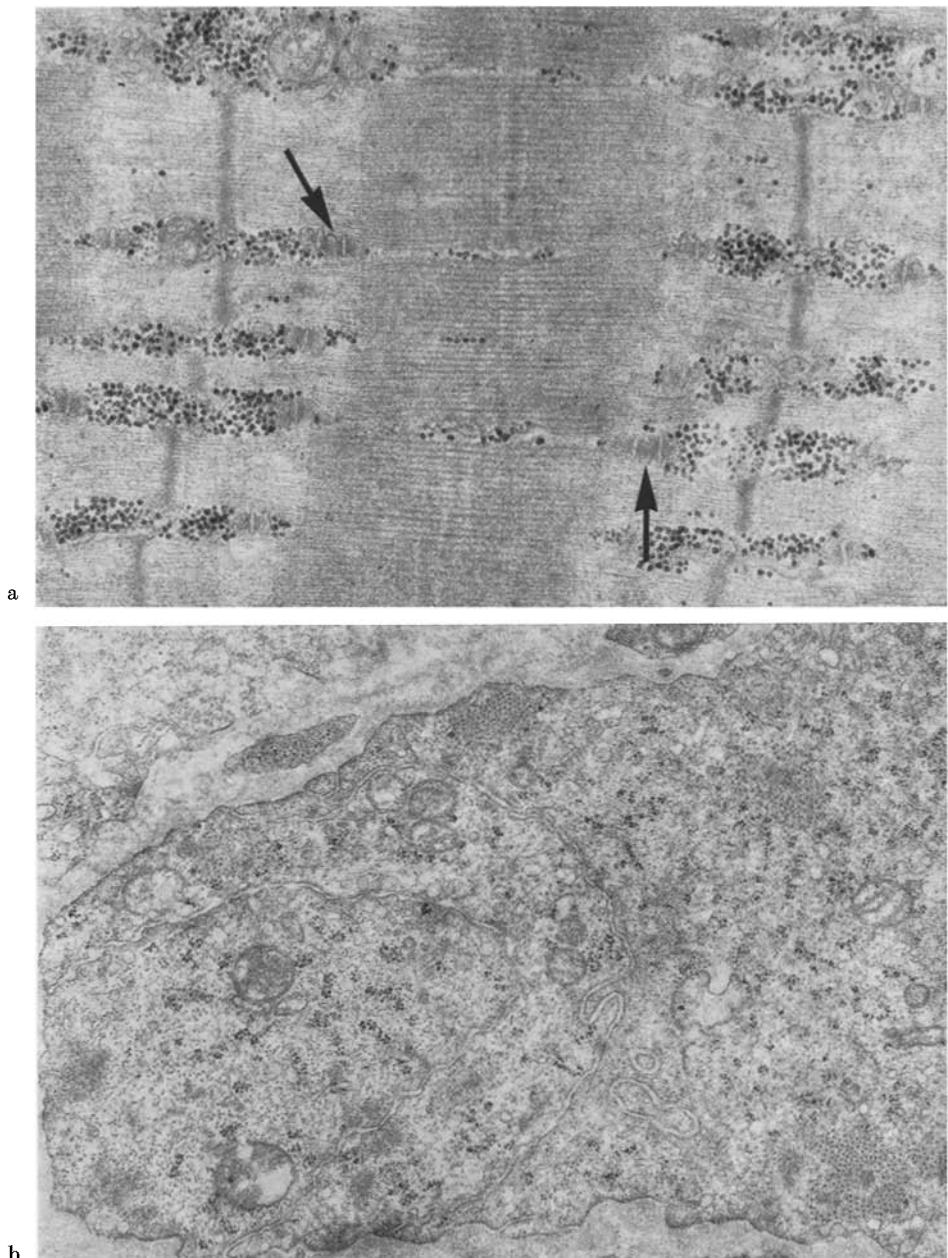


Abb. 3. a Längsschnitt einer „normalen“ Muskelfaser bei einem Tier mit myotonischen Symptomen. Die Anordnung und Struktur der Triaden und Pentaden (Pfeile) ist auch noch bei stärkerer Vergrößerung unauffällig. Glykogengranula liegen in normaler Menge meist zwischen den Myofibrillen. Ein Mitochondrion ist im Bild oben links gut zu erkennen. $30000 \times$
 b Querschnitt durch Myoblastenfortsätze mit reichlich entwickeltem Ribosomen-besetzten, granulären endoplasmatischen Reticulum. An verschiedenen Stellen sind Gruppen von quer-geschnittenen dicken oder dünnen Myofilamenten zu erkennen. Die einzelnen Myoblastenfortsätze werden voneinander durch einen etwa 200 \AA breiten Spalt getrennt, in dem keine Basalmembran ausgebildet ist. Letztere umhüllt jedoch die gesamte Gruppe an der Außenseite. $15000 \times$

an anderem Orte abgebildet (KUHN, 1968). Im Inneren der z.T. phagocytierten Fasern finden sich in fortgeschrittenen Stadien verschiedenartige abnorme Zellbestandteile, die oft nicht zu identifizieren sind oder deren Herkunft nicht mit Sicherheit festzustellen ist (Abb. 4). Tubuläre, verzweigte und bläschenförmige Membrankomplexe mit oder ohne amorph erscheinenden Inhalt findet man neben unterschiedlich großen, teilweise vacuolierten dichten Körperchen. Die Mitochondrien zeigen oft ein normales Aussehen. Auch die freien oder an das endoplasmatische Reticulum gebundenen Ribosomen erscheinen unauffällig. Daneben kommen ausschließlich mit einer homogenen unstrukturierten Substanz angefüllte Areale vor. In der unmittelbaren Nachbarschaft derartiger Fasern finden sich meistens reichlich Histiocyten.

Von den nekrotisierenden Faserveränderungen zu unterscheiden sind die *vacuoligen Muskelfasererkrankungen*. Dabei ist die Faser weniger schwer verändert als bei der hyalinen Degeneration. Dennoch ist die Faser insgesamt betroffen. Das Cytoplasma erscheint oft dichter als in den angrenzenden normalen Fasern (Abb. 5 b). Der Abstand zwischen den Myofilamenten beträgt oft nur 310—320 Å, nicht mehr 350—600 Å wie in normalen Muskeln (BRANDT et al., 1967). Das Sarkolemm ist gefältelt (Abb. 5a) und an vielen Stellen finden sich markscheidenähnliche Membrankomplexe oft in Zusammenhang mit Glykogenanhäufungen (Abb. 5d). Das Hauptcharakteristicum dieser Fasererkrankung sind die meist dickwandigen Vacuolen, die keinen Inhalt erkennen lassen. Gelegentlich findet man im Inneren bläschenförmige Gebilde, deren Verbindung mit der Wand der Vacuolen in günstigen Schnittebenen zuweilen nachweisbar ist (Abb. 5d). Nicht immer ist die Wand so auffällig dick und elektronendicht wie in Abb. 5d und 6. Manchmal ist sie so dünn wie die des normalen Sarkolemm oder des T-Systems. In einer Schnittebene konnten wir die Insertionsstelle einer fehlorientierten Myofibrille an der in diesem Bereich verdickten Vacuolenmembran wahrscheinlich machen (Abb. 5c). Und wiederholt waren Histiocyten in den Vacuolen zu finden (Abb. 6).

Bei verschiedenen Tieren fanden wir in umschriebenen Bezirken unter dem Sarkolemm Anhäufungen von Glykogen-ähnlichen Granula oder amorphen Zellbestandteilen (Abb. 7). Myofibrillen fehlten in diesen meist segmentförmig begrenzten Arealen. Im übrigen zeigten diese Fasern keine weiteren Auffälligkeiten. Einige Fasern enthielten eine ungewöhnliche Vermehrung von lysosomenähnlichen dichten Körperchen in unterschiedlicher Größe (Abb. 4b).

Bei mehreren Tieren ließen sich elektronenmikroskopisch Myoblasten (vgl. SHAFIQ et al., 1967) nachweisen (Abb. 3b). Ihr Sarkoplasma enthält meist nur wenig Myofilamente, die irregulär zu schmalen Myofibrillen vereinigt sind. Charakteristisch ist das Ribosomen-besetzte granuläre endoplasmatische Reticulum. Freie Ribosomen kommen ebenfalls vor. Ihre Unterscheidung von quergetroffenen Myosinfilamenten ist durch den Größenunterschied möglich: Der Durchmesser normaler Myosinfilamente beträgt 100—110 Å und unterscheidet sich von dem der Ribosomen mit einem Durchmesser von ca. 150 Å, so daß bereits bei relativ schwacher Vergrößerung eine Differenzierung möglich ist. Auffällig ist das Verhalten des Sarkolemm: Mehrere eng nebeneinander liegende Myoblastenfortsätze werden gemeinsam von einer Basalmembran umgeben.

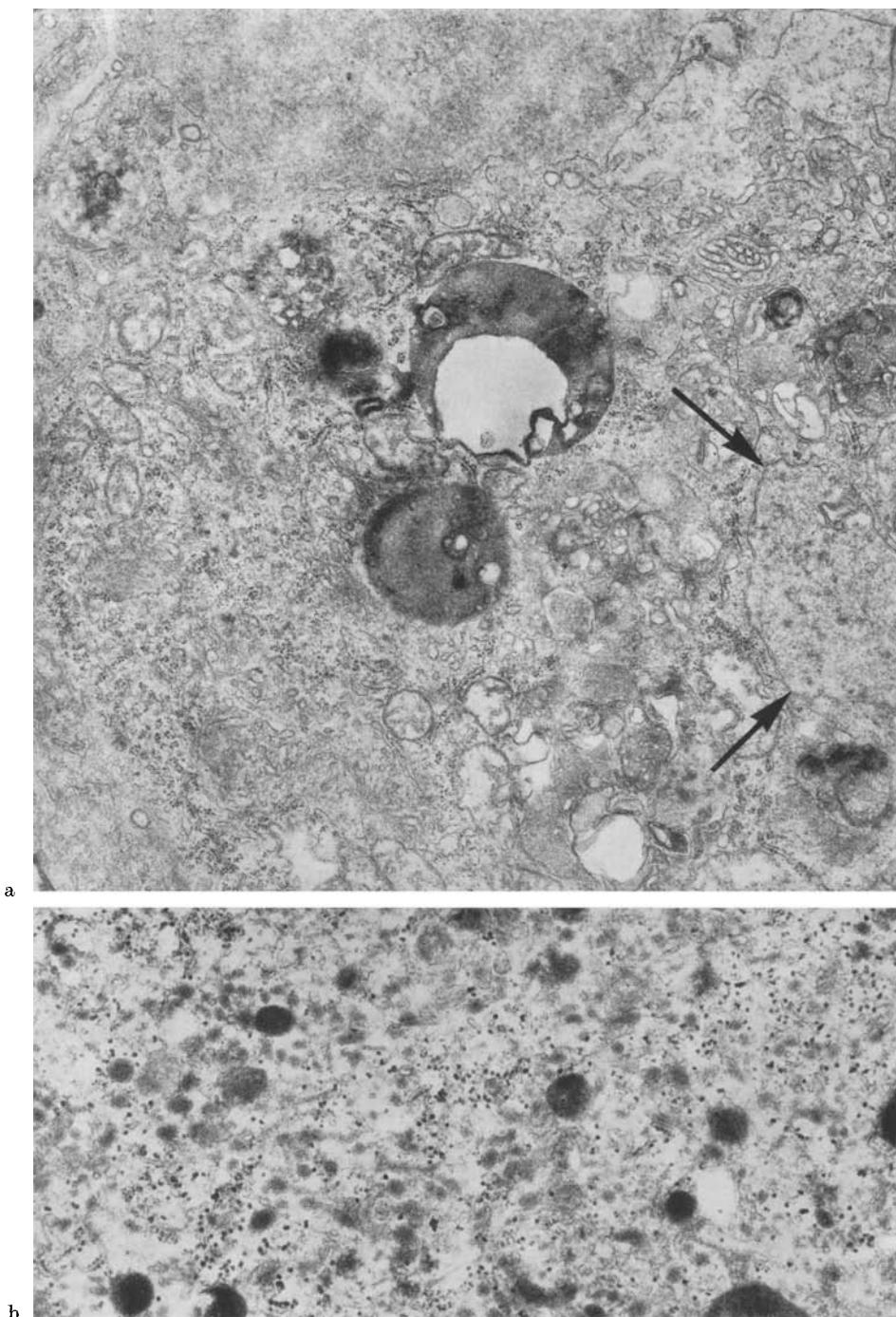


Abb. 4. a Im Bild oben „hyalin“ degenerierte Muskelfaser mit Reaktions- und Abbauprodukten in einer darunter gelegenen phagocytierenden Zelle. Letztere lässt neben einzelnen dichten Körperchen ein ausgeprägtes granuläres endoplasmatisches Reticulum erkennen. Die

Die untersuchten Muskelspindeln zeigten keinen sicher pathologischen Befund. Phasenkontrastmikroskopisch auffällige intrafusale Muskelfasern erwiesen sich elektronenmikroskopisch als vermutlich artifiziell verändert (geschwollen).

Mit Ausnahme eines einzigen Nerven zeigten sämtliche untersuchten Nervenfasern bei ausgeprägten elektromyographischen Symptomen der „Myotonie“ normale Befunde. Ein einziger *N. ischiadicus* zeigte leukocytäre und lymphzellige Infiltrate. Vermutlich war er bei der elektromyographischen Untersuchung von der Nadel getroffen worden. Die Infiltrate erstreckten sich vor allem auf das Epineurium, das Perineurium und ein umschriebenes angrenzendes Areal eines Faszikels. Bei allen anderen Tieren wurden die elektromyographischen Untersuchungen auf der linken Seite, die bioptischen Untersuchungen aber auf der rechten Seite durchgeführt und ähnliche Veränderungen nicht mehr gesehen.

Diskussion

Die meisten Muskelfasern der Tiere mit elektromyographisch nachgewiesenen Symptomen der „Myotonie“ und den oben beschriebenen biochemischen Störungen zeigten phasenkontrast- und elektronenmikroskopisch keinen auffälligen Befund. Wohl aber fanden sich an einzelnen Fasern Veränderungen, wie sie größtenteils auch bei andersartigen Myopathien vorkommen. Am häufigsten ließen sich nekrotisierende Faserveränderungen (Zenkersche Degenerationen) und Phagocytosevorgänge nachweisen. Auch regenerative Erscheinungen wie Myoblastenproliferationen kamen vor. Neue, bisher nicht näher untersuchte morphologische Veränderungen ließen sich bei den vacuolär degenerierten Fasern erheben: Das Sarkoplasma derartiger Fasern erschien oft verdichtet, die dicken Filamente lagen auf Querschnitten wenigstens teilweise dichter nebeneinander als in den angrenzenden normalen Fasern. Die Wand der Vacuolen war oft auffällig dick, ganz ähnlich wie die benachbarter Komponenten des T-Systems. Bläschenförmige Abfaltungsprodukte ließen sich im Innern der Vacuolen, teilweise noch in sichtbarem Zusammenhang mit der Vacuolenwand nachweisen. Am auffälligsten waren jedoch Histiocyten in den Vacuolen, deren Weg aus dem Endomysium in die Vacuolen hinein (bzw. in umgekehrter Richtung) auf Serienschnitten im Phasenkontrastmikroskop nachgewiesen werden konnte.

Es ist verlockend, die elektronenmikroskopischen Befunde an den vacuolierten Muskelfasern mit den biochemischen Ergebnissen zu korrelieren und als morphologisches Substrat einer an bestimmten Muskelfasern offenbar elektiv verstärkten Einwirkung des 20,25-Diazacholesterins zu deuten: Möglicherweise könnte die Schädigungsschwelle bei der gewählten Dosierung so hoch liegen, daß sich die Schädigung nur bei einigen wenigen Fasern manifestiert, während sie bei

Zuordnung der verschiedenen Membranen und Membrankomplexe ist z.T. schwierig. Mitochondrien sind meistens an erhaltenen Cristae zu erkennen. Die Abgrenzung eines Golgi-Apparates von Komponenten des proliferierten agranulären endoplasmatischen Reticulums ist jedoch nicht sicher möglich. Die Pfeile bezeichnen den Teil einer vermutlich degenerierten Muskelzelle, der teilweise von der phagocytierenden Zelle umschlossen wird. 16000 \times . b Ausschnitt aus einer anderen „hyalin“ degenerierten Muskelfaser mit reichlich elektronendichten Körperchen. Letztere werden meistens von einer Membran umhüllt. Glykogengranula und nicht näher identifizierbare Membransysteme liegen dazwischen. Myofilamente sind in diesem Bereich nicht zu sehen. 20000 \times

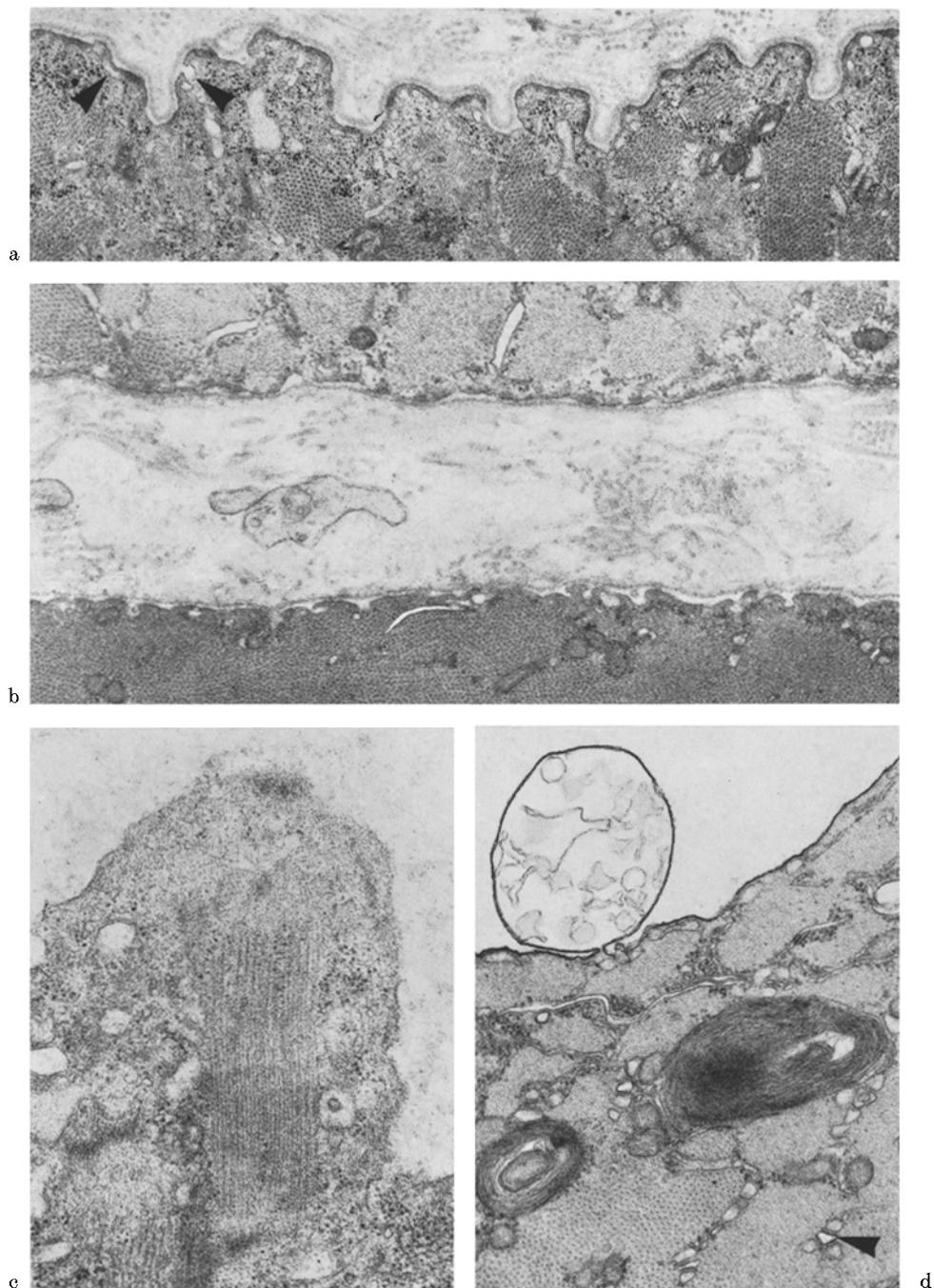


Abb. 5. a Sarkolemmfältelung einer quergeschnittenen Muskelfaser mit nur wenigen umfangreichen Vacuolen (gleiche Faser wie in c). Die unter dem Sarkolemm gelegenen Sarkomere sind in verschiedenen Höhen quergetroffen, so im Bereich des A- und I-Bandes und im Z-Streifen. Dazwischen liegen Glykogengranula, Mitochondrien und Teile des T-Systems und

den meisten unter der Schwelle der elektronenmikroskopisch faßbaren Strukturveränderungen liegt. Auffällig ist, daß gerade die Strukturelemente betroffen sind, an denen man einen Defekt nach allen vorausgegangenen Untersuchungen bei der Myotonie erwarten würde: Gerade die intramuskulären Membransysteme zeigen vacuolige Erweiterungen und abnorme Verdickungen der Membran. Doch ist ein Zusammenhang mit der Myotonie sehr zweifelhaft, da vacuolige Faserveränderungen bei den verschiedensten Myopathien beobachtet werden (vgl. ADAMS et al., 1965; WHISNANT et al., 1963; SOMERS u. WINER, 1965). Elektronenmikroskopisch sind ähnliche Vacuolen in Muskelfasern von REWCASTLE und HUMPHREY (1965) nach langanhaltender Chlorochin-Medikation, von HOWES et al. (1966) bei der hypokaliämischen periodischen Paralyse und von SCHRÖDER und ADAMS (1968) bei der myotonischen Dystrophie beschrieben worden. HOWES et al. und REWCASTLE und HUMPHREY nehmen an, daß die Vacuolen aus Erweiterungen des sarkoplasmatischen Reticulums entstehen, da sie verschiedene Übergangsformen zwischen geringfügigen Erweiterungen des letzteren und größeren Vacuolen beobachtet haben. Der endgültige Nachweis, daß es sich um Erweiterung des T-Systems, wie wir annehmen, oder des sarkoplasmatischen Reticulums, wie von anderen Autoren vermutet wird, handelt, steht jedoch noch aus. Die Verbindung des Vacuoleninhalts mit dem extracellulären Flüssigkeitsraum ist bisher weder durch den direkten elektronenmikroskopischen Nachweis der Kontinuität noch durch Tracer-Substanzen (vgl. HUXLEY, 1964) bewiesen worden. Histiocyten, die wir im Innern der Vacuolen gefunden haben, sind keineswegs passiv diffundierende „Tracer“, sondern könnten sich einen abnormen Weg durch geschädigtes Muskelgewebe gebahnt haben. Die Bedeutung der lichtmikroskopisch auch von SOMERS und WINER (1965) bei der „Myotonie“ nach Diazacholesterin nachgewiesenen, wahrscheinlich völlig unspezifischen vacuoligen Muskelfaserveränderung für das Symptom der „Myotonie“ oder die „Pseudomyotonie“ muß jedoch unklar bleiben, solange nicht elektrophysiologische Einzelzellableitungen von vacuolisierten Muskelfasern einen Zusammenhang ausschließen oder bestätigen.

Die mannigfachen Bilder der nekrotisierenden Faserveränderungen, die in der histologischen Literatur als hyaline oder segmentale (Zenkersche) Degeneration oder Coagulationsnekrose beschrieben werden (ADAMS et al., 1962), sind in ihrer

des sarkoplasmatischen Reticulums. Ein direkt mit dem Sarkolemm in Verbindung stehender Teil des sarkoplasmatischen Reticulums und ein Pinocytosebläschen in Zusammenhang mit dem Sarkolemm sind durch Pfeile markiert. 17500 \times . b Beim Vergleich einer normalen (im Bild oben) mit einer hochgradig vacuolisierten quergeschnittenen Muskelfaser (unten) wird der Dichteunterschied deutlich. Die Myosinfilamente stehen bei vermutlich gleichem Kontraktionszustand in der vacuolisierten Faser dichter nebeneinander als in der normalen Faser. Die untere Faser ist unregelmäßiger konturiert als die obere. 17500 \times . c Quergeschnittene vacuolisierte Muskelfaser, in der eine fehlorientierte längsgeschnittene Myofibrille an der sonst dünnen Vacuolenwand inseriert. Letztere zeigt in dieser Zone eine Verdichtung entsprechend einem Z-Streifen. Einzelne quergeschnittene Myofilamente sind im Bild unten rechts zu erkennen. 25000 \times . d Quergeschnittene vacuolisierte Muskelfaser mit „markscheidenähnlichen“ Membrankomplexen und einer Vacuole, die ein bläschenförmiges Abfaltungsprodukt in Zusammenhang mit der Vacuolenwand erkennen läßt. Der Pfeil markiert ein Bläschen, das wegen seiner topographischen Beziehung zu drei benachbarten Bläschen als Teil des T-Systems aufgefaßt werden muß. Auffällig ist die Dicke der Membran, die etwa der Vacuolenwand entspricht. 23000 \times



Abb. 6. Im Innern einer Vacuole einer quergeschnittenen, hochgradig vacuolisierten Muskelfaser liegt ein Histiocyt mit charakteristischen Organellen und fingerförmigen Fortsätzen. Die umhüllende Membran des Histiocytens ist fast genauso dick und elektronendicht wie die der Vacuole. Der Inhalt der Vacuole ist amorph, feinkörnig oder völlig unstrukturiert. Das umgebende Sarkoplasma erscheint wie in Abb. 5 b verdichtet. 14000 ×

Pathogenese noch wenig analysiert. Auch sind die Zusammenhänge in der zeitlichen Reihenfolge keineswegs geklärt, obwohl bereits zahlreiche elektronenmikroskopische Befunde über derartige schwere Fasererkrankungen veröffentlicht sind (vgl. MILHORAT et al., 1966). In den vorliegenden Langzeitemperimenten war eine weitere Aufklärung nicht möglich, da über den Zeitpunkt des Auftretens

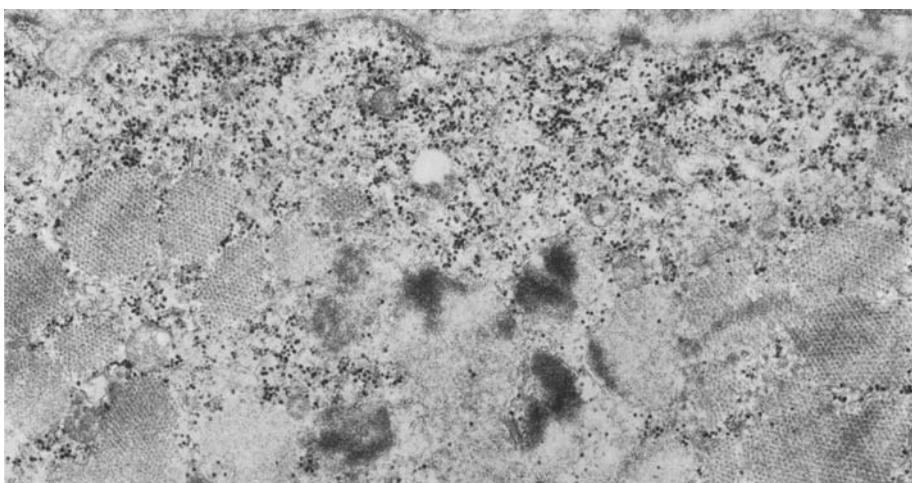


Abb. 7. Quergeschnittene Muskelfaser mit einer beträchtlichen Anhäufung von Glykogengranula unter dem Sarkolemm. Dazwischen findet sich ein amorphes Material. Die angrenzenden Myofibrillen sind teilweise auffällig dünn. Im interfibrillären Sarkoplasma liegen nur wenige Glykogengranula. 17500 ×

einer jeden Faserveränderung nichts Sichereres bekannt war. Es ist zu vermuten, daß es sich um unspezifisch-toxische Einwirkungen des 20,25-Diazacholesterins oder des Triparanol handelt.

Die regenerativen Erscheinungen im Muskel trotz fortlaufender „Intoxikation“ mit 20,25-Diazacholesterin allein oder in Kombination mit Triparanol sind beachtlich. Die regenerierenden Muskelfasern oder Myoblasten sind gekennzeichnet durch das häufige Vorkommen von Ribosomen und einem ausgeprägten granulären endoplasmatischen Reticulum (Lit. bei SHAFIQ et al., 1967).

Im Gegensatz zu unseren normalen Befunden an den meisten Muskelfasern stehen die Angaben von M. J. ADAMS und THOMPSON bei myotonischen Ziegen: Sie betonen, daß die Komponenten des sarkoplasmatischen Reticulums quantitativ reduziert und weniger regelmäßig angeordnet seien, was auch aus den Untersuchungen von ALEU und AFFIFI bei der myotonischen Dystrophie bekannt wäre. Außerdem fanden sie eine Vermehrung von osmiophilen Körnchen (mit einem Durchmesser von 300—500 Å) zwischen den Myofibrillen, die sie von den Glykogen-Granula differenzieren wollen; doch bleibt unklar, worum es sich sonst handeln könnte. Man müßte bei einer Beurteilung der quantitativen Verhältnisse eine mögliche Aktivitätshypertrophie der Muskelfasern als Folge der Myotonie berücksichtigen. Genaue Angaben (vgl. PEACHY, 1965) über die quantitative Relation des T-Systems, des sarkoplasmatischen Reticulums und der Myofibrillen im hypertrophierten normalen Muskel gibt es jedoch beim Menschen bisher nicht. Wir möchten deshalb aufgrund unserer Befunde bei der Myotonia congenita (SAMAHÄ et al., 1967), bei der myotonischen Dystrophie (SCHRÖDER und ADAMS, 1968) und aufgrund der vorliegenden experimentellen Ergebnisse an der Auffassung festhalten, daß ein morphologisches Substrat der Myotonie bisher nicht sichergestellt ist.

Literatur

- ABOOD, L. G., K. KURAHASI, E. BRUNNGRABER, and K. KOKETZU: Biochemical analysis of isolated bullfrog sarcolemma. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **112**, 330—339 (1966).
- ADAMS, M. J., and J. W. THOMPSON: Myotonia congenita in goats: An electron microscopic, biochemical and biophysical study. *Sth. med. J. (Bgham, Ala.)* **58**, 1586 (1965).
- ADAMS, R. D., D. DENNY-BROWN, and C. M. PEARSON: Diseases of muscle. A study in pathology. 735 pp., second edit. New York: Harper & Brothers 1962.
- BENNET, H. S.: The structure of striated muscle as seen by the electron microscope. In: Structure and function of muscle, vol. I, p. 137—181. Edit. by G. H. BOURNE. New York and London: Academic Press 1960.
- BRANDT, P. W., E. LOPEZ, J. P. REUBEN, and H. GRUNDFEST: The relationship between myofilament packing density and sarcomere length in frog striated muscle. *J. Cell Biol.* **33**, 255—263 (1967).
- ENGEL, A. G.: Electron microscopic observations in metabolic myopathies. 40th Annual Meeting of the Amer. Assoc. of Neuropathologists 1964.
- ESTABLE-PUIG, J. F., W. C. BAUER, and J. M. BLUMBERG: Paraphenylenediamin staining of osmium-fixed plastic embedded tissue for light and phase microscopy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **24**, 531—535 (1965).
- EYZAGUIRRE, C., B. P. FOLK, K. L. ZIERLER, and J. L. LILIENTHAL jr.: Experimental myotonia and repetitive phenomena: the veratrinic effect of 2,4-dichlorphenoxyacetate (2,4-D) in the rat. *Amer. J. Physiol.* **155**, 69—77 (1948).
- HOWES, E. L., H. M. PRICE, C. M. PEARSON, and J. M. BLUMBERG: Hypokalemic periodic paralysis. Electronmicroscopic changes in the sarcoplasm. *Neurology (Minneap.)* **16**, 242—256 (1966).
- HUXLE, H. E.: Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle. *Nature (Lond.)* **202**, 1067—1071 (1964).
- KRAYER, O., and G. H. ACHESON: The pharmacology of veratrum alkaloids. *Physiol. Rev.* **26**, 383—446 (1946).
- KUHN, E.: Myotonia congenita und Dystrophia myotonica (Klinik und Biochemie), S. 235—247. In: Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie. Hrsg.: E. KUHN. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- Myotonia. In: Proceedings of the Second Internat. Congr. of Neuro-Genetics and Neuro-Ophthalmology of the World Federation of Neurology.
 - W. DOROW, W. KAHLKE u. H. PFISTNER: Myotonie nach 20,25-Diazacholesterin bei der Ratte — Elektromyographie, Mechanokardiographie, Fettsäurenanalyse der Phosphatide des Skelettmuskelns. (Im Druck.)
 - D. PETTE u. S. HOFER: Änderung der Hexokinaseaktivität im Skelettmuskel der Ratte nach 20,25-Diazacholesterin. (Im Druck.)
 - u. W. STEIN: Modellmyotonie nach 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) bei der Ratte. In vitro- und in vivo-Untersuchungen über den Einfluß von 2,4-D auf den Energietstoffwechsel des Muskels. *Klin. Wschr.* **43**, 673—677 (1965).
 - — Modellmyotonie nach 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D). Calciumaufnahme der Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums unter 2,4-D. *Klin. Wschr.* **44**, 700—702 (1966).
- LAYAMI, F., H. HÉCAEN, J. LEFEVRE et M. B. DELL: Dermatomyosite avec éléments myotoniques. *Rev. neurol.* **92**, 553—557 (1955).
- MILHORAT, A. T., S. A. SHAFIQ, and L. GOLDSTONE: Changes in muscle structure in dystrophic patients, carriers and normal siblings seen by electron microscopy; correlation with levels of serum creatine-phosphokinase (CPK). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **138**, 246—292 (1966).
- PEACHY, L. D.: The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25** (2), 209—231 (1965).
- REVEL, J. P.: The sarcoplasmic reticulum of the bat ericothyroid muscle. *J. Cell Biol.* **12**, 571—588 (1962).
- REWCASLE, N. B., and J. G. HUMPHREY: Vacuolar myopathy. *Arch. Neurol. (Chic.)* **12**, 570—582 (1965).
- RIECKER, G., H. DOBBELSTEIN, D. RÖHL u. H. D. BOLTE: Messungen des Muskelmembranpotentials einzelner quergestreifter Muskelzellen bei Myotonia congenita (Thomsen). *Klin. Wschr.* **42**, 519—522 (1964).

- SAMAH, F. J., J. M. SCHRÖDER, J. REBEIZ, and R. D. ADAMS: Studies on myotonia. Biochemical and electron microscopic studies on myotonia congenita and myotonia dystrophica. *Arch. Neurol. (Chicago)* **17**, 22—33 (1967).
- SCHRÖDER, J. M., and R. D. ADAMS: The ultrastructural morphology of the muscle fiber in myotonic dystrophy. *Acta neuropath. (Berl.)* **10**, 218—241 (1968).
- SHAFIQ, S. A., M. A. GORYCKI, and A. T. MILHORAT: An electron microscopic study of regeneration and satellite cells in human muscle. *Neurology (Minneapolis)* **17**, 567—574 (1967).
- SOMERS, J. E., and N. WINER: Reversible myopathy and myotonia following administration of a hypocholesterolemic agent. *Neurology (Minneapolis)* **16**, 761—765 (1966).
- TYLER, F. H.: The differentiation of myotonia and pseudomyotonia. In: *Progressive Muskel-dystrophie, Myotonie, Myasthenie*, p. 289—294. Hrsg. E. KUHN. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- VENABLE, J. H., and R. COGGESHALL: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**, 407—408 (1965).
- WHISNANT, J., R. ESPINOSA, R. R. KIERLAND, and E. H. LAMBERT: Chloroquine neuro-myopathy. *Proc. Mayo Clin.* **38**, 501—513 (1963).
- WINER, N., D. M. KLACHKO, T. W. BURNS, and R. D. BAER: Elektromyographic myotonic response induced by cholesterol-lowering agents. *Arch. phys. Med.* **46**, 499 (1965).
- J. M. MARTT, J. E. SOMERS, L. WOLCOTT, H. E. DALE, and T. W. BURNS: Induced myotonia in man and goat. *J. Lab. clin. Med.* **66**, 758—769 (1965).

Dr. J. M. SCHRÖDER
Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Neuropathologische Abteilung
6000 Frankfurt a.M.-Niederrad, Deutschordensstr. 46