

DE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN SPIERBIOPTEN VAN PROEFDIEREN EN PATIENTEN

Een vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek

(with a summary in English)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE
ROTTERDAM OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. B. LEIJNSE EN VOLGENS BESLUIT VAN HET
COLLEGE VAN DEKANEN. DE OPENBARE VERDEDIGING
ZAL PLAATS VINDEN OP WOENSDAG 30 MAART 1977
DES NAMIDDAGS TE 3.00 UUR PRECIES

door

DAVID EMANUEL ISRAEL

geboren te Amsterdam in 1939

1977

SCHRIKS' DRUKKERIJ B.V. - ASTEN (N.BR.)

PROMOTOR :

DR. A. E. F. H. MEIJER

CO-REFERENTEN :

PROF. DR. W. C. HÜLSMANN

DR. H. R. SCHOLTE

Het onderzoek werd bewerkt op de afdelingen Biochemie en Histochemie (Hoofd Dr. A. E. F. H. Meijer) van het Pathologisch Anatomisch Laboratorium (Hoofd Prof. Dr. C. A. Wagenvoort) van het Wilhelmina Gasthuis te Amsterdam.

INHOUD

Lijst van enzymen en gebruikte afkortingen die in dit proefschrift vermeld zijn	9
1. INLEIDING EN VRAAGSTELLINGEN	11
2. LITERATUUROVERZICHT	15
2.1. Gevolgen van vitamine E deficiëntie	15
2.2. Gevolgen van toediening van dimethylparafenyleendiamine-dihydrochloride (DPPD) bij ratten	19
2.3. Verhoging van de activiteit van enige zure hydrolasen in spierbiopten van patiënten met spierziekten	20
2.4. Correlatie tussen de toename van de activiteit van verschillende zure hydrolasen	20
3. DE SUBSTRAAT-SPECIFICITEIT VAN ZURE FOSFATASE EN β -GLUCURONIDASE	24
4. MATERIAAL EN METHODEN	27
4.1. Proeven met vitamine E deficiënte konijnen	27
4.2. Proeven met dimethylparafenyleendiamine-dihydrochloride behandelde ratten	29
4.3. Samenstelling van het patiënten materiaal	30
4.4. Voorschriften van de toegepaste histochemische methoden	31
4.5. Voorschriften van de toegepaste biochemische methoden	33
4.5.1. <i>Algemeen</i>	33
4.5.2. <i>Gefractioneerde centrifugatie</i>	33
4.5.3. <i>Gelfiltratie</i>	34
4.5.4. <i>Electroforese</i>	36
4.5.5. <i>Biochemische enzymbepalingen in spierweefsel</i>	36
4.5.6. <i>Biochemische bepalingen in konijnenserum</i>	39
4.6. Bewerking van de waarnemingen	41
4.6.1. <i>Bewerking van de waarnemingen in de coupes van spierbiopten van de proefdieren</i>	41
4.6.2. <i>Bewerking van de waarnemingen in de coupes van spierbiopten van de patiënten</i>	42
4.7. Statistische bewerking van de waarnemingen	42

5. EEN VERGELIJKING TUSSEN DE HISTOCHEMISCH EN BIOCHEMISCH BEPAALDE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN VERSCHILLENDE SKELETSPIEREN VAN VITAMINE E DEFICIËNTE KONIJNEN	48
5.1. Inleiding	48
5.2. Histologisch en histochemisch onderzoek <i>Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β-glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit in verschillende skeletspieren van vitamine E deficiënte konijnen.</i>	49
5.3. Statistische bewerking van de resultaten van het histochemisch onderzoek	55
5.4. Biochemisch onderzoek <i>Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β-glucuronidase, cathepsine, zure en neutrale maltase activiteit in spierhomogenaten van vitamine E deficiënte konijnen en de statistische bewerking van de resultaten.</i>	58
5.5. Een vergelijking tussen de resultaten van het histochemisch en het biochemisch onderzoek	60
5.6. Resultaten van het onderzoek naar de substraat specificiteit van zure fosfatase en β -glucuronidase	62
5.6.1. <i>Inleiding en resultaten van het centrifugatie onderzoek op verschillende celfracties van spieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen</i>	62
5.6.2. <i>Resultaten van het gelfiltratie onderzoek bij spieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen</i>	65
5.6.3. <i>Resultaten van het electroforese onderzoek op spieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen</i>	69
6. EEN VERGELIJKING TUSSEN DE HISTOCHEMISCH EN BIOCHEMISCH BEPAALDE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN VERSCHILLENDE SKELETSPIEREN VAN RATTEN DIE MET DPPD WAREN BEHANDELD	71
6.1. Histologisch en histochemisch onderzoek <i>Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β-glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit in verschillende skeletspieren van ratten die met DPPD waren behandeld.</i>	71
6.2. Statistische bewerking van de resultaten van het histochemisch onderzoek	78
6.3. Biochemisch onderzoek <i>Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β-glucuronidase, cathepsine, zure en neutrale maltase activiteit in spierhomogenaten van ratten die met DPPD waren behandeld en de statistische bewerking van de resultaten.</i>	80
6.4. Een vergelijking tussen de resultaten van het histochemisch en het biochemisch onderzoek	83

HOOFDSTUK 1

INLEIDING EN VRAAGSTELLINGEN

In onze afdeling worden in samenwerking met andere afdelingen van het Wilhelmina Gasthuis, veranderingen in de stofwisselingsprocessen van de spier bij spierziekten bestudeerd (VAN WIJNGAARDEN et al., 1967; HÜLSMANN et al., 1967 en 1970; DEN HARTOG JAGER et al., 1968; MEIJER et al., 1971; MEIJER, 1972 a en b). Hierdoor wordt een dieper inzicht in de morfologie en de biochemie van de pathologisch veranderde spier verkregen. In onze afdeling wordt bovendien nagegaan in hoeverre histochemische methoden in staat zijn metabole veranderingen in de spier te karakteriseren. Deze technieken vragen weinig weefsel, hetgeen voor het onderzoek van patiënten materiaal van belang is.

Een dergelijk onderzoek is door JÖBSIS (1971) en door JÖBSIS en MEIJER (1973 e en b) voor de mitochondriale enzymen succinaat dehydrogenase, NADH-tetrazolium oxydoreductase en glycerol-3-fosfaat dehydrogenase verricht.

De histochemische methoden hebben ook het voordeel, dat men in tegenstelling tot biochemische technieken, een goede indruk over de morfologie van het weefsel en de localisatie van het enzym in het weefsel kan verkrijgen.

Met enzymhistochemische technieken verkrijgt men evenwel geen informatie, die voor het doen van kwantitatieve interpretaties geschikt zijn. Dit laatste komt o.a. doordat tijdens het incuberen een gedeelte van het aan te tonen enzym uit de coupe kan diffunderen (NACHLAS et al., 1956; FRIEDE et al., 1963; FAHIMI en AMARASINGHAM, 1964; KALINA en GRAHAM, 1965; KUNZE, 1967; MEIJER, 1972 b en 1973; MEIJER en VLOEDMAN, 1973).

Men heeft getracht de diffusie te verminderen, door aan het incubatiemedium een stof met een relatief hoog moleculair gewicht zoals gelatine, dextraan of polyvinylpyrrolidon toe te voegen (FAHIMI en AMARASINGHAM, 1964; ARNOLD et al., 1968; JACOBSEN, 1969; DAHL en MELLGREN, 1970; RITTER et al., 1971; KHAN et al., 1971 en 1973). De resultaten zijn echter teleurstellend omdat de diffusie slechts gedeeltelijk kan worden tegengegaan (RITTER et al., 1971; MEIJER, 1972 b en 1973; MEIJER en VLOEDMAN, 1973).

Bovendien kan door toevoeging van de macromoleculaire verbindingen enzymremming plaatsvinden (DAHL en FROM, 1971; LISY et al., 1971). Enzymdiffusie kan gedeeltelijk worden tegengegaan door de coupes voor het incuberen te fixeren, maar het is dan niet te vermijden dat sommige enzymen gedeeltelijk geïnactiveerd worden.

Bij de membraantechniek (MC.MILLAN, 1967; MC.MILLAN en WITTUM, 1971; MEIJER, 1972 b en 1973; MEIJER en VLOEDMAN, 1973) bevindt zich tussen de coupe en het incubatiemedium een semipermeable membraan. Met de gebruikte membranen kunnen alleen moleculen met een moleculair gewicht kleiner dan 20000 het membraan passeren. De stoffen die in het incubatiemedium aanwezig zijn hebben in het algemeen een laag molecuulgewicht en kunnen derhalve de coupe bereiken. De enzymen kunnen vanwege het relatief hoge molecuulgewicht het membraan niet passeren en kunnen tijdens het incuberen niet uit de coupe diffunderen. Een ander groot voordeel van deze methode is dat vóórfixatie niet noodzakelijk is.

Nu wij de beschikking hebben over een verbeterde enzymhistochemische techniek leek het ons zinvol deze bij dit onderzoek toe te passen, alhoewel aan de nieuwe methode ook nadelen kunnen kleven. Incubatiemedia met hoogmoleculaire reactiecomponenten moeten worden vermeden aangezien deze het membraan niet kunnen passeren.

Zure hydrolasen kunnen een indruk geven over de mate waarin de spier wordt afgebroken (WEINSTOCK en IODICE, 1967). Het is gebleken, dat de activiteit van deze enzymen zowel bij neurogene spierziekten als bij primaire myopathieën is toegenomen (TAPPEL et al., 1962; ZALKIN et al., 1962; WEINSTOCK en IODICE, 1969; MONTICONE et al., 1970; SCARLATO en CORNELIO, 1970; KAR en PEARSON, 1972 a en b).

Biochemisch onderzoek leerde, dat zowel de lysosomale als de extralysosomale activiteit van deze enzymen verhoogd was (TAPPEL et al., 1962; ZALKIN et al., 1962).

Men neemt aan dat bij neurogene spierziekten en primaire myopathieën lysosomale proliferatie optreedt, gevolgd door beschadiging van de lysosomale membraan, waardoor de in de lysosomen aanwezige zure hydrolasen in het cytoplasma diffunderen (WEINSTOCK en IODICE, 1969). Deze enzymen kunnen dan de cel afbreken, waardoor degeneratie van de cel of celdood optreedt.

Wij stelden ons bij dit onderzoek de volgende vragen:

1. Gaat een toename van de histochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase (bijvoorbeeld de zure fosfatase activiteit) gepaard met

- een toename van de histochemisch bepaalde activiteit van één of meerdere andere zure hydrolasen?
2. Gaat een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase (bijvoorbeeld de zure fosfatase activiteit) gepaard met een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één of meerdere andere zure hydrolasen?
 3. Bestaat er een correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek?
 4. Komen de histochemisch gevonden localisaties van zure hydrolasen met elkaar overeen?

Indien deze vragen bevestigend beantwoord zouden kunnen worden, dan betekent dit dat men met één eenvoudige histochemische methode (bijvoorbeeld de histochemische zure fosfatase methode) een goede indruk krijgt over de activiteit van andere zure hydrolasen.

Veel onderzoekers bepalen de activiteit van zure fosfatase in spierbiopten met de conventionele histochemische methode (PEARSE, 1968). Deze methode is vanwege de enzymdiffusie tijdens de incubatie niet betrouwbaar (MEIJER, 1972 b). Daarom werd onderzocht of de semipermeabele membraan methode voor zure fosfatase wel betrouwbare informatie kan geven.

Wij bepaalden met histochemische methoden de activiteit en localisatie van zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase. Met biochemische methoden werden de activiteit van de twee eerstgenoemde enzymen en die van cathepsine, zure en neutrale maltase bepaald.

Zure fosfatase, β -glucuronidase en cathepsine werden bij het onderzoek betrokken, omdat de activiteit van deze enzymen door verreweg de meeste onderzoekers wordt bestudeerd (DINGLE en FELL, 1969; DINGLE, 1973).

Het is gebleken dat de activiteit van deze 3 enzymen bij primaire myopathieën en neurogene spierziekten verhoogd is (WEINSTOCK en IODICE, 1969). Door deze enzymen bij het onderzoek te betrekken, kunnen de resultaten van ons onderzoek met die van anderen vergeleken worden. De E 600 resistente naftylesterase activiteit werd onderzocht om na te gaan of we met een lysosomaal enzym te maken hebben. Ofschoon veel argumenten hiervoor pleiten (HOLT, 1963; SHIBKO en TAPPEL, 1964; BARRON et al., 1968; BARROW en HOLT, 1971), is het toch niet uit te sluiten dat dit enzym in de microsomen is gelocaliseerd (KATSUYUKI et al., 1966; PEARSE, 1972; BÖCKING et al., 1974).

De leucine naftylamidase bepaling werd toegepast, omdat de localisatie van dit enzym voor veel histochemici eveneens een punt van discussie is. Volgens BECK et al. (1968), CHAYEN et al. (1971) en PEARSE (1972) zijn er argumenten die pleiten voor een lysosomale localisatie, terwijl o.a. MITTELBACH en PONGRATZ (1969), HOPUSU-HAVU en EKFORSS (1969) veronderstellen dat het enzym in de microsomen gelocaliseerd is.

Voor het aantonen van zure maltase deficiëntie, wordt in ons laboratorium de activiteit van dit enzym en van neutrale maltase volgens de methode van KOSTER et al. (1972), bepaald. Hierbij wordt tevens het quotiënt zure en neutrale maltase activiteit berekend. Het leek ons zinvol de maltase bepalingen bij dit onderzoek te betrekken. Niet alleen dat de bevindingen van het onderzoek een beter oordeel over de betrouwbaarheid van de bepalingmethode kunnen geven, tevens kan men zien of de activiteit van zure maltase parallel loopt met de activiteit van andere onderzochte lysosomale enzymen.

De activiteit van zure hydrolasen is in normale skeletspieren van mens en proefdier bijzonder gering. Normaal spierweefsel is hierdoor niet geschikt voor dit vergelijkend onderzoek. Onze keuze is gevallen op pathologisch veranderde skeletspieren van vitamine E deficiënte konijnen en van de met DPPD behandelde ratten.

Bij vitamine E deficiëntie kan een *sterke* stijging van de activiteit van zure hydrolasen in de spieren optreden (ZALKIN et al., 1962; WEINSTOCK en IODICE, 1969). Uit een door ons verricht inleidend onderzoek bleek dat na toediening van DPPD aan ratten een *matige* toename van de activiteit van deze enzymen in de spieren wordt gevonden.

Bovendien werd de activiteit van deze enzymen in spierbiopten van patiënten met spierziekten bepaald.

HOOFDSTUK 2

LITERATUUR OVERZICHT

2.1. GEVOLGEN VAN VITAMINE E DEFICIENTIE

Bij konijnen, die een vitamine E deficiënt dieet krijgen, kunnen myopathie (GOETTSCHE en PAPPENHEIMER, 1931; ZALKIN et al., 1962; WEINSTOCK en IODICE, 1969 en TELFORD, 1971), myocarditis (BRAGDON en LEVINE, 1949) en levercelnecrose (GOODMAN en GILMAN, 1965; VOS, 1972) optreden.

Bij andere vitamine E deficiënte proefdieren werden bovendien cerebellaire afwijkingen, darmresorptiestoornissen, anaemieën en degeneratie van niertubuli gevonden (SCOTT, 1966; ROELS, 1967; VOS, 1972; WASSERMAN en TAYLOR, 1972).

Uit het onderzoek van TELFORD (1971) bleek, dat bij jonge konijnen, die een vitamine E deficiënt dieet kregen, na ongeveer 2 weken de eerste klinische verschijnselen van vitamine E deficiëntie optraden. MACKENZIE et al. (1948) en TELFORD (1971) namen waar dat bij vitamine E deficiëntie de volgende symptomen optraden:

Stadium 1. Algemene malaise verschijnselen, de voedselopname begint af te nemen, verder zijn er geen bijzonderheden.

Stadium 2. De voedselopname bedraagt $\frac{1}{3}$ van de normale voedselopname, hierdoor treedt een gewichtsdaling op. Indien het proefdier op de zijkant wordt gelegd, duurt het langer tot het rechtop staat dan bij een controle konijn. Bovendien is de spiertonus afgenomen.

Stadium 3. De voedselopname en het gewicht nemen verder af. Indien het konijn op één zijde wordt gelegd, richt het zich niet meer op. Er is verder een geringe spiertonus.

Stadium 4. Proefdier is succumberend.

De periode tussen het optreden van de eerste verschijnselen en de dood van het proefdier kan variëren van 6 tot 21 dagen (TELFORD, 1971).

Over de genese van de myopathie en van de andere afwijkingen, die ten gevolge van vitamine E deficiëntie optreden, bestaan meerdere theorieën

(zie de samenvattende overzichten van VASINGTON, 1960; Vos, 1972; WASSERMAN en TAYLOR, 1972).

ZALKIN et al., (1962) menen dat bij vitamine E deficiëntie peroxydatie van de onverzadigde vetzuren van de celmembranen optreedt, waarna hydrolytische enzymen afkomstig uit de lysosomen de cel afbreken. Indien aan het vitamine E deficiënte dieet antioxydantia (selenium of zwavelhoudende aminozuren) waren toegevoegd kon het ontstaan van spierdystrofie bij het lam en de kip (SCOTT et al., 1962; SCOTT, 1966, 1970; DESAI et al., 1964) wel, maar bij het konijn (DRAPER, 1957; HOVE et al., 1958) niet worden voorkomen.

Volgens het elektronenmicroscopisch onderzoek van VAN VLEET et al., (1968) traden bij vitamine E deficiëntie de eerste afwijkingen in de mitochondriën op, waardoor volgens hen onvoldoende ATP werd gevormd. Dit laatste is in overeenstemming met de resultaten van het onderzoek van VAN DORP (1964), die vond dat de P/O verhouding (een maat voor het ATP rendement van de ademhaling) bij de oxydatie van glutamaat en succinaat in mitochondriën van skeletspieren van vitamine E deficiënte konijnen aanzienlijk lager was dan bij de controle proefdieren. MOLENAAR et al., (1970) en Vos (1972) toonden aan dat bij vitamine E deficiëntie eerst de meervoudige onverzadigde vetzuren in de membranen van de mitochondriën zijn afgenomen. Deze membranen zouden vervolgens in versterkte mate worden afgebroken.

SWEENEY et al., (1972) beschreven dat bij vitamine E deficiëntie een zwelling van de endotheelcellen aan de afwijkingen in de spiervezels voorafging. De vaatafwijkingen zouden tot een stoornis in de microcirculatie leiden, waarna ten gevolge van zuurstofgebrek afwijkingen in de spiervezels optraden. Het is relevant te vermelden dat volgens DEMOS (1970) en ENGEL (1973) bij de ziekte van Duchenne stoornissen in de microcirculatie van de spier, door onvoldoende afbraak van vasoactieve stoffen (SCHOLTE, 1974), tot afwijkingen in de spier leiden.

De meeste spieren zijn in het eindstadium atrofisch en lichtbruin met gele streepvormige gebieden (GOETTSCH en PAPPENHEIMER, 1931; TELFORD, 1971). In vroegere stadia zijn deze afwijkingen minder uitgesproken.

De eerste morfologische verandering is Zenkerse degeneratie (GOETTSCH en PAPPENHEIMER, 1931; TELFORD, 1971). De spiervezels zijn gezwollen, het cytoplasma kleurt sterk met eosine en de dwarse streping is verloren gegaan. Vervolgens treedt er fagocytose van de gedegenererde spiervezels op, waarbij zowel in als rond de spiervezels uitgebreide ontstekingsinfiltraten worden gevonden. Tenslotte worden te midden van de ontstekings-

infiltraten regenererende spiervezels waargenomen (GOETTSCH en PAPPENHEIMER, 1931; TELFORD, 1971).

ZALKIN et al., (1962) vonden een toename van de zure ribonuclease, cathepsine, β -galactosidase en arylsulfatase activiteit in homogenaten van spieren van vitamine E deficiënte konijnen. Deze bevindingen werden door meerdere onderzoekers (o.a. KOSZALKA et al., 1961; DESAI et al., 1964; DESAI, 1966; IODICE en WEINSTOCK, 1965; BUNYAN et al., 1967; FREEMON, 1971) zowel bij het konijn als bij andere proefdieren bevestigd. De belangrijkste onderzoeken zijn in tabel 1 vermeld. De resultaten van de verschillende auteurs zijn moeilijk met elkaar te vergelijken, omdat de proeven op verschillende wijzen zijn opgezet.

De toename van de activiteit van de lysosomale enzymen en de histologische afwijkingen zijn sterk afhankelijk van de leeftijd van het proefdier, de proefdiersoort, de duur van de proef, de samenstelling van het dieet, het gebruikte substraat en de onderzochte spier. Deze factoren zullen in het kort besproken worden.

Hoe jonger het proefdier, des te sneller het groeit en des te groter de vitamine E behoefte. Bovendien zijn de depôts van vitamine E dan kleiner dan bij volwassen proefdieren (Vos, 1972). Door SCOTT en CALVERT (1962) en SCOTT (1966 en 1970) werd aangetoond dat door toevoeging van zwavelhoudende aminozuren (cystine en methionine) of selenium aan het vitamine E deficiënte dieet, de spierdystrofie bij het kuiken wel, doch bij het konijn niet voorkomen kon worden. Onverzadigde vetzuren kunnen de aanwezigte (geringe) hoeveelheid vitamine E in het vitamine E deficiënte dieet oxyderen (JAGER, 1969; VOGTMANN en PRABUCKI, 1971). Indien aan het vitamine E deficiënte dieet een grote hoeveelheid onverzadigde vetzuren wordt toegevoegd treedt de spierdystrofie sneller op (CALVERT et al., 1964).

Sommige hydrolytische enzymen waren in spierbiopten van de ene diersoort die vitamine E deficiënt dieet kreeg wel, doch bij de andere diersoorten niet toegenomen. ZALKIN et al. (1962), DESAI (1966) en FREEMON (1971) konden in spierbiopten van respectievelijk konijnen, lammeren en ratten wel een verhoogde arylsulfatase activiteit aantonen, daarentegen vonden DESAI et al., (1964) bij kippen geen verhoging van de arylsulfatase activiteit. DESAI et al., (1964) konden met β -glycerolfosfaat bij kippen wel een toename van de zure fosfatase activiteit in de spieren aantonen. WEINSTOCK en LUKACS (1965) vonden met dit substraat bij konijnen geen verhoging van de zure fosfatase activiteit.

Ook bleek de activiteit van de verschillende isoënzymen van zure fosfatase

TABEL 1. Activiteitstoename^a van zure hydrolasen bij vitamine E deficiëntie (Literatuur).

Auteur	Zalkin et al., 1962	Weinstock, 1965	Desai et al., 1966	Desai et al., 1964	Bunyan et al., 1967
Proefdier	Konijn	Konijn	Lam	Kuiken	Kuiken
Leeftijd bij het begin van het onderzoek	28 dagen	Niet vermeld	e	1 dag	1 dag
Duur van het onderzoek	24 dagen	Tot proefdieren in stadium 2 vlg. Telford, 1971	Dystrofisch en 4 - 6 weken	4 weken	4 weken
Onderzochte spieren	Bovenbeen spieren	Bovenbeen spieren	Onderbeen spieren	M. Pectoralis	M. Pectoralis
Arylsulfatase (2 Hydroxy-5-nitrofenylfosfaat)	—	—	35 ^b	—	—
Ribonuclease (Ribonucleïnezuur)	22 ^b	3,0 ^c	—	3,8 ^b	—
Cathepsine (Haemoglobine)	25	3,6	3	1,6	4 ^d
β-Galactosidase (N-Phenyl-β-D-galactoside)	52	—	3	2,0	—
β-Glucuronidase (Fenolftaleïne-β-D-glucuronide)	47	—	5	7,6	—
(4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)	—	—	—	—	6
Zure fosfatase (β-Glycerolfosfaat)	—	1	2	1,4	1,5
(Fenylfosfaat)	—	1,6	—	—	—

Legenda

- a. Toename enzymactiviteit = enzymactiviteit proefdier/enzymactiviteit controle dier.
b. De enzymactiviteit werd per mg eiwit bepaald.

- c. De enzymactiviteit werd uitgedrukt per gram spierweefsel x totale gewicht van de spier.
d. De enzymactiviteit werd per gram spierweefsel bepaald.
e. De moeders kregen in de graviditeit vitamine E deficiënt diët.

in deze spieren niet altijd verhoogd te zijn. WEINSTOCK en LUKACS (1965) vonden in spierbiopten met belangrijke histologische afwijkingen geen verhoging van de zure fosfatase activiteit met β -glycerolfosfaat, doch wel met fenylfosfaat.

TELFORD (1971) beschreef, dat bij vitamine E deficiëntie de histologische afwijkingen niet in alle spieren even uitgebreid waren. Er bestond een correlatie tussen de toename van histologische afwijkingen (ontstekingsinfiltraten) en de toename van de activiteit van de lysosomale enzymen (ZALKIN et al., 1962).

Uit bovengenoemde onderzoeken blijkt dat bij vitamine E deficiëntie de activiteit van de verschillende lysosomale enzymen niet in dezelfde mate is toegenomen.

Een histochemisch onderzoek, waarbij de activiteit van zure hydrolasen in spierbiopten van vitamine E deficiënte proefdieren werd bepaald, is niet beschreven.

2.2. GEVOLGEN VAN TOEDIENING VAN DIMETHYLPARAFENYLEENDIAMINE-DIHYDROCHLORIDE (DPPD) BIJ RATTEN

JASMIN (1961) en JASMIN en GAREAU (1961) gebruikten DPPD om bij de rat een myopathie op te wekken. Bij histologisch onderzoek werden naast afwijkingen in de skeletspieren en in het myocard ook afwijkingen in hersenen, lymfatisch apparaat, maag, pancreas (GESCHICKTER et al., 1958; JASMIN, 1961; JASMIN en GAREAU, 1961), longen en vaatstelsel (GESCHICKTER et al., 1958) gevonden.

JASMIN en GAREAU (1961) menen dat de afwijkingen aan de capillairen (verhoogde permeabiliteit) de afwijkingen in de spiervezels veroorzaken.

In de skeletspier werden na toediening van DPPD (20 mg/kg subcutaan 2 maal daags) de volgende afwijkingen gezien.

De eerste dag van het experiment waren enkele vezels gezwollen, bovendien was de dwarse streping verloren gegaan. Tussen de spiervezels waren oedeem en enkele neutrofielen aanwezig.

Na twee tot drie dagen werden coagulatieneecrose, fragmentatie en desintegratie van de spiervezels gezien. In en tussen de spiervezels werden neutrofielen en macrophagen gevonden.

Na vier tot tien dagen werden naast tekenen van degeneratie en fagocytose van de spiervezels ook regenererende spiervezels waargenomen.

Na tien dagen werden de afwijkingen ondanks de voortgezette behandeling met DPPD geringer. Er werden afgezien van enig oedeem tussen

de spiervezels en toename van kernen in de spierweefsels geen afwijkingen gevonden. Uit het histochemisch onderzoek bleek dat in de gedegeneerde spiervezels en in het ontstekingsinfiltraat de zure fosfatase, esterase (ANDERSON en SONG, 1966) en leucine aminopeptidase activiteiten (JASMIN en GAREAU, 1961) verhoogd waren.

2.3. VERHOOGING VAN DE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN SPIERBIOPTEN VAN PATIENTEN MET SPIERZIEKTEN

Uit het histochemisch onderzoek van MONTICONE et al., (1970) en SCARLATO en CORNELIO (1970) bleek, dat bij primaire myopathieën en neurogene spierziekten de zure fosfatase activiteit in de pathologisch veranderde spiervezels duidelijk was toegenomen, doch dat de β -glucuronidase activiteit niet of in geringe mate verhoogd was.

Met biochemische methoden werd bij patiënten met de ziekte van Duchenne een activiteitstoename van arylsulfatase (HOOFD et al., 1966) en ribonuclease (ABDULLAH en PENNINGTON, 1968) in de spierbiopten gevonden. KAR en PEARSON (1972 a en b) konden alleen bij neurogene spierziekten en primaire myopathieën een verhoogde activiteit van zure fosfatase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, zure, neutrale en alkalische cathepsine aantonen als er in de coupe ernstige histologische afwijkingen werden gezien.

2.4. CORRELATIE TUSSEN DE TOENAME VAN DE ACTIVITEIT VAN VERSCHILLENDE ZURE HYDROLASEN

Bij spierdystrofie ten gevolge van vitamine E deficiëntie (tabel 1) en andere spierziekten bij proefdier en mens (tabel 2) bleek de activiteit van de onderzochte lysosomale enzymen in de spier meestal verhoogd te zijn. De activiteit van de verschillende enzymen was noch bij het onderzoek van ZALKIN et al., (1962), noch bij dat van andere onderzoekers (tabel 1 en 2) in dezelfde mate toegenomen. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat in de weefsels verschillende isoënzymen van één enzym aanwezig zijn, die een verschillende affiniteit voor één substraat tonen (NEIL en HORNER, 1964 a en b; LI et al., 1970 a en b; LIN en FISHMAN, 1972; AVILA en CONVIT, 1973). LIN en FISHMAN (1972) toonden aan dat het microsomale zure fosfatase fenylfosfaat en nitrofenylfosfaat sneller omzet

TABEL 2. Activiteitstoename^a van zure hydrolasen bij spierafwijkingen (Literatuur).

Auteur	Pennington, 1963	Tappel et al., 1962	Tappel et al., 1962	Weinstock, 1965	Stephen, 1971	Kar, 1972
Proefdier Laesie	Muis Congenitale spierdystrofie	Muis Congenitale spierdystrofie	Kip	Konijn Doorsnijding n. ischiadicus	Rat Immobilisatie achterpoot	Mens Ziekte van Duchenne
Onderzochte spieren	Achterpoot- spieren	Achterpoot- spieren	M. Pectoralis	Achterpoot- spieren	M. Gastrocnemius	M. Gastrocnemius M. Quadriceps M. Deltoideus
Arylsulfatase (2 Hydroxy-5-nitrofenylfosfaat)	—	4,4 ^b	6,1 ^b	—	3 ^b	—
Ribonuclease (Ribonucleïnezuur)	—	2	7,4	1,4 ^c	—	—
Cathepsine (Haemoglobine)	6,0 ^b	2,6	3,2	1,2	—	—
β-Glucuronidase (Fenolftaleïne-β-D-glucuronide)	—	2,7	6,1	—	—	—
Zure fosfatase (β-Glycerofosfaat)	—	—	—	1	—	—
(Fenylfosfaat)	1,8	—	—	1	—	—
(Dinitrofenylfosfaat)	—	—	—	1	—	—
(Nitrofenylfosfaat)	—	—	—	—	2,5	2,4 ^b
β-Glucosidase (4-Methylumbelliferyl-β-D- glucopyranoside)	—	—	—	—	4	—
N-acetyl-β-D-glucosaminidase (4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β-D-glucosaminide)	—	—	—	—	2,4	—
(Fenyl-β-D-glucosaminide)	—	—	—	—	—	4
β-Galactosidase (4-Methylumbelliferyl-β-D- galactopyranoside)	—	—	—	—	2	—

Legenda

a. Toename van enzymactiviteit = enzymactiviteit proefdier/
enzymactiviteit controle dier.

b. De enzymactiviteit werd per mg eiwit bepaald.

c. De enzymactiviteit werd uitgedrukt per gram spierweefsel x
totale gewicht van de spier.

dan het lysosomale zure fosfatase. Dit laatste isoënzym splitst naftol-AS-BI-fosfaat en β -glycerolfosfaat in sterkere mate.

Bovendien bleek uit het onderzoek van BOWERS en DE DUVE (1967) en van BOWERS (1971) op lymfklier, thymus en miltweefsel dat er twee populaties lysosomen met een verschillende samenstelling van de hydrolytische enzymen bestaan. Arylsulfatase activiteit zou hoofdzakelijk in één van de lysosomen populaties aanwezig zijn, die zich voornamelijk in de macrophagen bevindt. De andere populatie lysosomen met geringe arylsulfatase en veel cathepsine D activiteit werd voornamelijk in lymfocyten aangetoond. Indien het ontstekingsinfiltraat weinig macrophagen en veel lymfocyten bevat, dan zal er in de homogenaten een relatief geringe arylsulfatase activiteit ten opzichte van cathepsine D activiteit worden gevonden. Als in een ander stadium het aantal macrophagen toeneemt, dan zal de arylsulfatase activiteit eveneens stijgen. Dit laatste verklaart o.a. het feit dat verschillende lysosomale enzymen niet altijd op hetzelfde tijdstip na het inzetten van een proef verhoogd zijn (ZALKIN et al., 1962).

Uit het histochemisch onderzoek door MONTICONE et al., (1970) en SCARLATO en CORNELIO (1970) van spierbiopten bij patiënten met primaire myopathiën en neurogene spierziekten bleek, dat de zure fosfatase activiteit sterker was toegenomen dan de β -glucuronidase activiteit. Ofschoon de localisatie van de enzymen in bindweefsel en ontstekingsinfiltraat overeenkwam, was er subsarcolemmaal zowel zure fosfatase als β -glucuronidase activiteit, doch centraal in de spiervezels alleen zure fosfatase activiteit. Dit verschil kan op een artefact berusten, b.v. doordat tijdens de vóórfixatie een deel van de β -glucuronidase activiteit geïnactiveerd wordt, of tijdens het incuberen weglegt.

Een andere mogelijkheid is, dat we niet met een artefact te maken hebben en dat de β -glucuronidase activiteit in een deel van de lysosomen afwezig of met het gebruikte substraat niet aantoonbaar is. Uit histochemisch onderzoek van o.a. GOLDFISCHER (1965), HAYASHI (1967) en BOTS (1970), bleek dat ook in andere organen de localisatie en activiteit van de verschillende hydrolytische enzymen niet altijd overeenkwam.

Een vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek waarbij de hydrolytische enzymactiviteit werd bepaald, werd voor skeletspieren niet, doch voor andere organen wel verricht (lever, VAN DUIN et al., 1959; MEIJER en WILLIGHAGEN, 1961; macrophagen, COHN en BENSON, 1965 a en b; mammaklierweefsel, HELMINEN et al., 1968; thymus, ABRAHAM, 1969; nier, FISHMAN et al., 1969; testis en ovarium, VARUTE, 1972).

Deze auteurs gebruikten bij het histochemisch en biochemisch onderzoek voor het aantonen van één enzym verschillende substraten.

Hoewel een enzym voor ieder substraat mogelijk een andere affiniteit heeft, bleek echter dat indien bij biochemisch onderzoek een verhoogde activiteit van een bepaald enzym werd gevonden, ook bij histochemisch onderzoek een toename van de activiteit van dat enzym werd waargenomen.

DE SUBSTRAAT-SPECIFICITEIT VAN ZURE FOSFATASE
EN β -GLUCURONIDASE

Zeer veel enzymen komen in de vorm van isoënzymen voor. Van de in dit onderzoek bestudeerde enzymen zijn verreweg de meeste publicaties verschenen over de isoënzymen van zure fosfatase en β -glucuronidase. In een groot aantal organen en celsoorten van de mens en van verschillende diersoorten is de heterogeniteit van beide enzymen aangetoond. Verreweg de meeste onderzoeken zijn verricht op lever (NEIL en HORNER, 1964 a en b; LUNDIN en ALLISON, 1966; KANEKO et al., 1970; MAMELI et al., 1972), prostaat (SUR et al., 1962; OSTROWSKI en RYBARSKA, 1965; SMITH en WHITBY, 1968) en leucocyten (YU et al., 1966; LI et al., 1970 a en b; AVILA en CONVIT, 1973). In skeletspieren zijn de isoënzymen van zure fosfatase en β -glucuronidase waarschijnlijk vanwege de lage activiteit van beide enzymen nauwelijks onderzocht (BECKMAN en BECKMAN, 1967).

De heterogeniteit kan o.a. met chromatografische en elektroforetische scheidingsmethoden aangetoond worden. De isoënzymen hebben verschillende kinetische eigenschappen. Dit blijkt uit het onderzoek naar de invloed van de pH en van remmers op de activiteit van de isoënzymen. Bovendien hebben de isoënzymen een verschillende substraat-specificiteit.

Voor het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek kunnen de verschillende substraat-specificiteiten van de isoënzymen van zure fosfatase en β -glucuronidase van belang zijn, omdat bij de biochemische activiteitsbepalingen geen gebruik is gemaakt van de histochemische substraten maar van 4 methylumbelliferylesters, die zich bij uitstek lenen voor bijzonder nauwkeurige en gevoelige bepalingen.

De uiteenlopende, in hoofdstuk 1 en 2 vermelde bevindingen over de activiteiten van zure fosfatase en β -glucuronidase in skeletspieren, verkregen met verschillende substraten, maken het waarschijnlijk dat de gevonden activiteiten sterk afhankelijk zijn van het toegepaste substraat. Om deze reden is naast het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek tevens een onderzoek naar de substraat-specificiteit van zure fosfatase en β -glucuronidase verricht.

Bij dit biochemisch onderzoek zijn de activiteiten verkregen met de

4 methylumbelliferylesters, vergeleken met de activiteiten die o.a. met de enzymhistochemische substraten werden gevonden.

LI et al., (1970 a) hebben aangetoond dat de zure fosfatase isoënzym-samenstelling van leucocyten tijdens pathologische processen kan veranderen. De stapeling van macromoleculaire verbindingen in leverlysosomen van muizen veroorzaakt behalve een significante stijging van de activiteit van zure fosfatase en β -glucuronidase mogelijk eveneens een verandering in de isoënzym-samenstelling van beide enzymen (MEIJER, 1962 en 1963).

In pathologisch veranderde spieren kunnen naast normale spiervezels degenererende en regenererende spiervezels en ontstekingsinfiltraat aanwezig zijn. Bovendien is bij sommige myopathieën (b.v. de ziekte van Duchenne) de hoeveelheid bindweefsel in de spier al in een vroeg stadium van de ziekte toegenomen (BETHLEM, 1970). Bij vitamine E deficiënte konijnen is de hoeveelheid bindweefsel echter niet toegenomen (zie blz. ..).

Het ontstekingsinfiltraat (neutrofielen, lymfocyten, plasmacellen en histiocyten) en het bindweefsel hebben een veel hogere lysosomale enzymactiviteit dan normale spiercellen (WILLIGHAGEN, 1960; BOUMA, 1964; HAYASHI, 1967). Het is ook mogelijk dat in pathologisch veranderde skeletspieren de isoënzym-samenstelling van zure fosfatase en β -glucuronidase gewijzigd is. Het onderzoek naar de substraat specificiteit is om deze redenen zowel op normale als pathologisch veranderde spieren verricht.

Uit enzymhistochemisch onderzoek op lichtmicroscopisch en op electronen microscopisch niveau is gebleken, dat zure fosfatase en β -glucuronidase behalve lysosomaal ook microsomaal gelocaliseerd kan zijn (ROSENBAUM en ROLON, 1962; MAGGI et al., 1966; MAGGI en CARBONELL, 1969; FISHMAN et al., 1969; IDE en FISHMAN, 1969; SASAKI en FISHMAN, 1973; MIYAYAMA et al., 1974).

De resultaten van het enzymhistochemisch onderzoek worden gesteund door de bevindingen van het biochemisch onderzoek. NEIL en HORNER (1964 a en b), WALTER et al., (1971) en LIN en FISHMAN (1972) hebben met gefractioneerde centrifugatie technieken zure fosfatase activiteit in de microsomale fractie van de verschillende organen en celsoorten aangetoond.

IDE en FISHMAN (1969) en MAMELI et al., (1972) hebben hetzelfde eveneens voor β -glucuronidase gevonden. Met gefractioneerde centrifugatie vindt men ook zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit in het supernatant (SHIBKO en TAPPEL, 1963; YU et al., 1966). Deze oplosbare

activiteit is echter vanwege de diffusie tijdens de incubatie met de conventionele enzymhistochemische technieken niet aan te tonen.

Met de membraanmethode is dit voor cytosol enzymen echter wel mogelijk.

Uit de resultaten van bovengenoemd centrifugatie onderzoek blijkt dat de substraat specificiteit van zure fosfatase en β -glucuronidase in de diverse celfracties verschillend kan zijn.

Dit geldt ook voor de invloed van remmers op de activiteit van beide enzymen (SHIBKO en TAPPEL, 1963; VANHA-PERTTULA, 1971; LIN en FISHMAN, 1972).

Hoewel niet direct noodzakelijk voor de beantwoording van de op bladzijde 13 vermelde vraagstelling is er bovendien een oriënterend onderzoek naar de substraat specificiteit van zure fosfatase en β -glucuronidase verricht: De substraat specificiteit werd in celfracties van normale spieren en van spieren van vitamine E deficiënte konijnen bepaald. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van gefractioneerde centrifugatie, gelfiltratie en elektroforese methoden.

HOOFDSTUK 4

MATERIAAL EN METHODEN

4.1. PROEVEN MET VITAMINE E DEFICIENTE KONIJNEN

Op 40 jonge witte Nieuw-Zeeland konijnen, die in de proefdierenstal van ons laboratorium waren geboren, werden de proeven verricht. Er werden steeds 2 proefdieren in kooien van 55 x 50 cm, hoogte 52 cm gehuisvest. De temperatuur en vochtigheidsgraad in de stal werden constant gehouden.

Als de konijnen 30 dagen oud waren, werden ze van de moeder gescheiden. Dertig van deze konijnen kregen een vitamine E deficiënt dieet, 10 konijnen kregen een controle dieet (Hope Farms, Woerden).

Het vitamine E deficiënte dieet had volgens de leverancier de volgende samenstelling: zetmeel (ontsloten mais) 58,6%, cellulose 12%, caseïne 12%, soja eiwit 4%, tarwe gluten 4%, zonnebloem olie 4%, levertraan 4%, mineralen mengsel 3%, vitamine mengsel zonder vitamine E 0,2%, DL-methionine 0,2%, cystine 0,04%, selenium 0,7 mg/kg. Aan het controle dieet was bovendien 100 mg DL- α -tocoferolacetaat per kg voedsel toegevoegd. De proefdieren kregen per dag 90 gram voer en water ad libitum.

Van de 30 konijnen die met het vitamine E deficiënte dieet werden gevoed, werden er zowel na 12 als na 19 dagen 10 afgemaakt. Deze toonden de symptomen die respectievelijk in stadium 1 en 2 van vitamine E deficiëntie (TELFORD, 1971) optreden. Bij de overige 10 konijnen werd dit gedaan als ze zich niet meer konden oprichten; stadium 3 van vitamine E deficiëntie (TELFORD, 1971).

De konijnen werden een half uur voordat ze werden afgemaakt met Hypnorm (0,05 mg per kg lichaamsgewicht, intramusculair toegediend) in narcose gebracht. Door middel van arteriepunctie werd 10 ml bloed voor tocoferol en creatine fosfokinase bepaling in serum afgenomen. Vervolgens werden de m. gastrocnemius, m. soleus en m. plantaris van de rechter achterpoot en het diafragma verwijderd.

Van iedere spier werden de randen afgesneden. Het overblijvende deel, werd in reepjes van 4 tot 6 mm gesneden zoals aangegeven in figuur 1. Het meest centrale plakje A en de twee hieraan grenzende plakjes B

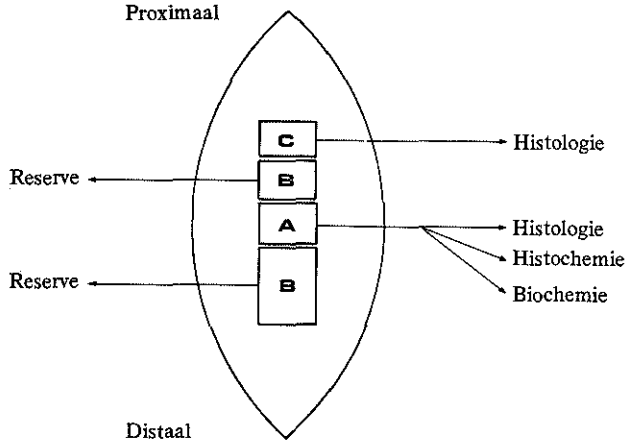


Fig. 1. Verdeling van de spier.

werden in door vloeibare stikstof gekoelde isopentaan (circa -150°C) bevroren (BETHLEM, 1970; DUBOWITZ en BROOKE, 1973).

Een aan B grenzend plakje C werd gefixeerd in de fixatievloeistof bereid volgens Susa (ROMEIS, 1968).

Het plakje A werd gebruikt voor:

- a. histologisch onderzoek: haematoxyline-eosine en perjoodzuur-Schiff kleuring (ROMEIS, 1968).
- b. histochemisch onderzoek: α -glucan fosforylase (MEIJER, 1968), myosine ATP-ase (MEIJER, 1970), succinaat dehydrogenase, NADH oxydoreductase en α -glycerolfosfaat dehydrogenase (PEARSE, 1968 en 1972; DUBOWITZ en BROOKE, 1973), zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine-naftylamidase.
- c. biochemisch onderzoek: zure fosfatase, β -glucuronidase, cathepsine, zure en neutrale maltase.

Aangezien het mogelijk was, dat tijdens het onderzoek nieuwe vraagstellingen zouden rijzen, werd extra materiaal, de plakjes B, ingevroren. De plakjes A en B werden samen in één filmkokertje bij -96°C bewaard. De plakjes B werden met oost-indische inkt gemerkt.

Opmerkingen.

Bij de beoordeling van histologische afwijkingen in de spier wordt veel waarde gehecht aan veranderingen die in de paraffine coupes worden gezien. Derhalve werden van het volgens Susa (ROMEIS, 1968) gefixeerde

spierweefsel, paraffine coupes gemaakt, waarop de haematoxyline-eosine en perjood-Schiff kleuringen (ROMEIS, 1968) werden uitgevoerd.

Aangezien de vitamine E behoefte van jonge dieren groter is dan van oudere, werd het experiment op jonge proefdieren verricht. Dit en het feit dat van iedere spier minstens 800 mg voor de histologische, histochemische en biochemische bepalingen nodig was, maakten dat kleinere dieren, zoals cavia, rat en muis minder geschikt waren voor onze proeven.

4.2. PROEVEN MET DIMETHYLPARAFENYLEENDIAMINE-DIHYDROCHLORIDE BEHANDELDE RATTEN

Uitgegaan werd van 50 mannelijke Sprague Dawley ratten van één jaar oud (Broekman, Stiphout). De ratten kregen voer in korrelvorm (Hope Farms, Woerden) en water ad libitum.

Er werden steeds 2 ratten in makrolon bakken van 37 x 27 cm en 15 cm hoogte gehuisvest. In de stal werden temperatuur en vochtigheidsgraad constant gehouden.

Veertig ratten, kregen van maandag tot en met vrijdag twee maal daags op vaste tijdstippen ('s morgens van 8.30 tot 8.45 en 's middags van 16.30 tot 16.45) 20 mg per kg lichaamsgewicht DPPD (BDH) subcutaan in de linker lichaamshelft ingespoten. Op zaterdag en zondag werd tussen 11.30 en 12.15, éénmaal 20 mg per kg lichaamsgewicht DPPD subcutaan toegediend.

De DPPD oplossing (10 mg DPPD per ml aqua dest.) werd steeds vlak vóór het inspuiten bereid. De resterende ratten vormden de controle groep. Om technische redenen konden maximaal 10 ratten worden ingezet. Van een dergelijke serie werden twee ratten als controle gebruikt; van de overige proefdieren, werden steeds 2 proefdieren na respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD behandeling met etherdamp verdoofd. Hierna werden bij iedere rat achtereenvolgens de m. biceps, m. gastrocnemius en m. rectus femoris van de rechter achterpoot verwijderd. Van iedere spier werden de randen afgesneden (zie figuur 1). De spier werd verwerkt zoals dit bij vitamine E deficiënte konijnen is beschreven.

Het zou het meest logisch zijn om als proefdiermodellen een experimenteel verwekte primaire myopathie en een neurogene spierziekte te kiezen. Uit het onderzoek van Weinstock (zie tabel 2) bleek dat bij een neurogene spierziekte in de homogenaten van de spier slechts een geringe stijging van

de activiteit van zure hydrolasen wordt gevonden. De kans dat men kan aantonen dat de toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één enzym gepaard gaat met de toename van de biochemisch bepaalde activiteit van een tweede enzym, is dan bijzonder klein. Een neurogene spierziekte bij proefdieren is derhalve als model minder geschikt, om de in de inleiding vermelde vragen te beantwoorden.

4.3. SAMENSTELLING VAN HET PATIENTEN MATERIAAL

Het onderzoek werd verricht op 84 spierbipten, die ons tussen 1 juni 1972 en 31 mei 1973 werden toegestuurd en aan de volgende voorwaarden voldeden.

- a. er was voldoende weefsel voor histochemische en biochemische bepalingen.
- b. het biopt bevatte hoogstens een matige hoeveelheid bindweefsel.
- c. de afwijkingen in de paraffine-coupees aanwezig, werden ook in de coupees van het ingevroren materiaal gezien.
- d. op het materiaal moest een diagnose gesteld kunnen worden.

Indien van discrete of van moeilijk te interpreteren afwijkingen sprake was, werd het biopt niet in ons onderzoek betrokken.

De bipten werden uit spieren genomen, die op grond van het neurologisch onderzoek zeer waarschijnlijk bij het ziekte proces betrokken waren (MIRANDOLLE, 1972).

Een gedeelte van het biopt werd in vloeistof bereid volgens Susa (ROMEIS, 1968), gefixeerd en vervolgens ingesloten in paraffine. Het overige gedeelte van het biopt werd met behulp van door vloeibare stikstof gekoelde isopentaan (circa -150° C) bevroren.

Op de paraffine coupees en de coupees van het ingevroren materiaal werden een haematoxyline-eosine kleuring en een trichroomkleuring volgens Gomori (ROMEIS, 1968; DUBOWITZ en BROOKE, 1973) verricht.

Voorts werden met histochemische methoden de activiteiten bepaald van α -glucan fosforylase (MEIJER, 1968), mitochondriale en myosine ATP-ase (MEIJER, 1970), succinaat dehydrogenase, NADH oxydoreductase en α -glycerolfosfaat dehydrogenase (DUBOWITZ en BROOKE, 1973).

Op grond van de bevindingen van het histologisch onderzoek en de bovenbeschreven enzymhistochemische bepalingen werd in 32 gevallen de diagnose normaal spierweefsel, in 30 gevallen de diagnose neurogene spierziekte en in 22 gevallen de diagnose primaire myopathie gesteld.

4.4. VOORSCHRIFTEN VAN DE TOEGEPASTE HISTOCHEMISCHE METHODEN

De activiteit van de door ons onderzochte hydrolytische enzymen werd met de door MEIJER (1972 b) en MEIJER en VLOEDMAN (1973) beschreven membraantechniek bepaald.

De incubatievaatjes werden als volgt geprepareerd: semipermeabele cellulose dialyse membranen, (Visking) diameter van de poriën 24 Å (volgens opgave van de fabrikant) werden 30 minuten geweekt in een oplossing, die 0,1 g EDTA per 250 ml aqua dest. bevatte. Hierdoor werden sporen glycerine en zware metalen verwijderd, die mogelijk in de membraan aanwezig zijn. Deze oplossing werd tweemaal ververst. De membranen werden daarna in aqua dest bewaard. De incubatievaatjes werden gemaakt, door stukjes voorbehandelde membranen van 5 x 5 cm strak om een plastic ring (diameter 3 cm, hoogte 2,5 cm) te spannen (zie figuur 2).

De zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine-naftylamidase bepalingen werden met de membraanmethode uitgevoerd. De samenstelling van de incubatiemedia en omstandigheden waaronder de reactie werd uitgevoerd staan in tabel 3 vermeld. Wanneer het incubatiemedium in het incubatievaatje gestold was, werd op de buitenzijde van de membraan, die tevoren was drooggeveegd, een coupe gebracht. Na het incuberen werd de agar verwijderd en werden de coupes 5 minuten in formaline damp nagefixeerd. De coupes en de membranen werden vervolgens uitgeknipt, op een objectglas gebracht en tenslotte met cristalliet afgedekt.

Bij de leucine-naftylamidase bepaling werden de coupes vóórdat ze werden nagefixeerd, 10 minuten in een 2,3 M kopersulfaat oplossing gebracht.

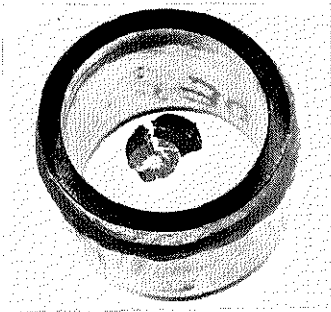


Fig. 2. Incubatievaatje met gekleurde coupes van de lever en de nier.

TABEL 3. Incubatie media histochemische bepalingen.

<i>Zure fosfatase</i>			
Naftol-AS-BI-fosfaat	20 mM	1 ml	
Veronal acetaat	0,14 M	5 ml	
NaNO ₂	0,58 M	0,8 ml x)	} 1,6 ml
Pararosaniline	4%	0,8 ml	
Aqua dest		1 ml	
Agar	4%	20 ml	
pH	5,0		
Incubatie tijd (min)	75		
Incubatie temp. (° C)	37		

<i>β-Glucuronidase</i>			
Naftol-AS-BI-β-D-glucuronide	18 mM	0,3 ml	
Natrium acetaat	0,2 M	10 ml	
NaNO ₂	0,58 M	0,3 ml	} 0,6 ml
Pararosaniline	4%	0,3 ml	
Agar	4%	10 ml	
pH	5,0		
Incubatie tijd (min)	120		
Incubatie temp. (° C)	50		

<i>Naftylesterase (E 600 resistent)</i>			
Naftylacetaat	54 mM	1 ml	
Veronalacetaat	0,14 M	5 ml	
NaNO ₂	0,58 M	0,8 ml	} 1,6 ml
Pararosaniline	4%	0,8 ml	
Agar	4%	10 ml	
pH	5,5		
Incubatie tijd (min)	90		
Incubatie temp. (° C)	37		

<i>Leucine naftylamidase</i>			
L-Leucyl-4-methoxy-naftylamide	0,25 mM	1 ml	
Natriumacetaat	0,1 M	5 ml	
Fast blue B	0,2%	5 ml	
Aqua dest		10 ml	
Agar	4%	10 ml	
pH	6,5		
Incubatie tijd (min)	90		
Incubatie temp. (° C)	37		

Legenda. x) de NaNO₂ en pararosaniline oplossing worden tevoren gemengd.

4.5. VOORSCHRIFTEN VAN DE TOEGEPASTE BIOCHEMISCHE METHODEN

4.5.1. *Algemeen*

Voor het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek werd het homogenaat als volgt bereid. Het spierbiopt werd gewogen en vervolgens fijngeknipt in een homogeniseer-medium van pH 8,2 (100 mg spierweefsel per ml homogeniseer-medium) dat tot 0° C was gekoeld. Hierin werd het spierweefsel een halve minuut bij 0° C en 300 toeren per minuut in een glazen Potter-Elvehjem homogenisator fijngewreven. Het homogeniseer-medium bevatte 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8,2), 1 mM EDTA en 5 mM MgSO₄ (OPIE en NEWSHOLME, 1967).

Vóór elk der activiteitsbepalingen werden de fracties een paar maal ingevroren en ontdooid, teneinde de membranen permeabel te maken waardoor een maximale activiteit bereikt werd.

Voor alle uitgevoerde biochemische bepalingen *) werden optimale substraatconcentratie, enzymconcentratie, pH en temperatuur gekozen. Er bestond een lineair verband tussen de extinctie respectievelijk de fluorescentie en de incubatietijd.

De enzymreacties konden met specifieke remmers worden tegengegaan. De reacties werden in duplo uitgevoerd. De activiteit van de onderzochte hydrolytische enzymen werd uitgedrukt in nmol omgezet substraat. mg weefsel⁻¹. uur⁻¹.

4.5.2. *Gefractioneerde centrifugatie*

Voor het isoënzym onderzoek werden de zure fosfatase activiteit in de mitochondriale-lysosomale en in de microsomale fracties en tevens in het supernatant van de musculus gastrocnemius van normale en vitamine E deficiënte konijnen in stadium 3 van vitamine E deficiëntie (TELFORD, 1971) bepaald.

Per gram spierweefsel werd 10 ml van een 0,25 M sucrose oplossing pH 7,5 toegevoegd. Hierna werd het weefsel met behulp van een „tissue chopper” (volgens McIlwain) in vele richtingen versneden.

Vervolgens werd het weefsel in een glas-glashomogenisator met een speling van 0,10 mm bij 0° C fijngewreven. Hierbij werd de stamper

*) De optimale condities voor de meeste bepalingen in skeletspierweefsel werden door A. H. T. Vloedman en Mej. E. C. Sleyster als werkstuk voor hun H.B.O. B-examen bepaald, vóórdat met dit onderzoek werd begonnen.

10 x langzaam op en neer bewegen. Na het homogeniseren werd de suspensie over een verbandgaasje gefiltreerd, waarna het centrifugeren volgens onderstaand schema (SHIBKO en TAPPEL, 1963) plaats vond.

10 minuten	600 x g kernfractie.
30 minuten	18000 x g mitochondriale-lysosomale fractie.
60 minuten	105000 x g microsomale fractie.

Het overblijvende supernatant is de oplosbare fractie.

Zowel de kern, de mitochondriale-lysosomale als de microsomale fracties werden in de sucrose oplossing gesuspenseerd en nogmaals gecentrifugeerd. Het supernatant werd telkens bij de volgende fractie gevoegd.

De kernfractie werd niet gebruikt. De mitochondriale-lysosomale en de microsomale fracties werden in 2 ml sucrose oplossing gesuspenseerd. Het mitochondriale enzym barnsteenzuur dehydrogenase en het glucose-6-fosfatase dat zich voornamelijk in de microsomen bevindt (LIN en FISHMAN, 1972) werden als marker enzymen gekozen.

De barnsteenzuur dehydrogenase activiteit werd volgens NEUFELD et al., (1954), de glucose-6-fosfatase activiteit werd volgens NORDLIE en ARION (1966) bepaald.

4.5.3. Gelfiltratie

De activiteit van zure fosfatase is in de musculus gastrocnemius afkomstig van normale konijnen en van konijnen in stadium 1 en 3 van vitamine E deficiëntie onderzocht.

Tevens is de activiteit van zure fosfatase in leucocyten van een normaal konijn bepaald.

a. Verwerking van het materiaal.

Direct na het uitsnijden werd het spierweefsel ingevroren in door vloeibare stikstof gekoelde isopentanaan. Het morfologisch onderzoek (haematoxyline-eosine kleuring) werd op een klein gedeelte van de weefselstukjes verricht. Tevens werd de activiteit van zure fosfatase enzymhistochemisch bepaald.

Per gram ontdooid spierweefsel werd 5 ml aqua dest toegevoegd waarin het weefsel werd fijngeknipt en vervolgens met een glazen Potter-Elvehjem homogenisator bij 0° C gehomogeniseerd.

Het homogenaat werd vervolgens gedurende 1 uur bij 15000 x g gecentrifugeerd. Teneinde de enzymactiviteit te concentreren werd het supernatant

gevriesdroogd en vlak voor toepassing van de gelfiltratie opgelost in $\frac{1}{18}$ deel van het oorspronkelijke volume.

Voor dit laatste werd een 0,01 M Tris-HCl buffer pH 7,2 gebruikt.

De leucocyten werden volgens de sedimentatie methode van WYSS et al., (1971) geïsoleerd. Hiervoor werd 1 volume deel gehepariniseerd bloed gemengd met 2 volume delen van een oplossing bestaande uit een 3% dextraan (gemiddeld molecuulgewicht 250000) opgelost in 0,9% NaCl. Na 90 minuten waren de erythrocyten gesedimenteerd. De bovenstaande vloeistof waarin zich de leucocyten bevonden werd van de erythrocyten afgepipeteerd. De eventueel in de leucocyten suspensie aanwezige erythrocyten werden gelyseerd met een waterige oplossing bevattende 0,16 M NH_4Cl , 0,001 M KHCO_3 , 0,005 M glucose en 0,5% albumine. Aan de leucocyten suspensie afkomstig uit 100 ml bloed werd 1 ml 0,01 M Tris-HCl buffer pH 7,2 toegevoegd. Vlak voor toepassing van de gelfiltratie werd de suspensie enige malen ingevroren en ontdooid en vervolgens 1 uur gecentrifugeerd (15000 x g) teneinde membraanmateriaal te verwijderen.

b. De isoënzymseparatie.

De isoënzymen van zure fosfatase werden met een met Sephadex G 200 — normale korrelgrootte (Pharmacia) — gevulde kolom gescheiden. De doorsnede van deze kolom bedroeg 16 mm, de hoogte was 245 mm. De Sephadex G 200 was geëquilibreerd met een 0,01 M Tris-HCl buffer pH 7,2 waaraan 0,05 M NaCl was toegevoegd (FILBURN, 1973).

Een monster van 1 ml afkomstig van de spierextracten of de leucocyten werd geëluëerd met de bovenstaande bufferoplossing met een snelheid van $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ en met behulp van een fractie-verzamelaar in fracties van 1,25 ml opgevangen.

De moleculairgewichtsbepaling werd verricht volgens ANDREWS (1967) en FILBURN (1973).

Deze bepalingen werden op Sephadex G 200 kolommen uitgevoerd met dextraan blauw 2000; albumine (Sigma) mol. gew. 67.000; chymotrypsinogeen (Sigma) mol. gew. 25.000; ovalbumine (Sigma) mol. gew. 45.000; soyabonen trypsine remmer (BDH) mol. gew. 21.500 en cytochroom C (Sigma) mol. gew. 12.400 *). De elutiesnelheid was gelijk aan die welke bij gelfiltratie van de spier- en leucocyten preparaten werd toegepast. De fracties bedroegen 1 ml.

*) De gelfiltratie en electroforese experimenten zijn door C. M. van der Loo verricht als werkstuk voor het H.B.O. B-examen.

De eiwit concentratie van het elutiepatroon werd met behulp van een recorder van een LKB Uvicord 8300 (E 284) afgelezen. Om de specifieke activiteiten van de verschillende isoënzymen te kunnen vergelijken werd van de verschillende fracties het eiwitgehalte bepaald met de methode van LOWRY et al., (1951).

4.5.4. *Electroforese*

Voor de scheiding van de isoënzymen van zure fosfatase werd de polyacrylamide gel techniek van DUBOIS en TURPIN (1974) toegepast. De gel bestond uit 7,5% polyacrylamide in 0,5 M natriumacetaat buffer pH 2,7. De technieken voor het kleuren van de zure fosfatase banden waren ontleend aan de histochemie (a) en de biochemie (b).

- a. 50 mg naftol-AS-BI-fosfaat, opgelost in 1 ml N,N dimethylformamide werd met 46,5 ml 0,05 M natriumacetaat buffer pH 5,2 gemengd. Daarbij werd 2,5 ml van een oplossing bestaande uit 1,25 ml 3,7% natriumnitriet in aqua bidest en 1,25 ml 3,7% pararosaniline in 2 N HCl gevoegd. De pH van het totale mengsel werd op pH 5,2 bijgesteld. De incubatietijd bedroeg 2 uur bij 37° C.
- b. 50 mg 4-methylumbelliferylfosfaat werd in 50 ml 0,05 M natriumacetaat buffer opgelost. De incubatietijd bedroeg 15 min. bij 37 °C. Het bij de reactie gevormde 4-methylumbelliferon kon zichtbaar gemaakt worden door fluorescentie met een U.V. lamp in een sterk basisch milieu, verkregen met ammoniak damp.

4.5.5. *Biochemische enzymbepalingen in spierweefsel*

ZURE FOSFATASE

De zure fosfatase activiteit werd spectrofluorimetrisch met 4-methylumbelliferylfosfaat (ROBINSON en WILLCOX, 1969) en met naftol-AS-BI fosfaat (modificatie van de methode van VERITY en BROWN, 1964 a) en spectrofotometrisch met p-nitrofenylfosfaat (BERGMEYER, 1974) bepaald.

- a. met 4-methylumbelliferylfosfaat als substraat.

Het incubatiemedium bevatte 60 µl buffer-substraatoplossing (0,001 M 4-methylumbelliferylfosfaat opgelost in 0,05 M natriumacetaat buffer pH 5,0), 5 µl verzadigde digitonine oplossing (5 mg digitonine per ml) en 20 µl homogenaat.

Er werd bij 37° C geïncubeerd. De incubatietijden varieerden van 5 tot 20 minuten.

Aangezien het substraat in zuur milieu niet stabiel is, werden de homogenaatblanco bepalingen (die in plaats van homogenaat aqua dest. bevatten), op twee tijdstippen (na 10 en 20 minuten) gestopt. De reactie werd gestopt door toevoeging van 2 ml 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4 van 0° C. Hierna werd gecentrifugeerd (3000 r.p.m. gedurende 5 minuten).

Bij een pH hoger dan 10 is de fluorescentie van het 4-methylumbelliferon optimaal, de excitatie en emissie golflengten van deze stof zijn respectievelijk 365 en 448 nm.

De fluorescentie werd geijkt met 4-methylumbelliferon in 2 ml 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4. De concentratie van de 4-methylumbelliferon werd gevarieerd van 1 tot 200 nm. De fluorescentie werd afgelezen tegen 2 ml 0,5 M glycine-NaOH buffer. De ijkingcurve waarbij de 4-methylumbelliferon concentratie werd uitgezet tegen de fluorescentie was lineair.

b. met naftol-AS-BI-fosfaat als substraat.

De buffersubstraat oplossing bevatte 0,01 M naftol-AS-BI-fosfaat, dat eerst in 0,25 ml dimethylformamide werd opgelost, waarna 0,1 M natriumacetaat buffer pH 5,0 werd toegevoegd. Bij deze dimethylformamide concentratie trad geen remming van zure fosfatase (en evenmin van het hierna te bespreken β -glucuronidase) op.

Het incubatiemedium bevatte 60 μ l buffersubstraat oplossing, 5 μ l verzadigde digitonine oplossing en 20 μ l homogenaat.

De reactie werd in principe op dezelfde wijze als de bepaling met 4-methylumbelliferylfosfaat uitgevoerd. Er werd bij 37° C bij tijden variërend van 0 tot 40 minuten geïncubeerd.

De excitatie en emissie golflengten van het gevormde naftol-AS-BI zijn 410 en 520 nm.

De fluorescentie werd geijkt met oplossingen van naftol AS-BI met een concentratie van 10 tot 100 mM in 2 ml 0,5 glycine-NaOH buffer pH 10,4. De fluorescentie van deze oplossingen werd afgelezen tegen 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4. De ijkingcurve waarbij de naftol-AS-BI fosfaat concentratie werd uitgezet tegen de fluorescentie was lineair.

c. met p-nitrofenylfosfaat als substraat.

De toegepaste buffersubstraat oplossing bevatte 0,05 M p-nitrofenylfosfaat opgelost in 0,05 M natriumacetaat-buffer pH 5,0.

Het incubatiemedium bestond uit 1 ml buffersubstraat oplossing waaraan

20 μ l homogenaat en 5 μ l verzadigde digitonine oplossing waren toegevoegd.

De incubatietijden bedroegen 15, 30, 45 en 60 minuten bij een incubatie temperatuur van 37° C.

De homogenaat blanco bepalingen zijn na 30 en 60 minuten gestopt. De reacties werden gestopt door toevoeging van 4 ml 0,1 N NaOH.

Na centrifugatie (3000 r.p.m. gedurende 5 minuten) werd in het supernatant de extinctie bij een golflengte van 405 nm bepaald.

Bij het isoënzym onderzoek werd de invloed van de remmers NaF en DL tartraat op de zure fosfatase activiteit in de verschillende celfracties, verkregen na centrifugatie, nagegaan (SHIBKO en TAPPEL, 1963). De NaF concentraties in de media met respectievelijk 4-methylumbelliferylfosfaat, naftol AS-BI-fosfaat en p-nitrofenylfosfaat waren respectievelijk 0,001 M, 0,001 M en 0,002 M. De Na (DL)-tartraat concentraties bedroegen respectievelijk 0,02 M, 0,01 M en 0,005 M.

β -GLUCURONIDASE

De β -glucuronidase activiteit werd spectrofluorimetrisch met 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MEAD et al., 1955) en met naftol-AS-BI- β -D-glucuronide (modificatie van de methode van VERITY en BROWN, 1964 b) bepaald.

a. met 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide als substraat.

Het incubatiemedium bevatte 60 μ l 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide opgelost in 0,1 M natriumacetaatbuffer pH 4,0, 5 μ l verzadigde digitonine oplossing en 20 μ l homogenaat oplossing.

Er werd gedurende 40 minuten bij 37° C geïncubeerd.

b. met naftol-AS-BI- β -D-glucuronide als substraat.

Het incubatiemedium bestond uit 60 μ l 0,01 M naftol-AS-BI- β -D-glucuronide, 5 μ l verzadigde digitonine oplossing en 20 μ l homogenaat oplossing.

Er werd bij tijden variërend van 0 tot 40 minuten bij 37° C geïncubeerd.

CATHEPSINE

De cathepsine bepaling (substraat haemoglobine) is een modificatie van de methode van ANSON (1937), waarbij door ons de hoeveelheid vrij tryptofaan en tryptofaan bevattende oligopeptiden spectrofluorimetrisch werden bepaald. Bij deze methode wordt niet alleen cathepsine D activiteit

gemeten. Het haemoglobine wordt ook door cathepsine B gesplitst (BARRETT, 1969; OTTO, 1971).

Het incubatiemedium bevatte 40 μ l 2% haemoglobine (opgelost in 0,1 M natriumacetaat buffer pH 4,0), 5 μ l 1% triton X-100 en 20 μ l homogenaatoplossing.

Er werd gedurende 40 minuten bij 37° C geïncubeerd.

De reactie werd met 4% trichloorazijnzuur gestopt. Na centrifugeren werd aan 0,25 ml van het supernatant 1,75 ml 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4 toegevoegd, waarna de hoeveelheid tryptofaan spectrofluorimetrisch werd bepaald. De excitatie en emissie golflengten waren 287 en 384 nm.

De fluorescentie werd geïjkt met oplossingen van 0,1-20 nmol tryptofaan in 2 ml 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4 oplossingen, waarvan de fluorescentie ten opzichte van de 0,5 M glycine-NaOH buffer pH 10,4 werd gemeten. De ijkingscurve waarbij de tryptofaan concentratie werd uitgezet tegen de fluorescentie was lineair.

ZURE EN NEUTRALE MALTASE

De zure en neutrale maltase bepaling werd volgens KOSTER et al., (1972) uitgevoerd. Bij deze methode wordt maltose eerst door zure en neutrale maltase respectievelijk bij pH 6,5 en 4,0 in glucose gesplitst. Vervolgens wordt het glucose spectrofotometrisch bepaald.

Het incubatie medium bevatte 0,05 ml 28 mM maltase (opgelost in 0,1 M natriumacetaat buffer pH 4,0 of 6,5) en 0,05 ml homogenaat.

Er werd op verschillende tijdstippen tussen 0 en 120 minuten bij 37° C geïncubeerd.

Na denatureren en centrifugeren (3000 r.p.m. gedurende 5 minuten) werd op het supernatant de glucose bepaling verricht. Hierbij werd aan 0,5 ml van het supernatant, 0,5 ml aqua dest. en 2 ml NaH_2PO_4 buffer pH 7,4 waarin 0,2 mg glucose-oxydase, 0,01 mg peroxydase en 0,1 mg O-dianisidine-dihydrochloride was opgelost, toegevoegd en vervolgens werd gedurende 60 minuten bij 37° C geïncubeerd.

De extinctie werd bij 440 nm gemeten.

4.5.6. Biochemische bepalingen in konijnenserum

TOCOFEROL BEPALING

Het tocoferol gehalte in het serum werd volgens DUGGAN (1959) bepaald. Bij deze methode werd na het extraheren van het tocoferol met hexaan, de hexaan oplossing met alcohol verdund. Het tocoferol gehalte werd in deze laatste oplossing spectrofluorimetrisch bepaald.

De procedure was als volgt: 0,5 ml serum, 0,5 ml aqua dest. en 1,0 ml alcohol 100% werden gemengd. Vervolgens werd 2,0 ml watervrije hexaan toegevoegd. Na uitschudden, waarbij 2 lagen ontstonden werd van de bovenste laag (hexaan) 1 ml in een andere buis overgebracht en met 3 ml alcohol 100% gemengd.

De bepaling werd ook op een blanco en een standaard oplossing uitgevoerd, deze laatste bevatte 0,5 ml serum waaraan 5 µg tocoferol was toegevoegd.

In de met 3 ml alcohol 100% verdunde oplossingen werd de hoeveelheid tocoferol spectrofluorimetrisch bepaald. De excitatie en emissie golflengten bedroegen 250 en 340 nm.

Het tocoferolgehalte werd berekend met de formule

$$\frac{x}{x + 5} = \frac{fl_x - fl_{bl}}{fl_{x+5} - fl_{bl}}$$

waarin x het tocoferol gehalte in het serum is en fl_{bl} , fl_x en fl_{x+5} respectievelijk de gemeten fluorescentie van de blanco, het serum en het serum waaraan 5 µg tocoferol is toegevoegd zijn.

Het tocoferol gehalte werd uitgedrukt in µg per ml.

Bij deze bepaling werd alleen vrij tocoferol aangetoond (DUGGAN, 1959). Deze onderzoeker vond in plasma geen of zeer weinig veresterd tocoferol ten opzichte van het vrije tocoferol. Voorts wordt bij deze methode naast het (vrije) α tocoferol ook β en γ tocoferol bepaald. Het tocoferol heeft hiervan de hoogste biologische activiteit (JOFFE en HARRIS, 1943; HARRIS et al., 1944; BUNYAN et al., 1961) en komt bovendien in veel grotere hoeveelheden dan β en γ tocoferol voor (GOODMAN en GILMAN, 1965).

De activiteit van creatine kinase in serum werd in het biochemisch laboratorium (Hoofd: Dr. A. A. Willebrands) van de cardiologische kliniek (Hoofd: Prof. Dr. D. Durrer) volgens NUTTAL en WEDIN (1966) bepaald.

De chemicaliën voor het biochemisch en histochemisch onderzoek waren van de hoogste zuiveringsgraad. 4-Methylumbelliferylfosfaat, 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide en maltose werden geleverd door B.D.H. (Poole, Engeland). De verschillende histochemische substraten en haemoglobine werden geleverd door Sigma (St. Louis, U.S.A.). Glucose-oydase, peroxydase en o-dianisidine-dihydrochloride werden geleverd door Boehringer (Mannheim, W.-Duitsland). Cristaliet werd geleverd door

E. Gurr (Londen, Engeland). De overige reagentia door Merck (Darmstadt, W.-Duitsland).

4.6. BEWERKING VAN DE WAARNEMINGEN

4.6.1. *Bewerking van de waarnemingen in de coupes van spierbiopten van de proefdieren*

VAN WIJNGAARDEN (1962) en MIRANDOLLE (1972), gaven de afwijkingen in de coupes van de spierbiopten, afkomstig van patiënten met spierziekten semikwantitatief weer.

Bij het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven, werd voor het vermelden van de resultaten van het histologisch en histochemisch onderzoek eveneens van een semikwantitatieve methode gebruik gemaakt. In de met haematoxyline en eosine gekleurde coupes (van het ingevroren materiaal) gingen wij het voorkomen na van:

- a. hyaliene veranderingen in spiervezels;
- b. flocculaire veranderingen in spiervezels,
- c. spiervezels, waarvan het cytoplasma zwakker of even sterk met eosine kleurde als normale spiervezels,
- d. regenererende spiervezels,
- e. granulocyten, lymfocyten, plasmacellen en histiocyten ongeacht of deze zich in of buiten de spiervezels bevonden.

Indien deze afwijkingen niet, weinig, matig veel, veel of zeer veel in de coupes voorkwamen, werd dit respectievelijk weergegeven met de graden 0, 1, 2, 3 en 4.

In de coupes waarin met histochemische methoden, de activiteit van hydrolytische enzymen werd bepaald, werd de toename van het gekleurde neerslag in spiervezels en het voorkomen van het gekleurde neerslag in bindweefsel en ontstekingsinfiltraat semikwantitatief weergegeven. Wij onderscheidden een korrelig of een in grove brokken aanwezig kleurneerslag en een diffuus kleurneerslag. Indien geen, geringe, matige, sterke of zeer sterke toename van het kleurneerslag in spiervezels werd gezien, werd dit respectievelijk weergegeven met de graden 0, 1, 2, 3, en 4. Voorts gingen wij het voorkomen van de hoeveelheid kleurneerslag in de coupe, dat zich in het ontstekingsinfiltraat bevond, na. Een ontbrekende, geringe, matige, grote en zeer grote hoeveelheid kleurneerslag werd respectievelijk aangegeven met de graden 0, 1, 2, 3 en 4.

Het bleek, dat de hoeveelheid bindweefsel in epimysium en endomysium bij de konijnen die vitamine E deficiënt diët kregen en bij de met DPPD

behandelde ratten, niet was toegenomen. Indien geen bindweefsel in de coupe aanwezig was, werd dit aangegeven met graad 0. Indien er weinig bindweefsel was, werd dit weergegeven met een 1.

Voorts werd nagegaan of de afwijkingen, die in de coupes van het volgens Susa gefixeerde materiaal voorkwamen, ook in de coupes van het ingevroren materiaal konden worden aangetoond.

4.6.2. *Bewerking van de waarnemingen in de coupes van spierbiopten van de patiënten*

De waarnemingen in de coupes van spierbiopten afkomstig van patiënten en proefdieren werden in principe op dezelfde wijze weergegeven, zie paragraaf 4.6.1.

In de met haematoxyline en eosine gekleurde coupes van het ingevroren materiaal gingen wij het voorkomen van pathologische veranderingen in de spiervezels (ongeacht de aard van de afwijkingen), ontstekingsinfiltraat en bindweefsel na. Indien geen, een gering aantal, een matig aantal, veel of zeer veel spiervezels met pathologische veranderingen werden gezien, werd dit respectievelijk weergegeven met de graden 0, 1, 2, 3 en 4. De gradering van 0 tot en met 4 werd toegepast voor de hoeveelheid bindweefsel en de toename van het ontstekingsinfiltraat.

Indien in de spiervezels respectievelijk een geringe, een matige, een sterke of een zeer sterke toename van de zure fosfatase activiteit werd aangetoond, werd dit respectievelijk aangegeven met de graden 1, 2, 3 en 4.

De gradering 0 tot en met 4 werd ook gebruikt om de hoeveelheid kleur-neerslag in de coupes, die zich in het ontstekingsinfiltraat en bindweefsel bevond, aan te geven.

4.7. STATISTISCHE BEWERKING VAN DE WAARNEMINGEN

Bij het statistisch onderzoek trachten wij in de eerste plaats aan te tonen, dat de activiteit van lysosomale enzymen in spierbiopten van vitamine E deficiënte konijnen, of van ratten die DPPD kregen, of in spierbiopten van patiënten met spierziekten was toegenomen.

De nulhypothese luidde: de activiteit van lysosomale enzymen is in spierbiopten van behandelde (vitamine E deficiënt dieet of toediening van DPPD) proefdieren, of bij patiënten met spierziekten niet hoger dan in de controle groepen.

De alternatieve hypothese luidde: de activiteit van lysosomale enzymen is in spierbiopten van behandelde proefdieren of patiënten met spierziekten hoger dan in de controle groepen.

Men kan de kans berekenen dat de nulhypothese juist is.

Als beslissingsregel neemt men dat de nulhypothese wordt verworpen indien de gevonden kans kleiner is dan een tevoren gekozen waarde α . Bij dit onderzoek was α 0,05.

De kans dat de nulhypothese verworpen wordt terwijl deze juist is, (dit wordt een fout van de eerste orde genoemd), is kleiner dan α .

Voorts kan men de nulhypothese ten onrechte niet verwerpen, dit wordt een fout van de tweede orde genoemd. De kans op een fout van de tweede orde wordt hoofdzakelijk bepaald door het aantal waarnemingen en de verschillen tussen de steekproeven. Een groot aantal waarnemingen en grote verschillen tussen de steekproeven verminderen de kans op een fout van de tweede orde.

In de tweede plaats werd met de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman (DE JONGE, 1963) onderzocht of een toename van de activiteit van één enzym eveneens gepaard ging met een toename van de activiteit van een tweede enzym.

De rangcorrelatiecoëfficiënt kan variëren van $+ 1$ tot $- 1$.

Een rangcorrelatiecoëfficiënt van $+ 1$ wijst op veel samenhang tussen de variabelen, dat wil zeggen dat indien één variabele is toegenomen, de tweede variabele eveneens is gestegen.

Een rangcorrelatiecoëfficiënt van $- 1$ betekent dat wanneer één variabele toeneemt, de andere variabele afneemt.

Alle tussen $+ 1$ en $- 1$ liggende waarden wijzen op een minder duidelijke samenhang tussen de variabelen. Men kan hierover de volgende uitspraken doen.

- a. een rangcorrelatiecoëfficiënt groter dan 0,70 wijst op veel samenhang tussen de variabelen.
- b. een rangcorrelatiecoëfficiënt tussen 0,40 en 0,70 wijst op tamelijk veel samenhang tussen de variabelen.
- c. een rangcorrelatiecoëfficiënt kleiner dan $+ 0,25$ en groter dan $- 0,25$ wijst op weinig samenhang tussen de variabelen.

Wanneer bij paarsgewijze vergelijking zowel voor de variabelen x en y als voor de variabelen y en z een rangcorrelatiecoëfficiënt van minimaal 0,85 wordt gevonden, dan is de conclusie gerechtvaardigd, dat er een duidelijke samenhang tussen de variabelen, x , y en z bestaat.

Omdat de hypothesen, die bij het spieronderzoek van konijnen, ratten en patiënten werden getoetst niet precies gelijk waren, zullen de te onderzoeken hypothesen voor ieder spieronderzoek afzonderlijk in detail worden besproken. Alle toegepaste statistische methoden worden o.a. door DE JONGE (1963) vermeld.

Bij het biochemisch onderzoek van het konijnenserum werden de volgende hypothesen getoetst:

1. Hypothese: Het tocoferolgehalte is bij vitamine E deficiënte konijnen en bij controle konijnen gelijk.
Alternatieve hypothese (A_1): Het tocoferolgehalte is bij vitamine E deficiënte konijnen afgenomen.
2. Hypothese: De creatine kinase activiteit is bij vitamine E deficiënte konijnen en bij controle konijnen gelijk.
Alternatieve hypothese (A_2): De creatine kinase activiteit is bij vitamine E deficiënte konijnen hoger dan bij controle konijnen.
Deze laatste 4 hypothesen werden met Terpstra's trendtoets getoetst (zie tabel 4).

De volgende hypothesen worden bij het histochemisch en biochemisch spieronderzoek van konijnen getoetst.

1. Hypothese: De enzymactiviteit is in spierbiopten bij vitamine E deficiënte konijnen en bij controle konijnen gelijk.
Alternatieve hypothese: De enzymactiviteit is in spierbiopten ten gevolge van vitamine E deficiëntie gestegen.
Deze hypothesen werden met Terpstra's trendtoets getoetst.
2. Hypothese (H): De enzymactiviteit is in twee opeenvolgende stadia gelijk.
Alternatieve hypothese (A): De enzymactiviteit is in spierbiopten in het laatste van twee opeenvolgende stadia hoger.
Deze hypothesen werden eenzijdig met de tweestekproeven toets van Wilcoxon getoetst (zie tabel 6).
3. Hypothese: De enzymactiviteit is in biopten van een rode spier (m. soleus) en in die van een witte spier (m. plantaris) in gelijke mate toegenomen.
Alternatieve hypothese: De enzymactiviteit is in biopten van een rode spier en in die van een witte spier niet in gelijke mate toegenomen.

Voor het toetsen van deze hypothesen werd voor de resultaten van het biochemisch onderzoek de k-steekproeventoets van Kruskal en Wallis toegepast.

Bij de statistische bewerking van de resultaten van het histochemisch onderzoek werd de kans geschat, dat de enzymactiviteit in een rode en een witte spier gelijk is. Indien deze kans kleiner dan 0,05 was, werd aangenomen dat de activiteit in een rode en een witte spier niet in gelijke mate verhoogd was.

Met behulp van de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman (zie tabel 7 en 9) werd nagegaan:

- a. of uit histochemisch onderzoek blijkt dat de activiteitstoename van één enzym gepaard gaat met een toename van de activiteit van een tweede enzym.
- b. een dergelijke correlatie ook bij het biochemisch onderzoek kan worden aangetoond.
- c. er een samenhang bestaat tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek.

Bij de trendtoets van Terpstra en de tweesteekproeventoets van Wilcoxon bestonden de steekproeven uit 10 gelijknamige spieren, bijvoorbeeld 10 muscoli gastrocnemii van konijnen die in eenzelfde stadium waren afgemaakt. Voor het correlatie onderzoek bestonden de steekproeven uit 40 gelijknamige spieren; alle stadia werden tezamen genomen.

Bij het histochemisch en biochemisch spieronderzoek van ratten werden de volgende hypothesen getoetst.

1. Hypothese: De enzymactiviteit is in spierbiopten bij de groepen die 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD kregen gelijk aan de controle groep.
Alternatieve hypothese: De enzymactiviteit is in spierbiopten bij minstens één van de groepen, ratten die respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD kregen, hoger dan bij de controle groep.
Deze hypothesen werden met de k-steekproeventoets van Kruskal en Wallis getoetst.
2. Hypothese (H): De enzymactiviteit is in twee opeenvolgende groepen (namelijk controle groep en groepen met respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD behandeling) gelijk.
Eerste alternatieve hypothese (A): De enzymactiviteit is in de laatste van twee opeenvolgende groepen hoger (dan in de groep die hieraan voorafgaat).

Tweede alternatieve hypothese (a): De enzymactiviteit is in de laatste van twee opeenvolgende groepen lager (dan in de groep die hieraan voorafgaat).

De hypothesen werden met de tweestekproeven toets van Wilcoxon getoetst (zie tabel 14).

De laatste 3 hypothesen werden voor ieder enzym afzonderlijk per groep (controle groep en groepen die respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD kregen) voor m. biceps femoris, m. gastrocnemius en m. rectus femoris afzonderlijk getoetst.

Met behulp van de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman (zie tabel 15 en 17) werd nagegaan of er:

- a. een samenhang bestaat tussen de toename van de activiteit van twee enzymen indien deze met histochemische technieken wordt bepaald.
- b. een samenhang bestaat tussen de toename van de activiteit van twee enzymen indien deze met biochemische methoden wordt bepaald.
- c. een correlatie bestaat tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek.

De correlaties werden voor m. biceps femoris, m. gastrocnemius en m. rectus femoris afzonderlijk nagegaan. De steekproeven bestonden uit 50 gelijknamige spieren, alle stadia werden tesamen genomen.

Bij het biochemisch spieronderzoek van patiënten werden de volgende hypothesen getoetst.

1. Hypothese: Bij de controle groep(en) is de enzymactiviteit in de spierbiopten van patiënten die jonger dan 10 jaar waren en van patiënten ouder dan 10 jaar gelijk.

Alternatieve hypothese: Bij de controle groep(en) is de enzymactiviteit in de spierbiopten van patiënten die jonger dan 10 jaar waren en van patiënten ouder dan 10 jaar niet gelijk.

Deze hypothesen werden met de tweestekproeven toets van Wilcoxon getoetst.

Aangezien uit het onderzoek van KAR en PEARSON (1972 a en b) bleek, dat de biochemisch bepaalde activiteit van zure hydrolasen alleen verhoogd was in spierbiopten met matige of ernstige afwijkingen, werden bij ons statistisch onderzoek alleen dergelijke gevallen bewerkt. Wij spraken van matige, respectievelijk ernstige afwijkingen, indien bij histochemisch onderzoek matige, respectievelijk veel zure fosfatase activiteit in de coupes werd aangetoond.

2. Hypothese (H_1): De enzymactiviteit is in spierbiopten met matige of ernstige afwijkingen, (afkomstig van patiënten met neurogene spierziekten of primaire myopathieën) niet hoger dan bij de controle groep.

Alternatieve hypothese (A_1): De enzymactiviteit is in spierbiopten met matige of ernstige afwijkingen, (afkomstig van patiënten met neurogene spierziekten of primaire myopathieën) hoger dan bij de controle groep.

Deze hypothesen werden voor ieder enzym afzonderlijk bij de volgende groepen met matige of ernstige afwijkingen getoetst:

- a. spierbiopten met neurogene afwijkingen zonder myogene component,
- b. spierbiopten met neurogene afwijkingen met een myogene component,
- c. spierbiopten van patiënten, jonger dan 10 jaar met de ziekte van Duchenne,
- d. spierbiopten van de overige patiënten met een primaire myopathie.

Er werd gebruik gemaakt van de tweestekproefentoets van Wilcoxon (zie tabel 21).

Met behulp van de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman werd het volgende nagegaan:

- a. gaat een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één enzym gepaard met een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van een tweede enzym.
- b. gaat een toename van de histochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit in spiervezels samen met een toename van de biochemisch bepaalde hydrolytische enzymactiviteit.

Wij onderzochten of beide correlaties bij een steekproef bestaande uit *alle* biopten van patiënten die ouder dan 10 jaar waren en bij een steekproef bestaande uit *alle* biopten van patiënten die jonger dan 10 jaar waren konden worden aangetoond. Voorts werd nagegaan, of de laatste correlatie ook kon worden aangetoond, als de steekproef *alleen* uit biopten van patiënten jonger dan 10 jaar met een primaire myopathie, bestond.

HOOFDSTUK 5

EEN VERGELIJKING TUSSEN DE HISTOCHEMISCH EN BIOCHEMISCH BEPAALDE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN VERSCHILLENDE SKELETSPIEREN VAN VITAMINE E DEFICIENTE KONIJNEN

5.1. ALGEMEEN

In de eerste plaats is nagegaan, of er sprake was van vitamine E deficiëntie. Aangezien het tocoferolgehalte in het serum bij de controle groep significant hoger was dan bij de overige groepen (tabel 4), kon aangenomen worden dat deze laatste groepen een vitamine E deficiënt dieet hebben gekregen. Hiervoor pleit tevens de stijging van de creatine kinase activiteit. (WASSERMAN en TAYLOR, 1972).

TABEL 4. Tocoferol gehalte en creatine kinase activiteit in sera van de konijnen.

	<i>Tocoferol</i>	<i>Creatine kinase</i>
Groep 1 n = 10	*13,0 ± 3,9	*360 ± 210
Groep 2 n = 10	3,8 ± 2,2	1350 ± 620
Groep 3 n = 10	2,6 ± 2,0	> 2900
Groep 4 n = 10	3,5 ± 1,5	> 2500
Resultaat van Terpstra's trendtoets.	A ₁	A ₂

Legenda

Groep 1 = controle groep.

Groep 2, 3 en 4 zijn konijnen met respectievelijk 12, 19 dagen vitamine E deficiënt dieet en de restgroep.

Het tocoferolgehalte is uitgedrukt in $\mu\text{g. ml serum}^{-1}$.

De activiteit van creatine kinase is uitgedrukt in $\mu\text{mol omgezet substraat L serum}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

* = gemiddelde met standaard deviatie.

n = aantal waarnemingen.

A₁ = Het tocoferolgehalte is bij de controle groep hoger dan bij de vitamine E deficiënte proefdieren.

A₂ = De creatine kinase activiteit is bij de controle groep lager dan bij de vitamine E deficiënte proefdieren.

5.2. HISTOLOGISCH EN HISTOCHEMISCH ONDERZOEK

Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit in verschillende skeletspieren van vitamine E deficiënte konijnen

De bevindingen van het histologisch en het histochemisch onderzoek, die in tabel 5 zijn samengevat, zijn voor alle spieren in grote lijnen gelijk. Derhalve kan verder worden volstaan met het bespreken van de resultaten van één spier. Hiervoor werd de m. gastrocnemius gekozen.

In de controle groep werden in de haematoxyline eosine coupes van het ingevroren materiaal en van het volgens Susa gefixeerde materiaal geen afwijkingen gevonden. In de spiervezels was subsarcolemmaal een geringe zure fosfatase en E 600 resistente naftylesterase activiteit aanwezig. In de spiervezels was geen β -glucuronidase of leucine naftylamidase activiteit aantoonbaar (bijlage tabel A). Alle onderzochte zure hydrolasen werden in het bindweefsel gevonden (bijlage tabel A).

De afwijkingen die in de spieren van de vitamine E deficiënte proefdieren aanwezig waren, werden zowel in de haematoxyline eosine coupes van het volgens Susa gefixeerde materiaal, als in de haematoxyline eosine coupes van het ingevroren materiaal gezien. De afwijkingen waren niet gelijkmatig in de coupes verdeeld.

In de haematoxyline eosine coupes van de spierbiopten van konijnen met 12 dagen vitamine E deficiënt voedsel werden geen of slechts geringe afwijkingen gezien (fig. 3, tabel 5 en bijlage tabel B).

In sommige biopten was een gering aantal afgeronde vezels en/of een geringe hoeveelheid granulocytair of rondkernig ontstekingsinfiltraat aanwezig (bijlage tabel B). Het ontstekingsinfiltraat bevond zich soms tussen de spiervezels en soms tussen resten gedegeneerd sarcoplasma (fig. 3). Het sarcoplasma van de afgeronde spiervezels en de brokken sarcoplasma kleurden in de meeste gevallen even sterk of zwakker met eosine dan het sarcoplasma van normale spiervezels (bijlage tabel B).

In de meeste pathologisch veranderde spiervezels was de activiteit van zure fosfatase (fig. 4) en β -glucuronidase verhoogd (tabel 5). Deze enzymen waren subsarcolemmaal en in sommige gevallen ook centraal in de spiervezels aanwezig.

E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit waren ook in een gering aantal spiervezels toegenomen (tabel 5), deze enzymen waren uitsluitend subsarcolemmaal gelocaliseerd.

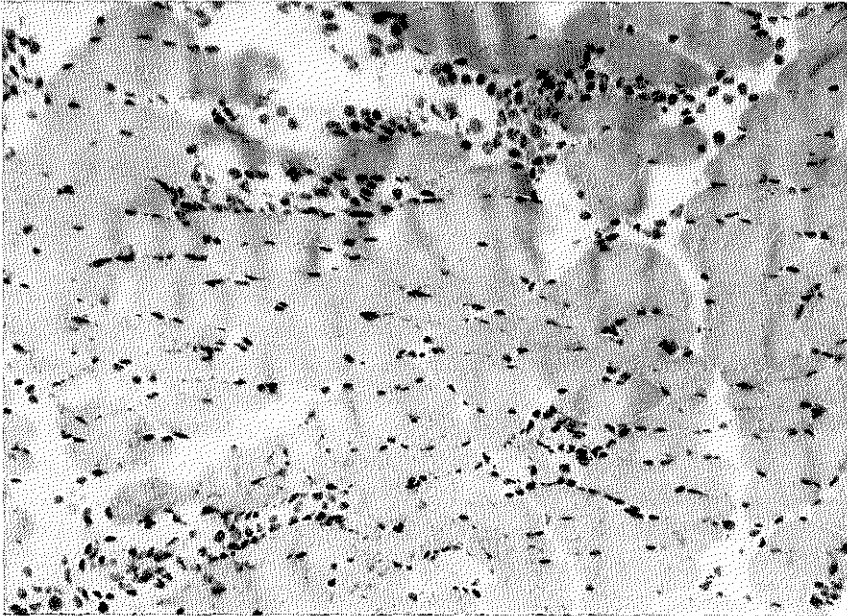


Fig. 3. E 003-73 I. HE kleuring 140 x. *M. gastrocnemius* van konijn met 12 dagen deficiënt dieet. Ontstekingsinfiltraat in en buiten de spiervezels.

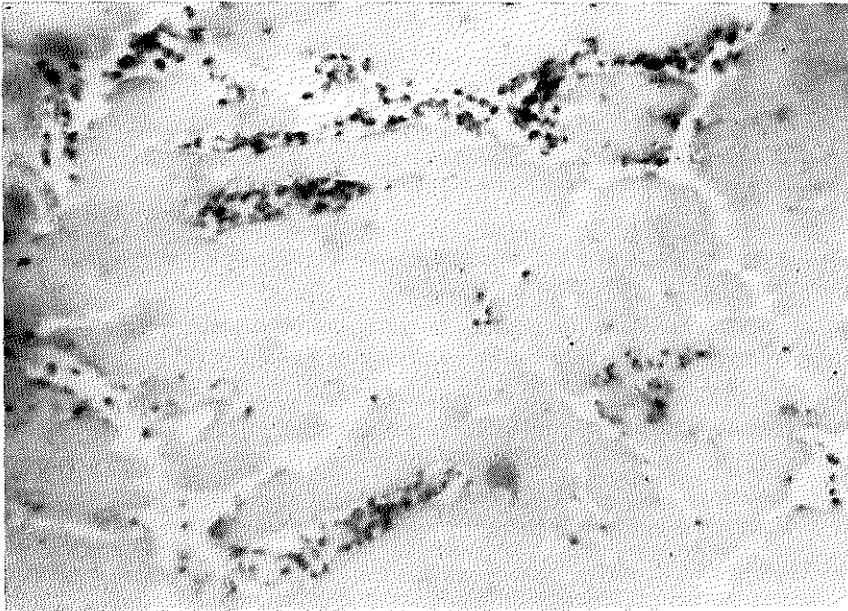


Fig. 4. E 003-73 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. *M. gastrocnemius* van konijn met 12 dagen vitamine E deficiënt dieet (overeenkomstig gebied als figuur 1). Zure fosfatase activiteit (zwart in de foto's) in spiervezels en infiltraat.

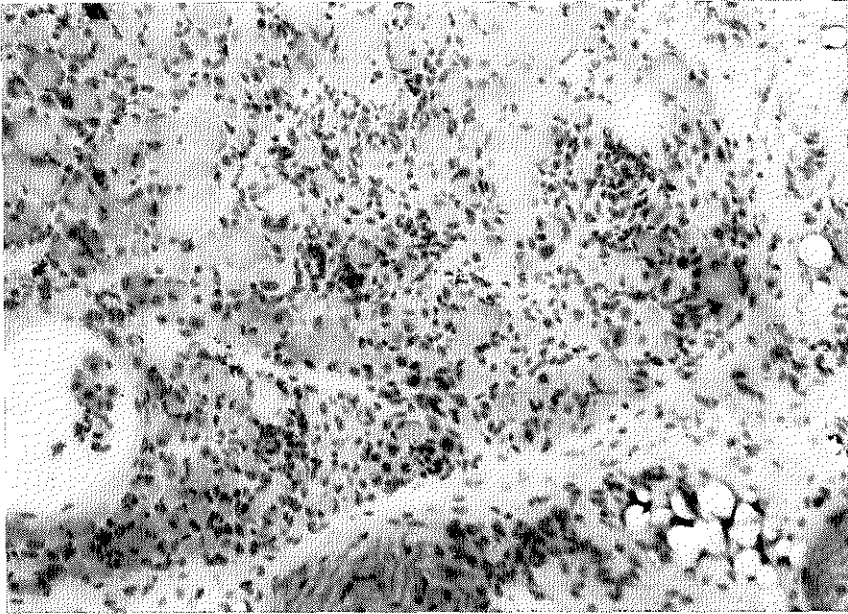


Fig. 5. E 403-72 I. HE kleuring 140 x. M. gastrocnemius van konijn met 19 dagen vitamine E deficiënt dieet. Vele afgeronde spiervezels die variatie in diameter tonen. Voorts ontstekingsinfiltraat tussen de spiervezels.

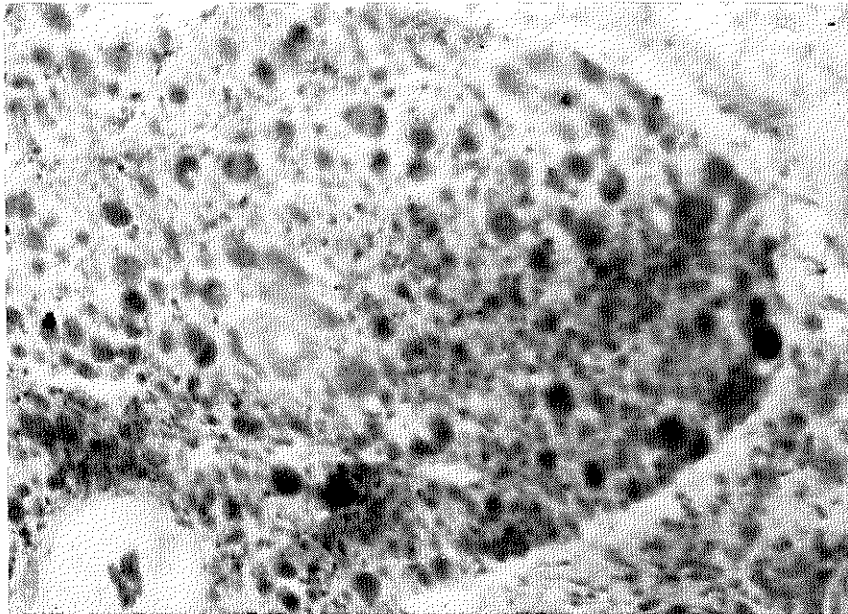


Fig. 6. E 403-72 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. M. gastrocnemius van konijn met 19 dagen vitamine E deficiënt dieet (overeenkomstig gebied als figuur 5). Toename van de zure fosfatase activiteit (zwart in de foto's) in spiervezels, bovendien is er enzymactiviteit in het ontstekingsinfiltraat.

TABEL 5. Samenvatting van een gedeelte van de resultaten van het histologisch en het enzymhistochemisch onderzoek ^a met konijnen. Gemiddelden van de scores in 10 spieren ^b.

	<i>M. Gastrocnemius</i>					<i>M. Soleus</i>						
	HE	ZF	β -G	NE+ E600	LN	HE	ZF	β -G	NE+ E600	LN		
groep n = 10												
Groep 2												
spiervezels	0,4 ^c	0,3 ^d	0,9 ^e	0,9	0,3	0,5	0,5	0,5	1,2	1,2	0,3	0,3
infiltraat	0,7	0,5	0,5	0,3	0	0	1,0	0,8	0,8	0,5	0,1	0,1
Groep 3												
spiervezels	1,8	0,8	2,4	2,8	1,2	1,5	2,2	0,8	2,7	2,6	1,4	1,3
infiltraat	2,6	2,6	2,0	1,5	0,7	0,7	2,3	2,1	1,8	1,3	0,6	0,6
Groep 4												
spiervezels	2,2,	0,1	3,0	3,3	1,3	1,7	1,6	0,0	2,8	2,7	1,4	1,7
infiltraat	3,4	3,4	3,1	2,6	1,5	1,5	3,2	3,1	3,1	2,1	1,3	1,3

	<i>M. Plantaris</i>					<i>Diafragma</i>						
	HE	ZF	β -G	NE+ E600	LN	HE	ZF	β -G	NE+ E600	LN		
Groep 2												
spiervezels	0,3	0,2	0,6	0,6	0,1	0,4	0,2	0,3	0,8	0,1	0,3	0,5
infiltraat	0,6	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,8	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3
Groep 3												
spiervezels	1,9	0,9	2,2	2,6	1,2	1,2	1,6	0,6	2,4	2,6	1,2	1,7
infiltraat	2,2	2,2	2,1	1,5	0,7	0,7	2,2	1,8	1,4	1,4	1,2	1,2
Groep 4												
spiervezels	2,0	0,1	2,8	2,7	1,3	1,5	1,5	0,1	2,2	2,7	1,5	1,9
infiltraat	3,1	3,1	2,9	2,1	1,3	1,3	2,8	2,3	2,4	2,1	1,7	1,7

Legenda

a Alleen de gemiddelden van de hoeveelheid korrelig neerslag zijn vermeld.

b hierbij is 0 = geen afwijkingen of geen enzymactiviteit.

4 = veel afwijkingen of veel enzymactiviteit.

HE = haematoxyline eosine, ZF = zure fosfatase, β -G = β -glucuronidase, NE + E 600 = E 600 resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase.

n = aantal spieren per groep.

Groep 2, 3 en 4 zijn konijnen met respectievelijk 12, 19 dagen vitamine E deficiënt dieet en de restgroep.

c hierbij werd van de degenererende spiervezels waarvan het cytoplasma zwakker, even sterk of sterker met eosine kleurde dan normale spiervezels (zie bijlage tabel B tot en met D, de rubrieken niet eos. en hyalien) de hoogste score genomen. Het gemiddelde van deze hoogste scores staat in tabel 5 vermeld.

d gemiddelde van de scores van de spiervezels met flocculaire veranderingen.

e gemiddelde van de hoeveelheid korrelig gekleurd neerslag.

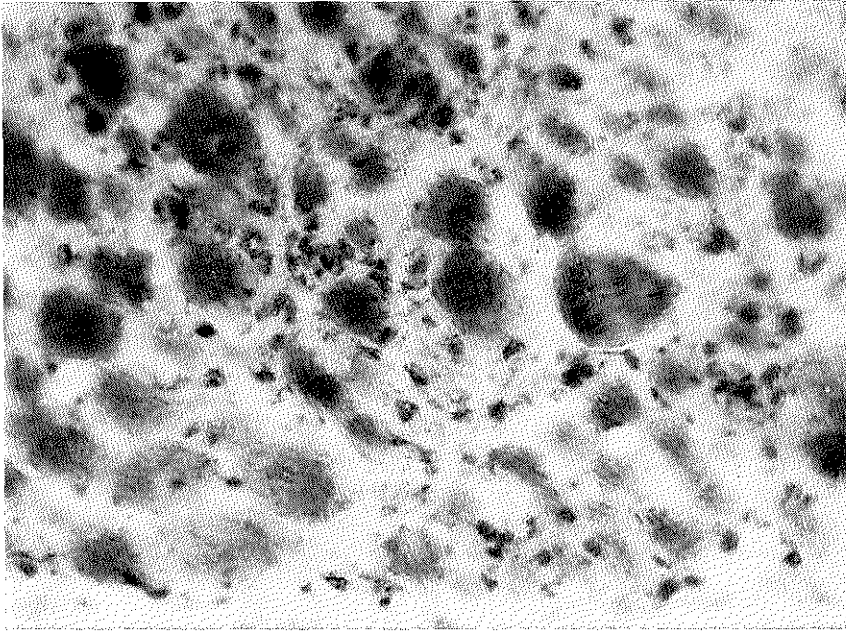


Fig. 7. E 403-72 I. Zure fosfatase bepaling 350 x. M. gastrocnemius van konijn met 19 dagen vitamine E deficiënt dieet (detail van fig. 6). Toename van het korrelig en niet korrelig kleurneerslag (wijzend op zure fosfatase activiteit) in de spiervezels.

Alle onderzochte zure hydrolasen waren in het ontstekingsinfiltraat aanwezig (tabel 5).

Na 19 dagen vitamine E deficiëntie namen de afwijkingen in ernst toe (fig. 5, tabel 5 en bijlage tabel C) en werden in de haematoxyline eosine coupes een matig aantal tot veel afgeronde vezels, een gering aantal vezels met flocculaire veranderingen en matig tot veel granulocytair of rondkernig ontstekingsinfiltraat gezien (bijlage tabel C).

In de meeste afgeronde vezels werden met de histochemische zure fosfatase (fig. 6 en 7) en β -glucuronidase methode een korrelig en niet korrelig neerslag aangetoond dat zowel subsarcolemmaal als centraal in de spiervezels aanwezig was.

E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit werd in een geringer aantal vezels gezien.

E 600 resistente naftylesterase was meestal, leucine naftylamidase activiteit was uitsluitend subsarcolemmaal gelocaliseerd. De kleurintensiteit en localisatie van het neerslag, dat bij de zure fosfatase en β -glucuronidase

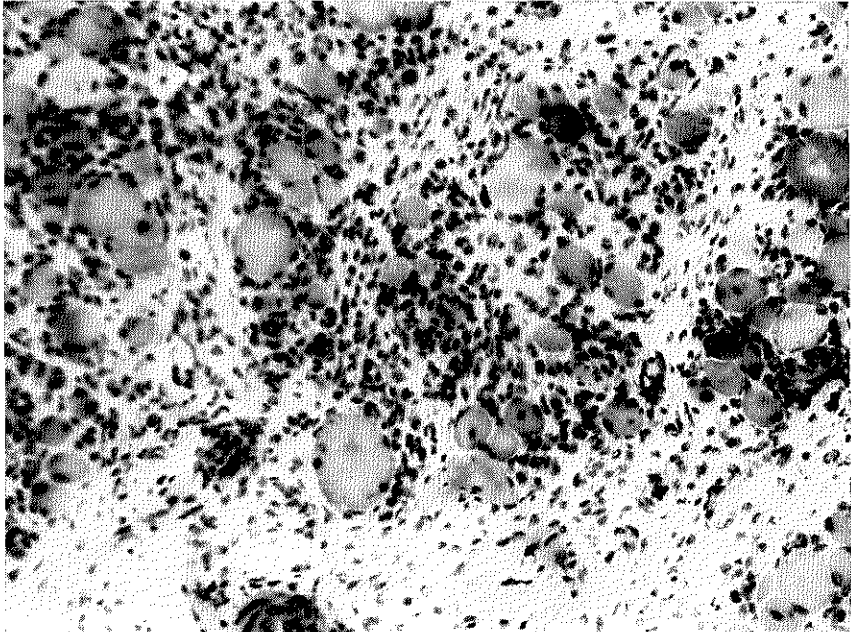


Fig. 8. E 441-72 I. HE kleuring 140 x. M. gastrocnemius van konijn uit de restgroep. Sterke toename van het ontstekingsinfiltraat (vergelijk figuur 5).

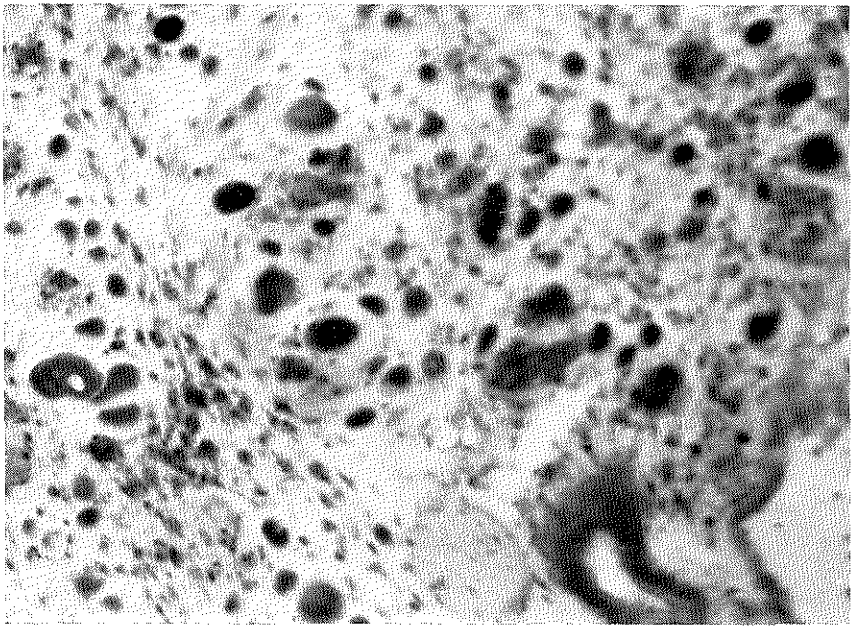


Fig. 9. E 441-72 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. M. gastrocnemius van konijn uit de restgroep (overeenkomstig gebied als figuur 8). Hoge zure fosfatase activiteit in spiervezels en infiltraat.

bepaling in de coupes werd gevormd, was meestal gelijk. De diameter van de korrels was in beide gevallen in dezelfde orde van grootte.

In het ontstekingsinfiltraat was een belangrijke verhoging van de activiteit van alle onderzochte enzymen aantoonbaar (tabel 5).

In de spieren van de restgroep en van konijnen die 19 dagen vitamine E deficiënt dieet kregen, werden in principe dezelfde afwijkingen gezien (tabel 5, bijlage tabel C en D). Bij de restgroep was het ontstekingsinfiltraat echter in sterkere mate toegenomen (tabel 5, fig. 8 en 9). Bovendien waren er een gering aantal regenererende spiervezels aanwezig (bijlage tabel D).

5.3. STATISTISCHE BEWERKING VAN DE RESULTATEN VAN HET HISTOCHEMISCH ONDERZOEK

Met Terpstra's trendtoets kon worden aangetoond, dat de enzymactiviteit ten gevolge van vitamine E deficiëntie in de verschillende stadia verhoogd was. Bij de zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase bepaling was zowel het korrelig als het niet korrelig neerslag in de coupes toegenomen, bij de leucine naftylamidase bepaling was dit alleen voor het korrelig neerslag het geval.

De resultaten van de tweestekproeventoets van Wilcoxon zijn in het linker gedeelte van tabel 6 vermeld. Uit deze tabel blijkt, dat de activiteit van de zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase in de laatste van twee opeenvolgende stadia was toegenomen. Dit gold zowel voor de hoeveelheid korrelig als voor de hoeveelheid niet korrelig neerslag, dat bij het aantonen van de activiteit van deze 3 enzymen in spiervezels en infiltraat werd gevormd. De hoeveelheid korrelig neerslag, die bij het aantonen van leucine naftylamidase wordt gevormd was (in tegenstelling tot het niet korrelig neerslag), in de laatste van twee opeenvolgende stadia verhoogd.

Voorts werd de kans geschat dat de toename van de enzymactiviteit in een rode spier (m. soleus) en een witte spier (m. plantaris) gelijk is. Deze was bij ons onderzoek $0,75 \pm 0,15$ *. Indien de kans kleiner dan 0,05 was, werd aangenomen dat de enzymactiviteit in beide spieren niet in gelijke mate verhoogd was. We kunnen derhalve concluderen dat tengevolge van vitamine E deficiëntie de enzymactiviteit in een rode spier (m. soleus) en in een witte spier (m. plantaris) in dezelfde mate was gestegen.

* Gemiddelde met standaard deviatie.

TABEL 6. Resultaten van het onderzoek met konijnen. Twee steekproeven toets van Wilcoxon.

Vergeleken groepen	Histochemie								Biochemie			
	ZF		β-G		NE+E600		LN		ZF	β-G	Cat	ZM
	Spier K D	Inf K D	Spier K D	Inf K D	Spier K D	Inf K D	Spier K D	Inf K D				
	<i>M. Gastrocnemius</i>								<i>M. Gastrocnemius</i>			
1 en 2	A A	H A	A A	A H	A H	A H	A H	H H	H	A	H	—
2 en 3	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A H	A H	A	A	A	—
3 en 4	H A	A A	H A	A A	H H	A A	H H	A H	H	A	H	—
	<i>M. Soleus</i>								<i>M. Soleus</i>			
1 en 2	A A	A H	A A	A A	A H	A A	A H	H H	H	A	A	H
2 en 3	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A H	A H	A	A	A	A
3 en 4	H H	A A	H H	A A	H H	A A	H H	A H	H	A	A	A
	<i>M. Plantaris</i>								<i>M. Plantaris</i>			
1 en 2	A H	H H	A H	H H	H H	H H	A H	H H	H	A	H	H
2 en 3	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A H	A H	A	A	A	A
3 en 4	A A	A A	H H	A A	H A	A A	H H	A H	H	A	H	A
	<i>Diafragma</i>								<i>Diafragma</i>			
1 en 2	A A	A A	A A	A H	H H	A A	A H	A H	H	A	H	—
2 en 3	A A	A A	A A	A H	A A	A A	A H	A H	H	A	A	—
3 en 4	H H	H A	H H	A A	H H	A A	H H	A H	A	A	H	—

Legenda zie tabel 5

Groep 1 = controle groep.

Groepen 2, 3 en 4 zijn groepen konijnen met respectievelijk 12 en 19 dagen vitamine E deficiënt dieet en de restgroep (stadium 1, 2 en 3 van vitamine E deficiëntie).

H = de enzymactiviteit is in 2 opeenvolgende stadia gelijk.

A = de enzymactiviteit is in de laatste van 2 opeenvolgende stadia toegenomen.

K = korrelig neerslag.

D = niet korrelig neerslag.

— = de enzymactiviteit is niet bepaald.

TABEL 7. Resultaten van het onderzoek met konijnen. Rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman.

	<i>Histochemie</i>									<i>Biochemie</i>					
	Spier K			Spier D			Inf K			Inf D			ZF	β-G	Cat.
	ZF	β-G	NE+ E600	ZF	β-G	NE+ E600	ZF	β-G	NE+ E600	ZF	β-G	NE+ E600			
<i>M. Gastrocnemius</i>													<i>M. Gastrocnemius</i>		
β-G	0,95			0,95			0,95			0,95			β-G	0,97	
NE+ E600	0,76	0,77		0,73	0,74		0,92	0,94		0,93	0,92		Cat	0,73	0,82
LN	0,91	0,87	0,74	X	X	X	0,74	0,66	0,70	X	X	X			
<i>M. Soleus</i>													<i>M. Soleus</i>		
β-G	0,88			0,94			0,94			0,96			β-G	0,54	
NE+ E600	0,87	0,87		0,86	0,82		0,85	0,86		0,87	0,83		Cat	0,40	0,90
LN	0,79	0,80	0,84	X	X	X	0,60	0,65	0,71	X	X	X	ZM	0,52	0,77
														0,70	
<i>M. Plantaris</i>													<i>M. Plantaris</i>		
β-G	0,95			0,90			0,97			0,98			β-G	0,74	
NE+ E600	0,84	0,87		0,97	0,84		0,92	0,92		0,89	0,87		Cat	0,68	0,82
LN	0,85	0,87	0,71	X	X	X	0,76	0,72	0,73	X	X	X	ZM	0,54	0,84
														0,65	
<i>Diafragma</i>													<i>Diafragma</i>		
β-G	0,94			0,91			0,93			0,88			β-G	0,57	
NE+ E600	0,82	0,81		0,84	0,88		0,87	0,90		0,78	0,75		Cat	0,75	0,82
LN	0,85	0,85	0,68	X	X	X	0,81	0,88	0,76	X	X	X			

Legenda

ZF = zure fosfatase, β-G = β-glucuronidase, NE+600 = E 600.resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase, Cat = cathepsine, ZM = zure maltase.

Spier = spiervezels, Inf = infiltraat, K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

X = correlatiecoëfficiënt niet vermeld omdat uit Terpstra's trendtoets bleek, dat de hoeveelheid niet korrelig neerslag bij het aantonen van LN-ase activiteit wordt gevormd niet verhoogd was.

Om na te gaan of er een correlatie tussen de toename van de activiteit van 2 enzymen bestond, werden de rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman berekend; deze zijn in het linker gedeelte van tabel 7 vermeld.

De rangcorrelatiecoëfficiënten varieerden van 0,60 - 0,96 gemiddeld $0,85 \pm 0,08$ *.

Hieruit kan men concluderen, dat een toename van de activiteit van één lysosomaal enzym vaak gepaard ging met de toename van de activiteit van meerdere andere lysosomale enzymen. De toename van de zure fosfatase activiteit ging zelfs vrijwel altijd samen met een verhoging van de β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,93).

Zowel een verhoging van de zure fosfatase als een verhoging van de β -glucuronidase activiteit ging vaak samen met een verhoging van de E 600 resistente naftylesterase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënten gemiddeld 0,86 en 0,85). Een verhoging van de leucine naftylamidase activiteit ging even vaak gepaard met een stijging van de zure fosfatase activiteit als met een stijging van de β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënten gemiddeld 0,76 en 0,75).

5.4. BIOCHEMISCH ONDERZOEK

Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β -glucuronidase, cathepsine; zure en neutrale maltase activiteit in spierhomogenaten van vitamine E deficiënte konijnen en de statistische bewerking van de resultaten

De resultaten van het biochemisch onderzoek zijn in tabel 8 samengevat en werden statistisch bewerkt. Met Terpstra's trendtoets kon worden aangetoond dat de activiteit van zure fosfatase, β -glucuronidase, cathepsine en zure maltase ten gevolge van vitamine E deficiëntie was toegenomen. Daarentegen was de neutrale maltase activiteit opmerkelijk constant.

Met de tweestekproeven toets van Wilcoxon (tabel 6) werd aangetoond dat de β -glucuronidase activiteit in de laatste van twee opeenvolgende stadia steeds was toegenomen. Bij de neutrale maltase activiteit die bij vitamine E deficiëntie niet was toegenomen (zie vorige alinea) was dit nooit het geval.

De zure fosfatase, β -glucuronidase, cathepsine en zure maltase activiteit was bij konijnen, die 19 dagen vitamine E deficiënt dieet kregen steeds hoger dan bij konijnen die dit dieet 12 dagen kregen. Dit is in overeen-

* Gemiddelde met standaard deviatie.

TABEL 8. Resultaten van het biochemisch onderzoek met konijnen. Gemiddelde enzymactiviteiten \pm SD.

Groepen	Zure fosfatase	β -Glucuronidase	Cathepsine	Zure maltase	Neutrale maltase	Zure maltase/ Neutrale maltase
<i>M. Gastrocnemius</i>						
1	31,5 \pm 7,8 x)	1,29 \pm 0,23	0,14 \pm 0,14	—	—	—
2	32,4 \pm 7,5	2,49 \pm 0,84	0,14 \pm 0,14	—	—	—
3	54,5 \pm 13,4	11,59 \pm 5,01	1,56 \pm 1,16	—	—	—
4	68,5 \pm 29,5	27,45 \pm 9,47	2,30 \pm 1,40	—	—	—
<i>M. Soleus</i>						
1	44,6 \pm 8,7	1,52 \pm 0,37	0,18 \pm 0,16	8,94 \pm 2,02	2,69 \pm 0,97	3,6 \pm 1,0
2	46,6 \pm 6,9	3,74 \pm 2,48	0,42 \pm 0,24	9,39 \pm 3,59	2,40 \pm 1,75	6,4 \pm 4,0
3	65,9 \pm 31,1	13,21 \pm 5,54	1,22 \pm 0,54	13,70 \pm 4,67	1,30 \pm 0,56	12,9 \pm 7,7
4	65,2 \pm 24,1	26,35 \pm 8,46	1,96 \pm 0,64	18,34 \pm 5,31	1,65 \pm 0,52	11,4 \pm 2,7
<i>M. Plantaris</i>						
1	31,1 \pm 4,7	1,39 \pm 0,22	0,14 \pm 0,12	6,43 \pm 1,43	2,43 \pm 0,69	2,9 \pm 1,1
2	34,8 \pm 6,9	3,50 \pm 1,62	0,23 \pm 0,16	6,64 \pm 2,35	2,14 \pm 0,55	3,2 \pm 1,3
3	50,2 \pm 16,0	12,73 \pm 4,94	0,98 \pm 0,56	9,83 \pm 3,09	1,70 \pm 0,75	8,5 \pm 8,2
4	55,5 \pm 20,1	22,19 \pm 7,57	1,66 \pm 0,72	17,21 \pm 7,04	1,84 \pm 0,55	9,8 \pm 4,5
<i>Diafragma</i>						
1	40,9 \pm 7,9	1,72 \pm 0,28	0,26 \pm 0,22	—	—	—
2	40,8 \pm 9,0	4,10 \pm 1,80	0,28 \pm 0,24	—	—	—
3	50,5 \pm 13,0	9,60 \pm 4,05	1,12 \pm 0,38	—	—	—
4	64,5 \pm 13,3	19,71 \pm 8,37	1,52 \pm 0,62	—	—	—

Legenda

Groep 1 = controle groep (n = 10).

Groep 2, 3 en 4 zijn konijnen met respectievelijk 12, 19 dagen vitamine E deficient dieet en de restgroep (n is voor iedere groep 10).

SD = standaard deviatie.

x) = De enzymactiviteit is uitgedrukt in nmol omgezet substraat per mg weefsel per uur.

— = De enzymactiviteit is niet bepaald.

stemming met de bevindingen in de haematoxyline eosine coupes (tabel 5) waaruit bleek dat na 19 dagen vitamine E deficiënt dieet de hoeveelheid ontstekingsinfiltraat, dat een hoge hydrolytische enzymactiviteit heeft, sterk is toegenomen.

Voorts bleek dat bij vitamine E deficiëntie de enzymactiviteit in een rode spier (m. soleus) en een witte spier (m. plantaris) in dezelfde mate was toegenomen.

De resultaten van het correlatieonderzoek zijn in het rechter gedeelte van tabel 7 vermeld. De rangcoëfficiënten varieerden van 0,40 - 0,92, gemiddeld $0,69 \pm 0,13$ *. Er bestond dus veel samenhang tussen de variabelen. Het bleek dat een toename van de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit vaak samen ging met een toename van cathepsine activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,84).

Dit goldt ook voor de β -glucuronidase en zure maltase (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,80) en de cathepsine en zure maltase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,77).

Een verhoging van de zure fosfatase activiteit ging echter minder vaak met een stijging van andere enzymen gepaard, dan een verhoging van de β -glucuronidase activiteit. De gemiddelde rangcorrelatiecoëfficiënt voor zure fosfatase en cathepsine was 0,62 en voor zure fosfatase en zure maltase 0,65.

5.5. EEN VERGELIJKING TUSSEN DE RESULTATEN VAN HET HISTOCHEMISCH EN HET BIOCHEMISCH ONDERZOEK

Om na te gaan of er een correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek kon worden aangetoond, werden de rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman berekend (tabel 9). Uit deze tabel blijkt, dat behalve als één van de variabelen de biochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit in de m. soleus of diafragma was, er bij paarsgewijze vergelijking veel samenhang tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek werd gevonden.

Indien deze 2 uitzonderingen niet worden meegerekend dan varieerden de rangcorrelatiecoëfficiënten van 0,61 - 0,92, gemiddeld $0,78 \pm 0,09$ *.

De histochemisch bepaalde zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit gingen wat vaker met een toename van de biochemisch bepaalde enzymactiviteit samen dan de E 600 resistente naftylesterase en de leucine

* Gemiddelde met standaard deviatie.

TABEL 9. Rangcorrelatiecoëfficiënten van het histochemisch en biochemisch onderzoek met konijnen.

Histochemie	<i>M. Gastrocnemius</i>			<i>M. Soleus</i>				<i>M. Plantaris</i>				<i>Diafragma</i>		
	Biochemie			Biochemie				Biochemie				Biochemie		
	ZF	β -G	Cat	ZF	β -G	Cat	ZM	ZF	β -G	Cat	ZM	ZF	β -G	Cat
ZF														
Spier K	0,79	0,87	0,86	0,27	0,80	0,84	0,66	0,72	0,92	0,87	0,76	0,49	0,84	0,79
D	0,81	0,87	0,88	0,28	0,82	0,83	0,68	0,68	0,90	0,84	0,77	0,42	0,77	0,72
Inf K	0,82	0,91	0,86	0,37	0,88	0,84	0,70	0,62	0,89	0,84	0,69	0,57	0,88	0,81
D	0,97	0,91	0,86	0,36	0,87	0,85	0,70	0,59	0,89	0,83	0,73	0,45	0,80	0,67
β -G														
Spier K	0,84	0,91	0,88	0,41	0,91	0,92	0,77	0,76	0,93	0,87	0,77	0,48	0,85	0,79
D	0,83	0,91	0,89	0,32	0,83	0,84	0,69	0,69	0,87	0,88	0,73	0,42	0,81	0,78
Inf K	0,75	0,90	0,83	0,35	0,89	0,83	0,65	0,61	0,86	0,82	0,64	0,57	0,88	0,80
D	0,77	0,90	0,84	0,31	0,86	0,81	0,68	0,56	0,86	0,81	0,68	0,47	0,69	0,59
NE + E600														
Spier K	0,66	0,70	0,69	0,31	0,82	0,83	0,62	0,72	0,82	0,81	0,69	0,39	0,76	0,70
D	0,61	0,71	0,73	0,38	0,87	0,87	0,64	0,69	0,84	0,80	0,76	0,46	0,80	0,80
Inf K	0,76	0,90	0,84	0,45	0,87	0,82	0,66	0,70	0,88	0,86	0,66	0,55	0,85	0,74
D	0,77	0,91	0,82	0,34	0,85	0,84	0,61	0,62	0,86	0,85	0,63	0,48	0,83	0,69
LN														
Spier K	0,70	0,77	0,72	0,40	0,81	0,80	0,69	0,75	0,83	0,77	0,68	0,41	0,82	0,75
D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Inf K	0,63	0,69	0,73	0,34	0,71	0,70	0,45	0,63	0,73	0,63	0,63	0,48	0,79	0,74
D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legenda

ZF = zure fosfatase, β -G = β -glucuronidase, NE+600 = E 600 resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase, Cat = cathepsine, ZM = zure maltase, Spier = spiervezels, Inf = infiltraat, K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

X = correlatiecoëfficiënt niet vermeld omdat uit Terpstra's trendtoets bleek dat de hoeveelheid korrelig neerslag, die bij het aantonen van LN-ase activiteit wordt gevormd, niet verhoogd was.

naftylamidase activiteit. Wanneer één van de variabelen de histochemisch bepaalde zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit waren, dan bedroegen de rangcorrelatiecoëfficiënten gemiddeld respectievelijk 0,80, 0,81, 0,76 en 0,71 (tabel 9).

5.6. RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK NAAR DE SUBSTRAAT SPECIFICITEIT VAN ZURE FOSFATASE EN β -GLUCURONIDASE

5.6.1. Inleiding en resultaten van het centrifugatie onderzoek op verschillende celfracties van spieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen

Zowel de afwijkingen in de haematoxyline eosine coupes als de toename en localisatie van de zure fosfatase activiteit in de coupes waren bij dit onderzoek identiek aan de bevindingen van het hoofdonderzoek. Hieruit volgt dat de resultaten van het onderzoek naar de substraat specificiteit geheel toepasbaar zijn voor het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek.

Uit tabel 10 blijkt duidelijk dat de waargenomen stijging in activiteit van zure fosfatase in pathologisch veranderde spieren sterk afhankelijk is van het toegepaste substraat. Met het histochemisch substraat werd in de m. gastrocnemius van konijnen in stadium 3 van vitamine E deficiëntie een zure fosfatase activiteit gevonden, die 17 maal hoger was dan in de controle spier, terwijl de enzymactiviteit bepaald met 4-methylumbelli-

TABEL 10. Activiteit * van zure fosfatase en β -glucuronidase in de m. gastrocnemius.

<i>Substraat</i>	<i>Controle</i>	<i>Deficiënt **</i>
4-methylumbelliferylfosfaat	24,3 \pm 6,3***	45,7 \pm 11,5
naftol-AS-BI-fosfaat	1,6 \pm 0,7	26,4 \pm 12,6
4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide	1,01 \pm 0,3	23,7 \pm 9,5
naftol-AS-BI- β -D-glucuronide	0,98 \pm 0,3	27,8 \pm 10,2

Legenda

* = Activiteit uitgedrukt in μ mol omgezet substraat. mg weefsel⁻¹. h⁻¹.

** = M. gastrocnemius van proefdieren in stadium 3 van vitamine E deficiëntie (restgroep).

*** = Gemiddelde van 10 waarnemingen met standaard deviatie.

TABEL 11. Toename^a van de zure fosfatase activiteit^b in de verschillende cel-fracties van de m. gastrocnemius bij vitamine E deficiëntie^c.

Substraten	Celfracties		
	I	II	III
4-methylumbelliferylfosfaat	7,0	6,9	1,2
naftol-AS-BI-foosfaat	8,0	26,8	4,5
p-nitrofenylfosfaat	4,6	5,3	1,7

Legenda

- a = zure fosfatase activiteit bij vitamine E deficiëntie/zure fosfatase activiteit bij controles.
- b = activiteit uitgedrukt in nmol omgezet substraat. mg weefsel⁻¹. h⁻¹.
- c = m. gastrocnemius van konijnen in stadium 3 van vitamine E deficiëntie.
- I = mitochondriale-lysosomale fractie.
- II = microsomale fractie.
- III = oplosbare fractie.

ferylfosfaat slechts 1,9 maal de controle waarde bedroeg. Daarentegen was de β -glucuronidase activiteit, met beide substraten bepaald, meer dan 20 maal verhoogd. Dit verklaart dat voor β -glucuronidase, de histochemische en biochemische bevindingen vermeld in het hoofdgedeelte van het proefschrift goed met elkaar overeenstemden. Dit was voor zure fosfatase in mindere mate het geval.

Ook WEINSTOCK en IODICE (1969) beschreven, dat de waargenomen activiteitsstijging van zure fosfatase in skeletspieren van vitamine E deficiënte konijnen, sterk afhankelijk is van het type substraat.

Voorts werden in mitochondriale-lysosomale, microsomale en oplosbare fracties de activiteit van zure fosfatase, glucose-6-fosfatase en barnsteen-zuur-dehydrogenase bepaald.

Het glucose-6-fosfatase, een marker enzym voor de microsomen, bevond zich voor 90% in de microsomen, terwijl het mitochondriale enzym barnsteen-zuur-dehydrogenase voor 95% in de mitochondriale-lysosomale fractie aanwezig was.

In tabel 11 is de toename van de zure fosfatase activiteit in de verschillende celfracties van de m. gastrocnemius van konijnen in stadium 3 van vitamine E deficiëntie weergegeven.

In homogenaten van m. gastrocnemii van de vitamine E deficiënte konijnen was de zure fosfatase activiteit 1,9 maal hoger dan in de controle spieren (tabel 10). In de microsomale fractie van de deficiënte spieren was de zure fosfatase activiteit 1,2 maal toegenomen (tabel 11). Hieruit

kan men concluderen dat met 4-methylumbelliferylfosfaat vooral de zure fosfatase activiteit, die zich in de oplosbare fractie bevindt, wordt aangetoond.

De zure fosfatase activiteit bepaald met naftol-AS-BI-fosfaat was in het homogenaat van de deficiënte spieren 17 maal hoger dan bij de controles (tabel 10). In de mitochondriale-lysosomale en in de microsomale fracties was de enzymactiviteit bepaald met naftol-AS-BI-fosfaat respectievelijk 8 maal hoger en 26 maal hoger dan de controle groep. Met dit substraat toont men waarschijnlijk vooral de zure fosfatase activiteit in de mitochondriale-lysosomale en microsomale fracties aan.

De toename van de zure fosfatase activiteit, die met 4-methylumbelliferyl-fosfaat en p-nitrofenylfosfaat werd bepaald, was in de mitochondriale-lysosomale fractie in dezelfde orde van grootte (tabel 11). Dit gold eveneens voor de met beide substraten gevonden toename van de zure fosfatase activiteit in de oplosbare fractie.

Voorts werd de invloed van NaF en Na (DL)-tartraat op de zure fosfatase activiteit in verschillende celfracties van de m. gastrocnemius van controle konijnen en van konijnen in stadium 3 van vitamine E deficiëntie onderzocht (SHIBKO en TAPPEL, 1963). De resultaten zijn in tabel 12 vermeld.

TABEL 12. De invloed van NaF en DL-tartraat op de zure fosfatase activiteit in verschillende celfracties van de m. gastrocnemius.

Substraat	Controle						Deficiënt					
	NaF*			Na (DL)-tartraat*			NaF*			Na (DL)-tartraat*		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
4-methylumbelliferylfosfaat	66**	61	0	34	0	0	40	79	40	15	8	0
naftol-AS-BI-fosfaat	100	100	100	100	100	100	98	97	100	84	88	81
p-nitrofenylfosfaat	84	80	10	0	0	0	73	71	56	40	39	35

Legenda zie tabel 10 en 11.

* = de NaF concentraties in de media met respectievelijk 4-methylumbelliferyl-fosfaat, naftol-AS-BI-fosfaat en p-nitrofenylfosfaat waren respectievelijk 0,001 M, 0,001 M en 0,002 M. De Na (DL)-tartraat concentraties bedroegen respectievelijk 0,02 M, 0,01 M en 0,005 M.

** = percentage remming van de enzymactiviteit.

NaF en DL-tartraat remden de splitsing van de naftol-AS-BI-fosfaat in alle celfracties van normale spieren volledig, terwijl de omzetting van dit substraat in vitamine E deficiënte spieren voor 80 - 100% werd geremd. Daarentegen werd de splitsing van 4-methylumbelliferylfosfaat en p-nitrofenylfosfaat veel minder dan het histochemisch substraat geremd.

5.6.2. Resultaten van het gelfiltratie onderzoek bij spieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen

Het elutiepatroon van geconcentreerde spierhormogenaten na chromatografie over Sephadex G 200 kolommen vertoonde, indien 4-methylumbelliferylfosfaat werd gebruikt, drie maxima van zure fosfatase activiteit (I, II en III, fig. 10, 11 en 12). De maxima I en II werden ook met naftol-AS-BI-fosfaat aangetoond. Het maximum III kon alleen met 4-methylumbelliferylfosfaat worden verkregen. Het is opvallend, dat de maxima I en II in de pathologisch veranderde spieren sterk zijn gestegen, terwijl het maximum III niet significant is veranderd. Dit verklaart, dat in de spieren van vitamine E deficiënte konijnen, de activiteit van zure fosfatase met het histochemische substraat relatief sterker was gestegen dan met 4-methylumbelliferylfosfaat.

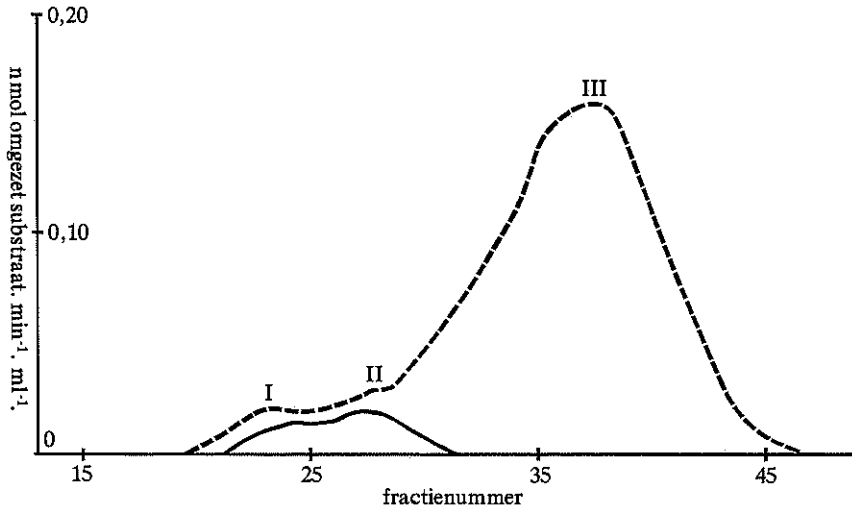


Fig. 10. Zure fosfatase activiteit in Sephadex G 200 eluaat van skeletspierhomogenaat van normale konijnen.

----- Zure fosfatase activiteit bepaald met 4-methylumbelliferylfosfaat.

— Zure fosfatase activiteit bepaald met naftol-AS-BI-fosfaat.

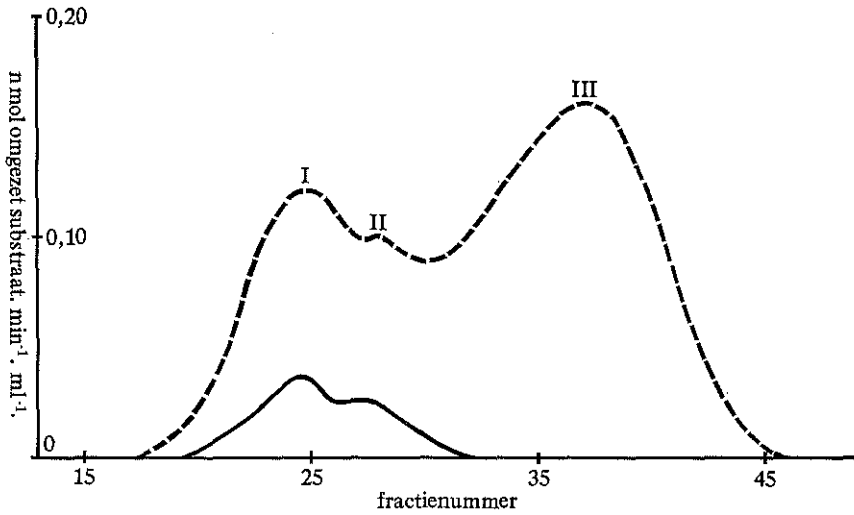


Fig. 11. Zure fosfatase activiteit in Sephadex G 200 eluaat van skeletspierhomogenaat van vitamine E deficiënte konijnen, waarbij de activiteit zich histochemisch in het ontstekingsinfiltraat bleek te bevinden (stadium I van vitamine E deficiëntie).
 ----- Zure fosfatase activiteit bepaald met 4-methylumbelliferylfosfaat.
 ————— Zure fosfatase activiteit bepaald met naftol-AS-BI-fosfaat.

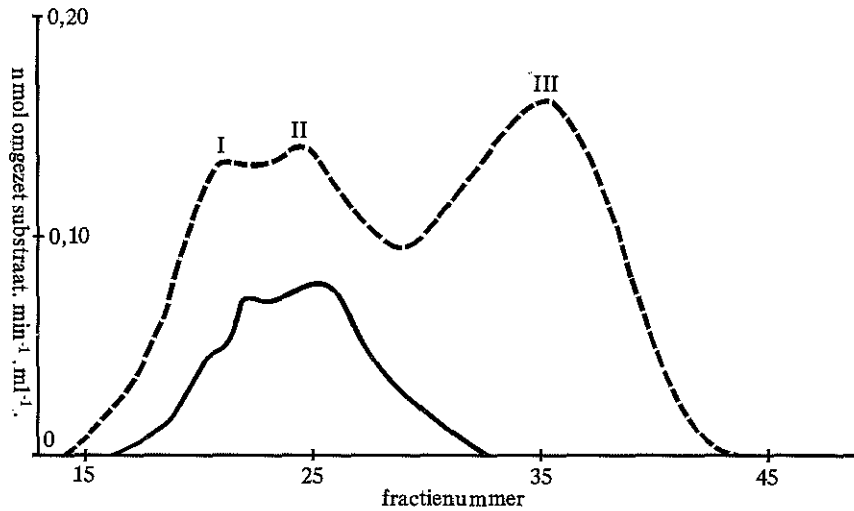


Fig. 12. Zure fosfatase activiteit in Sephadex G 200 eluaat van skeletspierhomogenaat van vitamine E deficiënte konijnen, waarbij zich histochemisch veel zure fosfatase activiteit in spiervezels en infiltraat bevond (stadium 3 van vitamine E deficiëntie).
 ----- Zure fosfatase activiteit bepaald met 4-methylumbelliferylfosfaat.
 ————— Zure fosfatase activiteit bepaald met naftol-AS-BI-fosfaat.

Er is een duidelijk verband tussen de vorm van de activiteitscurven en de localisatie van de zure fosfatase activiteit in het spierweefsel.

Indien de enzymactiviteit zich hoofdzakelijk in het ontstekingsinfiltraat bevindt, dan verkrijgt men een curve zoals afgebeeld in fig. 11. Vertonen ook de spiervezels veel zure fosfatase activiteit, dan verkrijgt men een curve zoals afgebeeld in fig. 12.

Deze bevindingen geven de impressie dat de isoënzymsamenstelling van zure fosfatase in diverse celtypen, die in het spierweefsel aanwezig zijn, van elkaar kunnen verschillen.

Aangezien de ontstekingsinfiltraten leucocyten bevaten, is de zure fosfatase activiteit in het Sephadex G 200 eluaat van een gezuiverde leucocyten suspensie bepaald (fig. 13). De leucocyten waren afkomstig van een normaal konijn. Deze cellen hadden slechts een geringe zure fosfatase activiteit, waardoor het niet mogelijk was de activiteit met naftol-AS-BI-fosfaat te bepalen.

De activiteitscurve toont naast overeenkomsten ook verschillen met de activiteitscurven van spierhomogenaten. De maxima I, II en III komen overeen met de maxima gevonden in de spieren van de konijnen. Daarentegen kon het maximum IV niet in de spierhomogenaten worden aangetoond.

De verschillende maxima wijzen op het voorkomen van isoënzymen van zure fosfatase. Uit de resultaten blijkt duidelijk dat voor een zinvolle

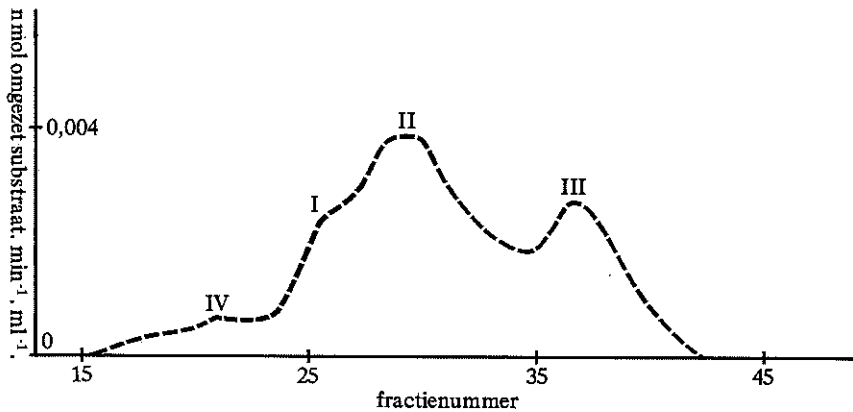


Fig. 13. Zure fosfatase activiteit in Sephadex G 200 eluaat van leucocyten van een normaal konijn.

----- Zure fosfatase activiteit bepaald met 4-methylumbelliferylfosfaat.

bestudering van het voorkomen van isoënzymen in weefsels, het noodzakelijk is om o.a. met enzymhistochemische technieken na te gaan, hoe het te onderzoeken weefsel is opgebouwd en in welke typen cellen de activiteit van het enzym aanwezig is. Bij praktisch al dit soort biochemische onderzoeken is tot nu toe te weinig aandacht besteed aan de morfologie.

Nadat het elutie volume van de verschillende isoënzymen van zure fosfatase was bepaald, kon het molecuulgewicht met behulp van een ijkingscurve waarin de logaritmische waarde van het molecuulgewicht als functie van V_e/V_o staat uitgezet, worden berekend (fig. 14). De molecuulgewichten van de verschillende isoënzymen waren respectievelijk 110000 - 130000, 66000 - 78000 en 12500 - 14500. De mogelijke fout werd berekend uit plus of min het halve volume van een fractie. De opbrengst van enzymactiviteit en eiwit in de fracties was meer dan 90% van het opgebrachte homogenaat. Het pH optimum voor de eerste 2 isoënzymen was 4,8, dat van het derde isoënzym bedroeg 5,5.

De gevonden molecuulgewichten komen ten dele overeen met de resul-

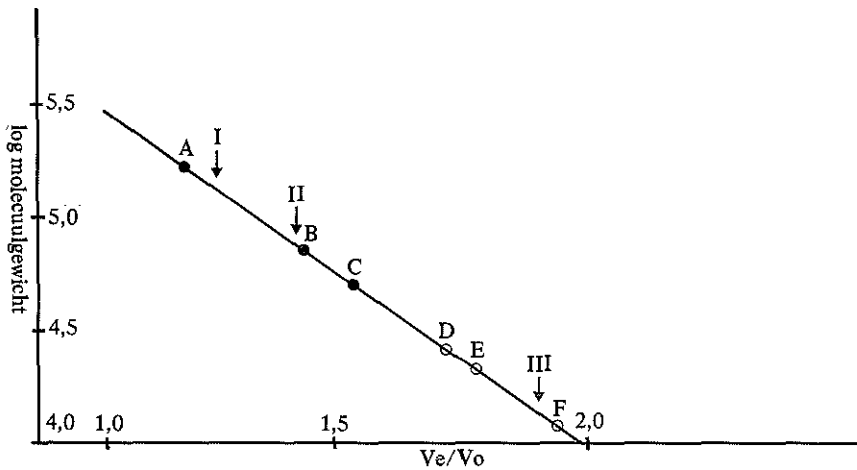


Fig. 14. Ijkingscurve voor het bepalen van de molecuulgewichten van de isoënzymen van zure fosfatase met Sephadex G 200 eluaten.

De V_e/V_o als functie van de logaritmische waarde van het molecuulgewicht van:

A. Gamma-globuline	molecuulgewicht 160000
B. Albumine	molecuulgewicht 67000
C. Ovalbumine	molecuulgewicht 45000
D. α -Chymotrypsinogeen	molecuulgewicht 25000
E. Soyabonen trypsine remmer	molecuulgewicht 21500
F. Cytochrom C	molecuulgewicht 12400

taten van FILBURN (1973), die in staarten van kikkerlarven 4 isoënzymen van zure fosfatase aantoonde met een molecuulgewicht van > 200000 , 92000 - 126000, 36400 - 45400 en 16600 - 20900.

DI PIETRO en ZENGERLE (1967) vonden in placentaweefsel van de mens 3 isoënzymen van zure fosfatase waarvan de molecuulgewichten (> 200000 , 105000 en 35000) goed overeenkomen met die van Filburn.

5.6.3. Resultaten van het electroforese onderzoek op spieren van normale en vitamine E deficiënte proefdieren

Bij polyacrylamide gel electroforese op een homogenaat van de m. gastrocnemius van een konijn in stadium 3 van vitamine E deficiëntie werden met 4-methylumbelliferylfosfaat 3 banden aangetoond.

Met het substraat naftol-AS-BI-fosfaat werden daarentegen 2 banden verkregen. Deze 2 banden kwamen overeen met die banden die met het 4-methylumbelliferylfosfaat het snelst naar de kathode migreerden (fig. 15).

Het was opvallend, dat de band die zich het snelst naar de kathode had verplaatst, vrij breed was en diffuus in de gel was gelocaliseerd (fig. 15). Bovendien gaf de inhomogene kleurintensiteit de impressie dat men met meerdere isoënzymen te maken had. Daarentegen waren de andere twee banden zeer scherp in de gel gelocaliseerd.

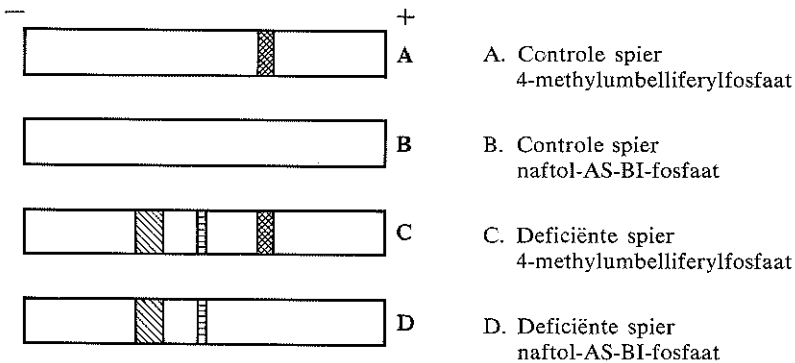


Fig. 15. Polyacrylamide gel electroforese op spierhomogenaten van controle en vitamine E deficiënte konijnen.

A. en B. Spierhomogenaat van controle konijn, enzymactiviteit zichtbaar gemaakt, met respectievelijk 4-methylumbelliferylfosfaat en naftol-AS-BI-fosfaat.

C en D. Spierhomogenaat van vitamine E deficiënt konijn, enzymactiviteit zichtbaar gemaakt met respectievelijk 4-methylumbelliferylfosfaat en naftol AS-BI-fosfaat.

Met homogenaten van normale spieren werd met 4-methylumbelliferyl-fosfaat slechts één band waargenomen, die wat betreft de plaats geheel overeenkwam met die band in de pathologische spieren, die het minst naar de kathode was gemigreerd (fig. 15).

In de homogenaten van normale spieren werden met het histochemische substraat geen banden verkregen.

De resultaten verkregen met polyacrylamide gel electroforese zijn geheel in overeenstemming met de resultaten verkregen met gelfiltratie en gefractioneerde centrifugatie technieken.

Uit al deze onderzoeken blijkt, dat in skeletspieren van normale en vitamine E deficiënte konijnen verschillende isoënzymen van zure fosfatase aanwezig zijn. Onder invloed van vitamine E deficiëntie stijgt de activiteit van die isoënzymen, die ook door het histochemisch substraat in spieren aangetoond kunnen worden, aanzienlijk. Een isoënzym dat door dit substraat niet aangetoond wordt, neemt bij vitamine E deficiëntie niet of in geringere mate toe.

HOOFDSTUK 6

EEN VERGELIJKING TUSSEN DE HISTOCHEMISCH EN BIOCHEMISCH BEPAALDE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN VERSCHILLENDE SKELETSPIEREN VAN RATTEN DIE MET DPPD WAREN BEHANDELD

6.1. HISTOLOGISCH EN HISTOCHEMISCH ONDERZOEK

Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit in verschillende skeletspieren van ratten die met DPPD waren behandeld

De resultaten van het histologisch en het histochemisch onderzoek, die in tabel 13 zijn samengevat, zijn voor alle onderzochte spieren in principe gelijk. Derhalve worden verder alleen de afwijkingen in de musculus biceps femoris besproken.

In de controle groep (groep 1 bijlage E) waren in de haematoxyline eosine coupes van het ingevroren en van het volgens Susa gefixeerde spierweefsel geen afwijkingen aanwezig. In een gering aantal spiervezels werd subsarcolemmaal enige zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase activiteit aangetoond. Er werd geen leucine naftylamidase activiteit in de spiervezels waargenomen. Alle door ons onderzochte zure hydrolasen konden in het aanwezige bindweefsel worden aangetoond.

De hieronder beschreven afwijkingen (tabel 13 en bijlage F t.m. I), waren niet gelijkmatig in de coupes verdeeld.

De afwijkingen die in de haematoxyline eosine coupes van het volgens Susa gefixeerde materiaal werden gezien, waren eveneens in haematoxyline eosine coupes van het ingevroren materiaal aanwezig.

In spierbiopten van ratten, die 4 dagen DPPD kregen (groep 2 tabel 13 en bijlage tabel F), werd een matig aantal pathologisch veranderde spiervezels en een geringe hoeveelheid ontstekingsinfiltraat gezien (tabel 13). In de haematoxyline eosine coupes waren een matig aantal spiervezels met hyaliene veranderingen (fig. 16 en 17), een gering aantal spiervezels met flocculaire veranderingen en een gering aantal afgeronde spiervezels met zwakker of even sterk met eosine kleurend sarcoplasma als normale spiervezels aanwezig (tabel 13, bijlage tabel F).

TABEL 13. Samenvatting van een gedeelte van de resultaten van het histologisch en het enzymhistochemisch onderzoek ^a met ratten. Gemiddelden van de scores in 10 spieren ^b.

groep n = 10	<i>M. Biceps Femoris</i>						<i>M. Gastrocnemius</i>						<i>M. Rectus Femoris</i>					
	HE	ZF	β-G	NE+ E600	LN		HE	ZF	β-G	NE+ E600	LN		HE	ZF	β-G	NE+ E600	LN	
groep 2																		
spiervezels	2,0 ^c	0,7 ^d	2,0 ^c	1,6	1,2	0,4	2,0	0,9	1,8	1,5	1,4	1,0	2,0	0,8	1,8	1,4	1,3	0,9
infiltraat	0,8	0,6	0,3	0,6	0,1		1,2	1,1	0,5	0,8	0,3		1,1	0,8	0,6	0,7	0,1	
groep 3																		
spiervezels	1,6	1,5	2,2	2,0	1,4	1,0	1,6	1,6	2,4	2,3	1,7	1,3	2,0	1,6	2,3	2,1	1,7	1,1
infiltraat	2,0	1,5	0,9	1,4	0,2		2,2	1,9	1,5	1,9	1,0		2,0	1,7	1,4	1,5	0,5	
groep 4																		
spiervezels	1,2	1,2	2,1	1,9	0,8	0,6	1,0	1,1	1,9	1,7	0,6	0,5	1,3	1,5	2,2	2,1	0,9	0,3
infiltraat	1,9	1,8	1,4	1,5	0,1		1,7	1,4	1,3	1,4	0,2		1,8	1,5	1,3	1,6	0	
groep 5																		
spiervezels	1,6	0,6	1,6	1,7	0,4	0	1,3	0,6	1,3	1,5	0,4	0	1,7	0,4	1,7	1,6	0,8	0,1
infiltraat	1,0	1,0	1,0	1,0	0		1,1	1,0	0,9	0,9	0		1,0	1,0	0,7	0,9	0	

Legenda

a = alleen de gemiddelden van de hoeveelheid korrelig neerslag zijn vermeld.

b = hierbij is 0 = geen afwijkingen of geen enzymactiviteit
4 = veel afwijkingen of veel enzymactiviteit.

HE = haematoxyline eosine, ZF = zure fosfatase, β-G = β-glucuronidase, NE + E600 = E 600 resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase.

Groep 2, 3, 4 en 5 kregen respectievelijk 4, 7, 9 en ,
n = aantal spieren per groep. Groep 2, 3, 4 en 5 kregen respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD.

c = hierbij werd van de degenererende spiervezels waarvan het cytoplasma zwakker, even sterk of sterker met eosine gekleurde dan normale spiervezels (zie bijlage tabel F tot en met I, de rubrieken niet eos. en hyalien) de hoogste score genomen. Het gemiddelde van deze hoogste scores staat in tabel 13 vermeld.

d = gemiddelde van de scores van de spiervezels met flocculaire veranderingen.

e = gemiddelde van de hoeveelheid korrelig gekleurd neerslag.

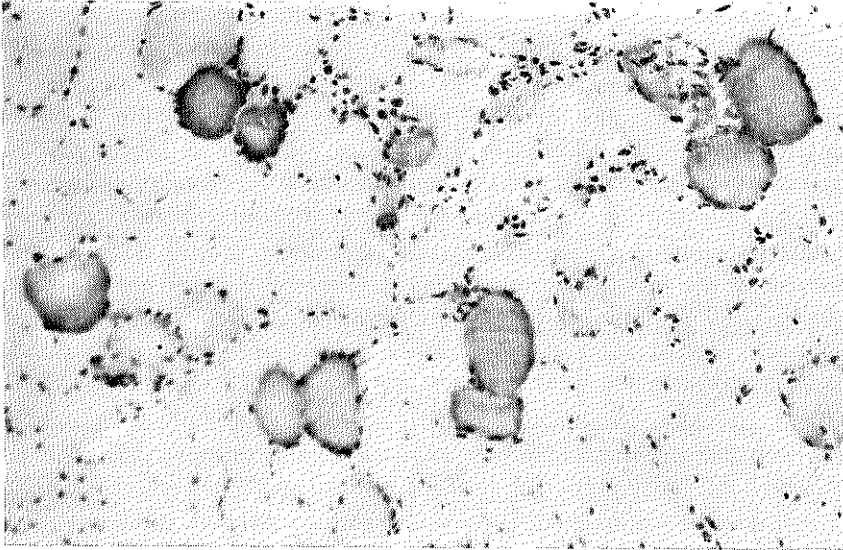


Fig. 16. E 350-72 I. HE kleuring 140 x. M. biceps femoris van een rat die 4 dagen met DPPD werd behandeld. Enkele spiervezels met hyaliene veranderingen.

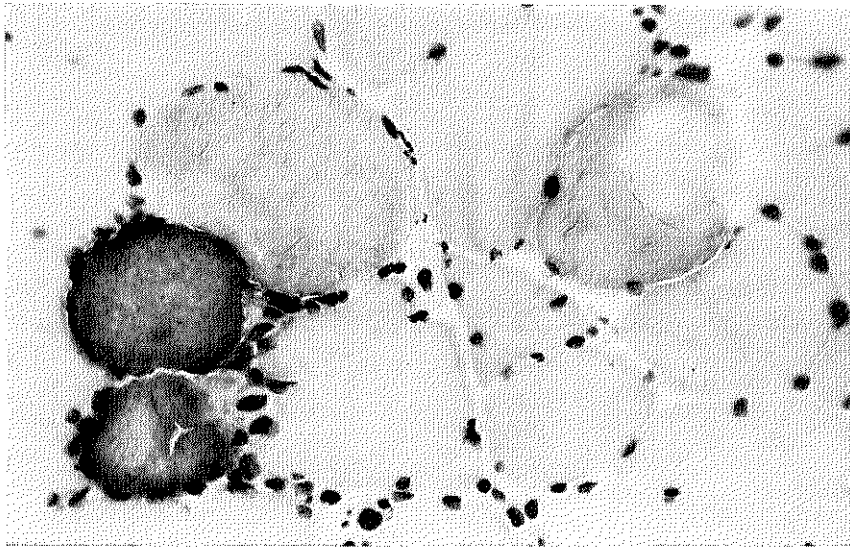


Fig. 17. E 350-72 I. HE kleuring 350 x. M. biceps femoris van een rat die 4 dagen met DPPD werd behandeld (detail van figuur 16). Twee spiervezels met hyaliene veranderingen.

In de spiervezels werd een matige zure fosfatase activiteit aangetoond (tabel 13, bijlage tabel F). Alle onderzochte zure hydrolasen waren in het ontstekingsinfiltraat aanwezig (tabel 13, bijlage tabel F).

In de spiervezels met hyaliene veranderingen was de zure fosfatase activiteit subsarcolemmaal gelocaliseerd (fig. 18). Met de histochemische zure fosfatase methode werd in de spiervezels een grofkorrelig en een niet korrelig kleurneerslag aangetoond. De laatste is in de zwart-wit foto's niet duidelijk zichtbaar. De β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase activiteiten die subsarcolemmaal in de spiervezels aanwezig waren, waren minder sterk toegenomen dan de zure fosfatase activiteit (tabel 13, bijlage tabel F). Voorts bleek dat de kleurintensiteit en de diameter van de korrels, die bij het aantonen van β -glucuronidase activiteit worden gevormd, geringer waren. In een gering aantal spiervezels was leucine naftylamidase activiteit aanwezig (tabel 13, bijlage tabel F).

De afgeronde spiervezels met zwakker of even sterk met eosine kleurend cytoplasma als normale spiervezels, toonden in principe dezelve hydrolytische enzymactiviteit als spiervezels met hyaliene veranderingen.

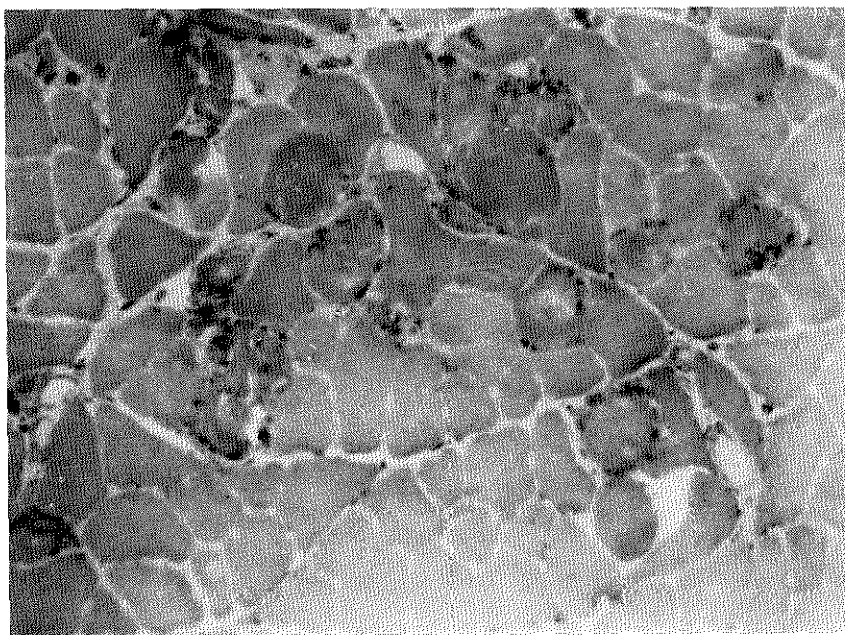


Fig. 18. E 350-72 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. *M. biceps femoris* van een rat die 4 dagen met DPPD werd behandeld. Zure fosfatase activiteit (zwart in de foto's) in pathologisch veranderde spiervezels.

Na 7 tot 9 dagen DPPD behandeling (groepen 3 en 4 tabel 13, bijlage tabel G en H) waren het aantal spiervezels met flocculaire veranderingen en de hoeveelheid ontstekingsinfiltraat in de coupes het sterkst toegenomen. Het ontstekingsinfiltraat bevond zich vaak rond de met eosine sterk kleurende spiervezels (fig. 19).

In de spiervezels en in het ontstekingsinfiltraat kon een verhoogde zure fosfatase activiteit worden aangetoond (fig. 20, 21 en 22). De zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit was zowel subsarcolemmaal als centraal in de spiervezels aanwezig. De E 600 resistente naftylesterase activiteit was in deze vezels lager dan de β -glucuronidase activiteit (tabel 13) en vrijwel steeds subsarcolemmaal gelocaliseerd. De leucine naftylamidase activiteit die subsarcolemmaal in de spiervezels aanwezig was, was het minst gestegen (tabel 13).

Bovendien werden er meerdere spiervezels met flocculaire veranderingen gezien. In de meeste vezels met flocculaire veranderingen werd met de histochemische zure fosfatase (fig. 23), β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase bepaling, een grofkorrelig en een niet korrelig neerslag gevonden. De leucine naftylamidase activiteit was in een matig aantal spiervezels met flocculaire veranderingen aanwezig, in deze vezels werd een fijnkorrelig en een niet korrelig neerslag gezien.

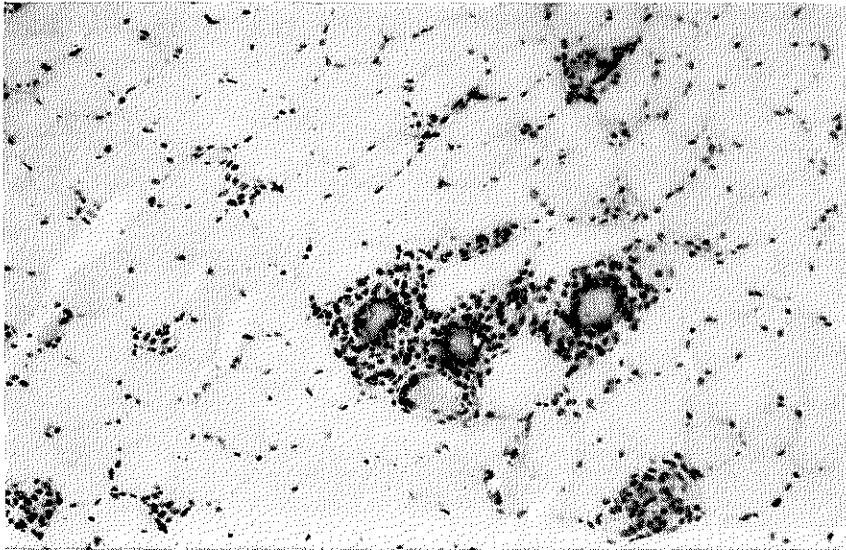


Fig. 19. E 324-72 I. HE kleuring 140 x. *M. biceps femoris* van een rat die 7 dagen met DPPD werd behandeld. Pathologisch veranderde spiervezels omgeven door ontstekingsinfiltraat.

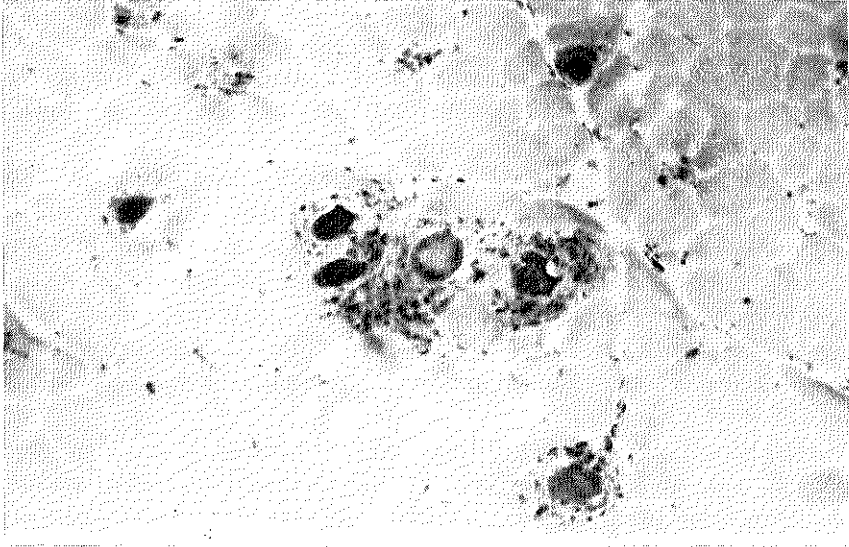


Fig. 20. E 324-72 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. *M. biceps femoris* van een rat die 7 dagen met DPPD werd behandeld (overeenkomstig gebied als figuur 19). Zure fosfatase activiteit in spiervezels en ontstekingsinfiltraat.

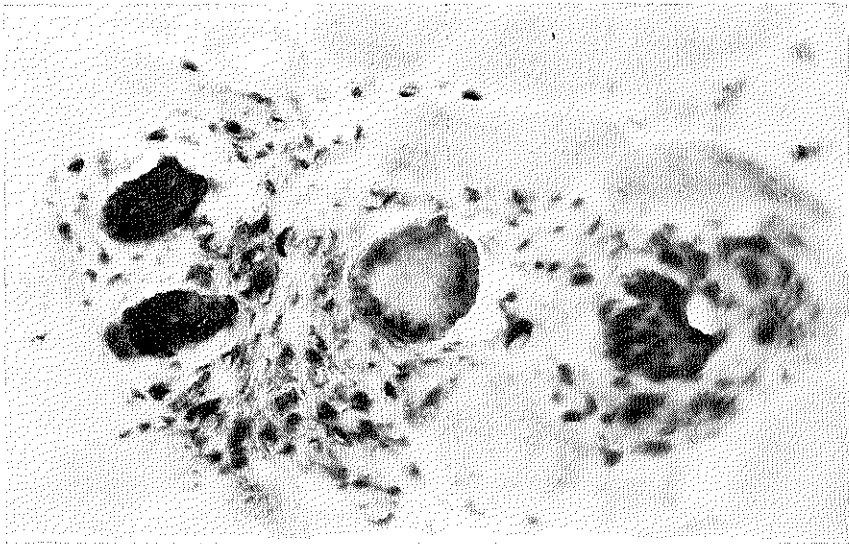


Fig. 21. E 324-72 I. Zure fosfatase bepaling 350 x. *M. biceps femoris* van een rat die 7 dagen met DPPD werd behandeld (detail van figuur 20). Hoge zure fosfatase activiteit (korrelig en niet korrelig kleurneerslag) in spiervezels en ontstekingsinfiltraat.

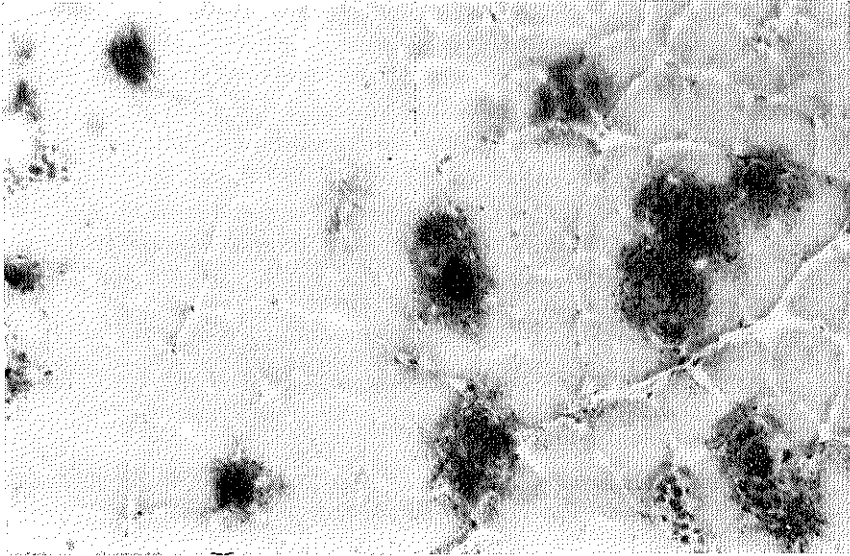


Fig. 22. E 440-72 I. Zure fosfatase bepaling 140 x. *M. biceps femoris* van een rat die 7 dagen met DPPD werd behandeld. Zeer hoge zure fosfatase activiteit in gedegeneerde spiervezels.

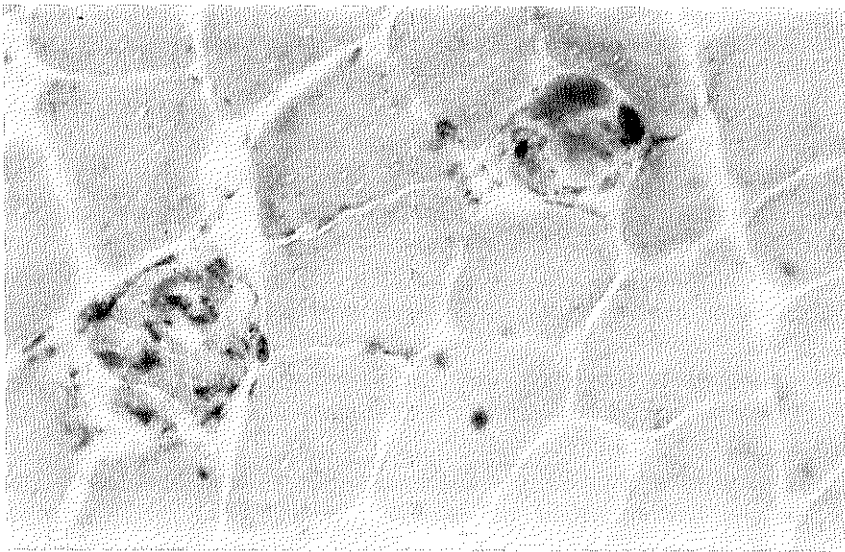


Fig. 23. E 289-72 I. Zure fosfatase bepaling 350 x. *M. biceps femoris* van een rat die 7 dagen met DPPD werd behandeld. Verhoogde zure fosfatase activiteit in een spiervezel met flocculaire veranderingen.

Na 11 dagen DPPD behandeling (tabel 13, bijlage I) namen de afwijkingen in de haematoxyline eosine coupes en de activiteit van de lysosomale enzymen in de coupes af. In de haematoxyline eosine coupes was een geringe hoeveelheid ontstekingsinfiltraat (tabel 13) en een gering aantal spiervezels met hyaliene en flocculaire veranderingen en een gering tot matig aantal atrofische spiervezels aanwezig (bijlage tabel I). In de atrofische spiervezels was meestal een geringe tot matige zure fosfatase, β -glucuronidase en een geringe E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit aantoonbaar.

6.2. STATISTISCHE BEWERKING VAN DE RESULTATEN VAN HET HISTOCHEMISCH ONDERZOEK

In de eerste plaats werd nagegaan of de enzymactiviteit in de m. biceps femoris, m. gastrocnemius en m. rectus femoris bij tenminste 1 groep ratten, die met DPPD was behandeld, verhoogd was.

Met de k-steekproeuntoets van Kruskal en Wallis werd aangetoond dat dit inderdaad het geval is. Dit gold bij zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase zowel voor het korrelig als het niet korrelig neerslag. Alleen de hoeveelheid niet korrelig neerslag, die bij het aantonen van leucine naftylamidase wordt gevormd, was niet toegenomen.

In de tweede plaats werd met de tweesteekproeuntoets van Wilcoxon nagegaan of de enzymactiviteit in 2 opeenvolgende stadia wel of niet gelijk was. In het laatste geval werd onderzocht of de enzymactiviteit in de laatste van de 2 opeenvolgende stadia verhoogd of verlaagd was.

De resultaten zijn in het linker gedeelte van tabel 14 vermeld. Uit deze tabel blijkt, dat de activiteit van zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase bij ratten die 4 dagen DPPD kregen, in het algemeen hoger was dan bij controle ratten. Voorts bleek dat de activiteit van deze enzymen bij ratten die 7 dagen DPPD kregen in veel gevallen hoger was dan bij ratten, die 4 dagen met DPPD waren behandeld. Daarentegen waren de activiteiten van deze enzymen bij ratten die 11 dagen DPPD kregen, veelal lager dan bij ratten die 9 dagen met DPPD waren behandeld.

Om na te gaan of er een correlatie tussen de toename in activiteit van 2 enzymen bestond, werd de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman berekend. De verschillende rangcorrelatiecoëfficiënten zijn in het linker gedeelte van tabel 15 vermeld.

De rangcorrelatiecoëfficiënten varieerden van 0,22 - 0,90 en waren ge-

TABEL 14. Resultaten van het onderzoek met ratten. Twee steekproeven van Wilcoxon.

Vergeleken groepen	Histochemie								Biochemie			
	ZF		β-G		NE+E600		LN		ZF	β-G	Cat	ZM
	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D				
	<i>M. Biceps Femoris</i>								<i>M. Biceps Femoris</i>			
1 en 2	A A	A H	A A	H H	A A	A A	H H	H H	H	A	A	A
2 en 3	H A	A A	A H	A H	H H	A A	H H	H H	H	A	H	H
3 en 4	H H	H H	H H	A A	a H	H H	H H	H H	H	H	H	H
3 en 4	H a	a a	H H	H H	H H	a H	a H	H H	H	a	a	H
	<i>M. Gastrocnemius</i>								<i>M. Gastrocnemius</i>			
1 en 2	A A	A A	A A	A H	A A	A A	A H	H H	A	A	A	H
2 en 3	A A	A A	A A	A H	H A	A A	H H	A H	H	A	A	H
3 en 4	H H	H H	a a	H H	a a	H a	a H	a H	H	H	H	H
4 en 5	H H	H H	H H	H H	H H	a H	a H	H H	H	H	a	H
	<i>M. Rectus Femoris</i>								<i>M. Rectus Femoris</i>			
1 en 2	A A	A H	A A	A H	A A	A A	A H	H H	H	A	A	—
2 en 3	H H	A A	A A	H A	A A	A A	H H	H H	A	A	A	—
3 en 4	H H	H a	H H	H H	a a	H H	a H	H H	a	H	H	—
4 en 5	a a	H H	a H	a H	H H	a a	H H	H H	a	H	H	—

Legenda zie tabel 13

Groep 1 = controle groep, de groepen 2, 3, 4 en 5 kregen respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD.

K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

H = de enzymactiviteit is in twee opeenvolgende groepen gelijk.

A = de enzymactiviteit is in de laatste van twee opeenvolgende groepen hoger dan in de groep die hieraan voorafgaat.

a = de enzymactiviteit is in de laatste van twee opeenvolgende groepen lager dan in de groep die hieraan voorafgaat.

— = de enzymactiviteit is niet bepaald.

middeld $0,63 \pm 0,18$ *. Hieruit kan men concluderen dat de toename van de activiteit van één enzym tamelijk vaak gepaard ging met de toename van de activiteit van een tweede enzym.

Een toename van de zure fosfatase activiteit ging vaak samen met een toename van de β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,76).

Een toename van de E 600 resistente naftylesterase activiteit ging zowel tamelijk vaak met een stijging van de zure fosfatase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,65) als met een toename van de β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,59) gepaard.

De correlaties waren bij zure fosfatase, β -glucuronidase en E 600 resistente naftylesterase voor de hoeveelheid korrelig neerslag sterker uitgesproken dan voor de hoeveelheid niet korrelig neerslag.

De rangcorrelatiecoëfficiënten waren bij het korrelig neerslag voor de paren zure fosfatase, β -glucuronidase en zure fosfatase, E 600 resistente naftylesterase en β -glucuronidase E 600, resistente naftylesterase gemiddeld respectievelijk 0,83, 0,71 en 0,71, voor het niet korrelig neerslag waren deze getallen 0,69, 0,57 en 0,48.

6.3. BIOCHEMISCH ONDERZOEK

Een vergelijking tussen de toename van zure fosfatase, β -glucuronidase, cathepsine, zure en neutrale maltase activiteit in spierhomogenaten van ratten die met DPPD waren behandeld en de statistische bewerking van de resultaten

De resultaten van het biochemisch onderzoek zijn in tabel 16 vermeld, deze werden statistisch bewerkt.

Met de k-steekproeventoets van Kruskal en Wallis werd aangetoond, dat bij minstens één van de groepen ratten, die DPPD kregen de activiteit van β -glucuronidase, cathepsine en zure maltase in de m. biceps femoris, m. gastrocnemius en m. rectus femoris was toegenomen. Daarentegen was de zure fosfatase activiteit alleen in de twee laatstgenoemde spieren bij minstens 1 groep ratten, die DPPD kreeg, significant hoger dan bij de controle groep. De neutrale maltase activiteit bleef constant.

Met de tweesteekproeventoets van Wilcoxon werd nagegaan of de enzymactiviteit in 2 opeenvolgende stadia gelijk was. Indien dit niet het

* Gemiddelde met standaard deviatie.

TABEL 15. Resultaten van het onderzoek met ratten. Rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman.

	Histochemie												Biochemie			
	Spier K			Spier D			Inf K			Inf D			ZF	β-G	Cat.	
	ZF	β-G	NE+E600	ZF	β-G	NE+E600	ZF	β-G	NE+E600	ZF	β-G	NE+E600				
<i>M. Biceps Femoris</i>																
β-G	0,85			0,72			0,83				0,55			β-G	XX	
NE+E600	0,65	0,50		0,44	0,44		0,83	0,80			0,52	0,25		Cat	XX	0,59
LN	0,48	0,54	0,41	X	X	X	X	X	X		X	X	X	ZM	XX	0,39 0,35
<i>M. Gastrocnemius</i>																
β-G	0,90			0,82			0,84				0,85			β-G	0,56	
NE+E600	0,72	0,67		0,61	0,54		0,86	0,86			0,59	0,52		Cat	0,40	0,70
LN	0,59	0,51	0,73	X	X	X	0,65	0,48	0,49		X	X	X	ZM	0,25	0,39 0,42
<i>M. Rectus Femoris</i>																
β-G	0,85			0,80			0,75				0,55			β-G	0,55	
NE+E600	0,64	0,68		0,65	0,73		0,68	0,82			0,61	0,43		Cat	0,56	0,83
LN	0,44	0,49	0,60	X	X	X	0,34	0,30	0,22		X	X	X			

Legenda

ZF = zure fosfatase, β-G = β-glucuronidase, NE+E600 = E 600 resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase, Cat = cathepsine, ZM = zure maltase.

Spier = spiervezels, Inf = infiltraat, K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

X = rangcorrelatiecoëfficiënt niet vermeld omdat uit de k-

steekproeuntoets van Kruskal en Wallis bleek dat de hoeveelheid gekleurd neerslag, die bij het aantonen van leucine nafylamidase werd gevormd, in de groepen ratten die DPPD kregen niet verhoogd was.

XX = rangcorrelatiecoëfficiënt niet vermeld omdat uit de k-steekproeuntoets van Kruskal en Wallis bleek dat de zure fosfatase activiteit in de M. biceps femoris in alle groepen ratten gelijk was.

TABEL 16. Resultaten van het biochemisch onderzoek met ratten. Gemiddelde enzymactiviteiten \pm SD.

Groepen	Zure fosfatase	β -Glucuronidase	Cathepsine	Zure maltase	Neutrale maltase	Zure maltase/ Neutrale maltase
<i>M. Biceps Femoris</i>						
1	49,7 \pm 17,0 ^{x)}	1,00 \pm 0,23	0,42 \pm 0,28	2,57 \pm 1,36	1,62 \pm 0,81	1,8 \pm 0,9
2	60,3 \pm 14,3	1,81 \pm 0,45	0,64 \pm 0,24	3,84 \pm 1,30	1,35 \pm 0,90	3,3 \pm 1,7
3	60,7 \pm 14,6	3,93 \pm 1,01	1,16 \pm 0,60	4,76 \pm 1,93	1,21 \pm 0,80	4,1 \pm 2,3
4	61,5 \pm 12,1	3,82 \pm 1,35	1,06 \pm 0,62	4,61 \pm 1,98	1,03 \pm 0,58	5,2 \pm 3,5
5	64,3 \pm 12,1	2,47 \pm 0,77	0,72 \pm 0,16	3,55 \pm 0,87	1,56 \pm 0,89	3,2 \pm 2,1
<i>M. Gastrocnemius</i>						
1	54,3 \pm 5,9	1,05 \pm 0,21	0,42 \pm 0,14	3,23 \pm 1,58	1,59 \pm 0,93	2,1 \pm 1,0
2	66,0 \pm 15,9	1,87 \pm 0,28	0,64 \pm 0,18	3,94 \pm 1,36	1,57 \pm 0,92	5,2 \pm 6,0
3	79,9 \pm 17,9	5,83 \pm 2,30	1,58 \pm 0,96	5,22 \pm 2,82	1,26 \pm 0,55	4,9 \pm 3,6
4	70,3 \pm 10,3	4,44 \pm 1,88	1,26 \pm 0,72	5,49 \pm 2,49	0,97 \pm 0,72	5,7 \pm 4,3
5	60,5 \pm 11,7	2,88 \pm 1,03	0,72 \pm 0,20	3,68 \pm 1,26	1,77 \pm 0,90	2,3 \pm 0,9
<i>M. Rectus Femoris</i>						
1	55,6 \pm 14,2	1,03 \pm 0,18	0,42 \pm 0,12	—	—	—
2	65,7 \pm 19,3	1,87 \pm 0,51	0,72 \pm 0,28	—	—	—
3	91,5 \pm 24,2	4,57 \pm 1,56	1,50 \pm 0,76	—	—	—
4	79,8 \pm 28,2	3,65 \pm 1,81	1,32 \pm 0,56	—	—	—
5	58,7 \pm 15,7	2,91 \pm 1,04	1,06 \pm 0,26	—	—	—

Legenda

Groep 1 is controle groep, de groepen 2, 3, 4 en 5 kregen respectievelijk 4, 7, 9 en 11 dagen DPPD (n is voor iedere groep 10).

^{x)} De enzymactiviteit is uitgedrukt in nmol omgezet substraat per mg weefsel per uur.

SD = standaard deviatie.

— = de enzymactiviteit is niet bepaald.

geval was werd onderzocht of de enzymactiviteit in de laatste van twee opeenvolgende stadia was toegenomen of gedaald.

De resultaten zijn in het rechter gedeelte van tabel 14 vermeld.

Het bleek, dat de biochemisch bepaalde enzymactiviteit in de laatste van 2 opeenvolgende stadia, minder vaak significant was veranderd dan de histochemisch bepaalde enzymactiviteit (vergelijk linker en rechter deel van tabel 14). In een deel van de gevallen toonde de enzymactiviteit bij het biochemisch en het histochemisch onderzoek hetzelfde beloop.

De (biochemisch bepaalde) β -glucuronidase en cathepsine activiteit was na 4 dagen DPPD behandeling hoger dan in de controle groep en na 7 dagen DPPD behandeling maximaal verhoogd. Na 11 dagen DPPD behandeling was de enzymactiviteit in de m. biceps femoris significant gedaald.

De (biochemisch bepaalde) zure fosfatase activiteit in de m. rectus femoris volgde eenzelfde patroon. Na 7 dagen DPPD behandeling was de zure fosfatase activiteit significant verhoogd, in de volgende stadia was de enzymactiviteit weer gedaald.

Om na te gaan of er een correlatie tussen de toename in activiteit van twee enzymen bestond, werden de rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman berekend. Deze zijn in het rechter gedeelte van tabel 15 vermeld en varieerden van 0,25 - 0,83, gemiddeld $0,50 \pm 0,16$ *.

Het is opmerkelijk, dat in tegenstelling tot de resultaten verkregen bij de konijnen, slechts in de helft van de gevallen nogal wat samenhang tussen de toename van de activiteit van de enzymen (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,40 - 0,70) werd gevonden. Slechts in één geval bestond er veel samenhang tussen de variabelen (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,83).

6.4. EEN VERGELIJKING TUSSEN DE RESULTATEN VAN HET HISTOCHEMISCH EN HET BIOCHEMISCH ONDERZOEK

Met de rangcorrelatiecoëfficiënt van Spearman werd nagegaan of er een correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek bestond. De resultaten zijn in tabel 17 vermeld.

De rangcorrelatiecoëfficiënten varieerden indien werd afgezien van zeer lage waarden („uitschieters”) van 0,20 - 0,78, gemiddeld $0,48 \pm 0,15$ *. Een toename van de histochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit ging tamelijk veel samen met een toename van de biochemisch bepaalde

* Gemiddelde met standaard deviatie.

TABEL 17. Resultaten van het onderzoek met ratten. Correlatiecoëfficiënten van Spearman.

Histo- chemie	<i>M. Biceps Femoris</i>				<i>M. Gastrocnemius</i>				<i>M. Rectus Femoris</i>		
	ZF	Biochemie			ZF	Biochemie			Biochemie		
		β -G	Cat	ZM		β -G	Cat	ZM	ZF	β -G	Cat
ZF											
Spier K	X	0,69	0,55	0,33	0,58	0,71	0,63	0,45	0,44	0,70	0,62
	D	X	0,72	0,58	0,27	0,59	0,78	0,55	0,40	0,46	0,61
Inf K	X	0,76	0,41	0,23	0,56	0,67	0,40	0,40	0,39	0,56	0,50
	D	X	0,57	0,38	0,12	0,38	0,41	0,08	0,22	0,41	0,54
β -G											
Spier K	X	0,71	0,55	0,34	0,51	0,74	0,65	0,38	0,51	0,69	0,68
	D	X	0,69	0,44	0,22	0,50	0,75	0,55	0,46	0,40	0,69
Inf K	X	0,71	0,35	0,07	0,45	0,74	0,45	0,37	0,53	0,55	0,49
	D	X	0,27	0,13	0,05	0,48	0,44	0,17	0,25	0,48	0,46
NE+E600											
Spier K	X	0,50	0,41	0,38	0,48	0,45	0,33	0,27	0,43	0,64	0,43
	D	X	0,51	0,31	0,24	0,46	0,47	0,28	0,23	0,34	0,57
Inf K	X	0,77	0,35	0,23	0,49	0,74	0,41	0,45	0,38	0,56	0,52
	D	X	0,72	0,33	0,25	0,43	0,76	0,38	0,32	0,32	0,59
LN											
Spier K	X	0,33	0,38	0,20	0,56	0,42	0,23	0,28	0,27	0,27	0,10
	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Inf K	X	X	X	X	0,56	0,40	0,11	0,20	0,15	0,33	0,08
	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legenda

ZF = zure fosfatase, β -G = β -glucuronidase, NE+600 = E 600 resistente naftylesterase, LN = leucine naftylamidase, ZM = zure maltase.

Spier = spiervezels, Inf = ontstekingsinfiltraat, K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

X = correlatiecoëfficiënt niet vermeld, omdat uit de k-steekproevenoets van Kruskal en Wallis bleek, dat één of beide variabelen bij geen van de met DPPD behandelde groepen ratten was toegenomen.

β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,63) en in een matig aantal gevallen samen met een toename van de cathepsine activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,55).

Een toename van de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit ging tamelijk veel samen met de histochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,65) en de E 600 resistente naftylesterase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt gemiddeld 0,60).

HOOFDSTUK 7

EEN VERGELIJKING TUSSEN DE TOENAME VAN DE ACTIVITEIT VAN ENIGE ZURE HYDROLASEN IN SPIERBIOPTEN VAN PATIENTEN

7.1. RESULTATEN VAN HET HISTOLOGISCH, HET HISTOCHEMISCH EN HET BIOCHEMISCH ONDERZOEK

In tabel 18, 19 en 20 zijn de klinische gegevens en de resultaten van het histologisch, het histochemisch en het biochemisch onderzoek van de biopten van de controle groep, van patiënten met neurogene spierziekten en primaire myopathieën samengevat.

De onderzochte groepen zijn geen aselechte steekproeven. Bovendien zijn de groepen niet homogeen samengesteld. De resultaten van het onderzoek hebben derhalve een beperkte betekenis.

De resultaten van het onderzoek bij patiënten met spierziekten werden vergeleken met de bevindingen van de controle groepen.

De meeste patiënten met een neurogene spierziekte (26 van de 30, tabel 19) waren ouder dan 10 jaar, terwijl de patiënten met de ziekte van Duchenne (11 patiënten, tabel 20) jonger dan 10 jaar waren.

De controle groep werd derhalve onderverdeeld in 2 groepen. Bij één groep waren de biopten afkomstig van patiënten die ouder dan 10 jaar waren. De biopten van de tweede groep werden genomen van kinderen die jonger dan 10 jaar waren. Dit is van belang omdat met de tweestekproeventoets van Wilcoxon werd aangetoond, dat de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit in normale biopten van kinderen (tabel 18), hoger was dan in normale biopten van volwassenen. De activiteit van zure fosfatase, cathepsine, zure en neutrale maltase was bij beide groepen gelijk. Deze bevindingen zijn te vergelijken met die van KNOOK et al., (1974 a en b), die beschreven dat de β -galactosidase activiteit in Kupfercellen bij jonge gezonde ratten hoger was dan bij oude ratten, terwijl de activiteit van zure fosfatase en zure ribonuclease bij beide groepen niet significant verschilde.

Aangezien met histochemische methoden in de pathologisch veranderde spiervezels in het algemeen geen of slechts geringe β -glucuronidase, E 600 resistente naftylesterase en leucine naftylamidase activiteit werd gevonden,

TABEL 18. Resultaten van het onderzoek bij spierziekten van patiënten (normaal spierweefsel).

Leeftijd *	Geslacht	Duur klachten *	Spiersoort **	Biopsie nr.	Histologie			Histochemie (zure fosfatase)			Biochemie								
					Afw. spierv.	Inf.	Bindw.	Spierv.	Inf.	Bindw.	ZF	β -G	Cat.	ZM	ZM : NM	NM			
Groep 1a								K	D	K	D	K	D						
12	v	2	2	B304	0	0	1 ^a	0	0	0	0	1	0	25,6***	1,20	0,43	5,01	0,40	12,6
13	v	2	1	B349	0	0	1	0	0	0	0	1	0	26,8	0,80	0,57	2,56	0,60	4,3
14	v	2	1	B376	0	0	1	0	0	0	0	1	0	29,2	0,95	0,71	4,07	1,13	3,6
16	v	5	1	B354	0	0	1	0	0	0	0	1	0	50,8	1,45	0,57	5,82	0,75	7,7
17	m	2	1	B386	0	0	1	0	0	0	0	1	0	23,6	1,10	0,71	2,71	0,72	3,8
18	m	1	1	B398	0	0	1	0	0	0	0	1	0	15,2	0,65	0,87	6,33	1,19	5,3
19	v	1	1	B353	0	0	0	0	0	0	0	1	0	16,0	0,80	0,71	—	—	—
23	m	2	4	B352	0	0	1	0	0	0	0	1	0	25,2	1,05	0,71	4,53	0,60	7,5
28	m	½	1	B340	0	0	1	0	0	0	0	1	0	5,6	0,95	0,85	2,97	0,67	4,4
28	m	1	1	B317	0	0	1	0	0	0	0	1	0	8,8	1,15	0,71	5,58	1,41	3,9
28	v	16	1	B303	0	0	1	0	0	0	0	1	0	39,3	0,76	1,13	4,23	0,95	4,4
30	m	¼	1	B300	0	0	1	0	0	0	0	1	0	31,6	0,88	1,13	4,01	0,32	12,2
31	v	18	1	B312	0	0	1	0	0	0	0	1	0	8,8	0,90	0,57	2,01	0,14	13,5
32	v	5	1	B348	0	0	1	0	0	0	0	1	0	21,0	0,88	1,04	2,86	0,62	4,6
33	m	1½	1	B389	0	0	1	0	0	0	0	1	0	54,0	0,90	0,85	5,14	1,37	3,8

33	v	2	4	B314	0	0	1	0	0	0	0	1	0	16,4	0,75	1,28	4,46	1,27	3,5
36	m	5	1	B288	0	0	1	0	0	0	0	1	0	26,9	0,82	0,96	4,33	0,92	4,7
39	m	4	1	B276	0	0	1	0	0	0	0	1	0	22,2	0,97	1,48	5,66	1,08	5,3
47	v	2	4	B391	0	0	1	0	0	0	0	1	0	13,6	0,60	0,71	—	—	—
48	v	1	1	B399	0	0	1	0	0	0	0	1	0	12,0	0,90	0,85	4,97	0,57	8,9
55	v	22	7	B290	0	0	1	0	0	0	0	1	0	16,4	0,50	0,09	2,91	1,00	2,9
56	v	4	1	B287	0	0	1	0	0	0	0	1	0	18,7	0,65	1,74	2,93	0,78	3,8
58	v	¼	7	B362	0	0	1	0	0	0	0	1	0	16,4	0,75	0,71	3,01	—	—
Groep 1b																			
¾	m	¼	6	B245	0	0	1	0	0	0	0	1	0	17,6	1,15	0,43	—	—	—
¾	m	¾	1	B400	0	0	1	0	0	0	0	1	0	21,6	1,65	0,43	—	—	—
1¾	v	¾	1	B346	0	0	1	0	0	0	0	1	0	9,6	1,30	0,43	5,72	0,14	38,5
2¼	m	½	2	B267	0	0	1	0	0	0	0	1	0	18,7	1,76	1,39	—	—	—
2¾	m	1	1	B359	0	0	1	0	0	0	0	1	0	17,2	1,65	0,71	3,79	—	—
3	v	¼	1	B278	0	0	1	0	0	0	0	1	0	23,4	1,23	1,13	3,90	1,38	2,8
3¾	m	¾	5	B394	0	0	1	0	0	0	0	1	0	10,0	0,90	0,43	—	—	—
8¾	v	¼	1	B264	0	0	1	0	0	0	0	1	0	30,4	1,40	0,57	3,12	0,89	3,5

Legenda

Groep 1a = biopten van personen ouder dan 10 jaar.

Groep 1b = biopten van personen jonger dan 10 jaar.

* De leeftijd en de duur van de klachten is uitgedrukt in jaren.

** 1 = m. quadriceps, 2 = m. tibialis posterior, 3 = m. triceps, 4 = m. deltoideus, 5 = m. adductor, 6 = m. rectus abdominis, 7 = m. biceps.

*** enzymactiviteit uitgedrukt in nmol omgezet substraat per mg weefsel per uur.

afw. spiervezels = aantal pathologisch veranderde spiervezels; Inf. = infiltraat; Bindw. = bindweefsel; K = korrelig D = niet korrelig.

ZF = zure fosfatase; β -G = β -glucuronidase; Cat. = Cathepsine; ZM = zure maltase; NM = neutrale maltase.

a = er is een geringe hoeveelheid bindweefsel.

— = de enzymactiviteit werd niet bepaald.

werden de resultaten van het histochemisch onderzoek van deze enzymen niet vermeld.

In navolging van MIRANDOLLE (1972) werden de biopten van patiënten met neurogene spierziekten (tabel 19) onderverdeeld in een groep (2a), die bij histologisch onderzoek uitsluitend neurogene afwijkingen (groepen hoekige atrofische spiervezels) toonden en in een groep (2b), die bovendien myogene afwijkingen (variatie in diameter van de afgeronde spiervezels) toonden. Deze laatste afwijkingen worden bij langdurig bestaande denervatie gezien (HAASE en SHY, 1960; DRACHMAN et al., 1967 en VAN WIJNGAARDEN en BETHLEM, 1973). Ook uit ons materiaal (tabel 19) bleek dat de gemiddelde duur van de klachten bij patiënten van de laatste groep (gemiddelde duur van de klachten 5 jaar) langer was dan bij patiënten met uitsluitend neurogene afwijkingen (gemiddelde duur van de klachten 2,5 jaar).

In de atrofische spiervezels van de biopten van beide groepen patiënten met neurogene afwijkingen (tabel 19) werd een toename van de zure fosfatase activiteit gevonden (fig. 24). Zowel de hoeveelheid korrelig neerslag als de hoeveelheid niet korrelig neerslag die bij het aantonen van zure fosfatase activiteit wordt gevormd was toegenomen (fig. 25).

Volgens KAR en PEARSON (1972 a en b) was de activiteit van zure hydrolasen alleen in homogenaten van biopten met matige of ernstige histologische afwijkingen toegenomen. Bij ons onderzoek werd dit alleen voor gevallen met tenminste een matige (histochemisch bepaalde) zure fosfatase activiteit in spiervezels en/of infiltraat nagegaan (tabel 21). Het bleek dat de β -glucuronidase, cathepsine en zure maltase activiteiten in biopten met (histologisch) uitsluitend neurogene afwijkingen (groep 1 a) waren toegenomen. Bij biopten met neurogene afwijkingen en een myogene component gold dit alleen voor de β -glucuronidase activiteit (tabel 21).

In de haematoxyline eosine coupes van patiënten met de ziekte van Duchenne (groep 3a) werden veel afgeronde vezels gezien waarvan de diameter sterk varieerde. Bovendien was de hoeveelheid bindweefsel steeds toegenomen (tabel 20).

In de afgeronde spiervezels was in het algemeen een matige toename van de zure fosfatase activiteit aantoonbaar (tabel 20, fig. 26 en 27).

In sommige degenererende spiervezels was de activiteit van de zure hydrolasen sterk toegenomen (fig. 26 en 28). Het is interessant dat in de sarcoplasma massa van de spiervezels (fig. 29) een belangrijke toename van de zure fosfatase activiteit werd aangetoond.

Bij biochemisch onderzoek (tabel 20 en 21) bleek, dat bij de ziekte van

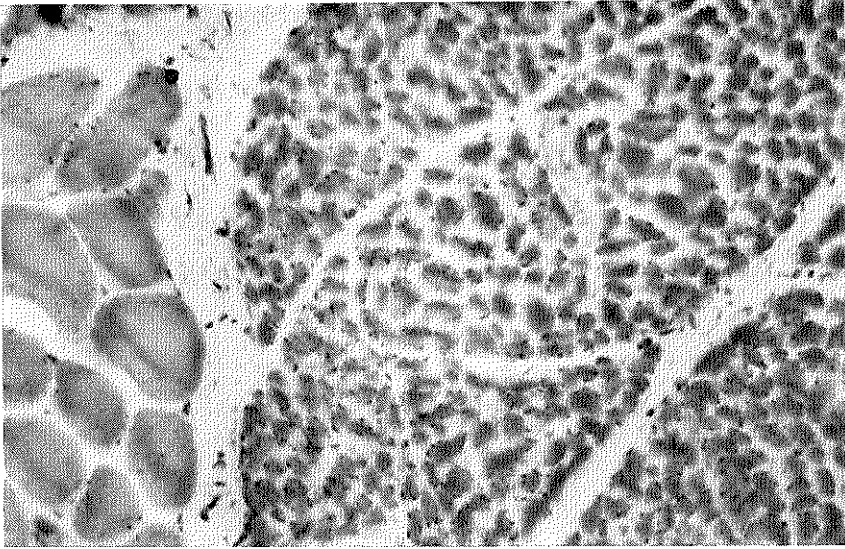


Fig. 24. B 311. Zure fosfatase bepaling 140 x. M. quadriceps femoris. Spierbiopt waarop de diagnose neurogene spierziekte is gesteld. Verhoogde zure fosfatase activiteit in de atrofische spiervezels.

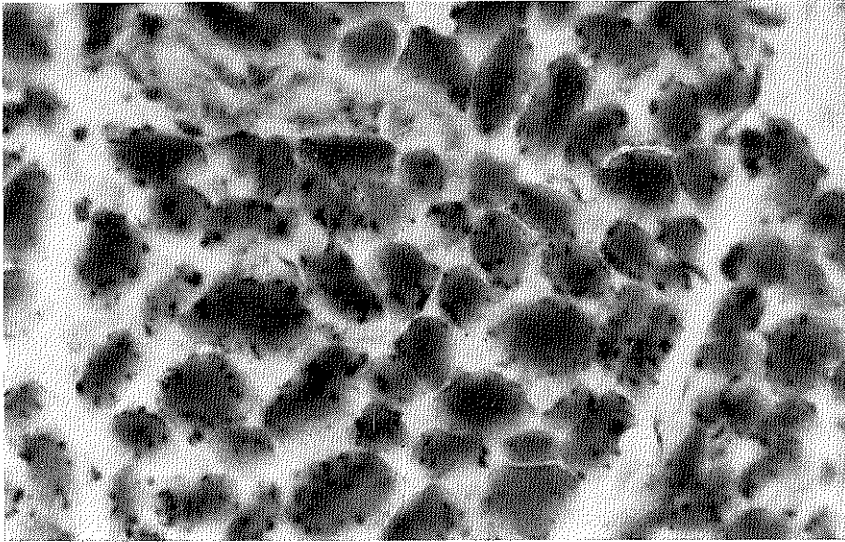


Fig. 25. B 311. Zure fosfatase bepaling 350 x. M. quadriceps femoris (detail van figuur 24). Spierbiopt waarop de diagnose neurogene spierziekte is gesteld. Atrofische spiervezels met een toename van de hoeveelheid korrelig en niet korrelig kleurneerslag, wijzend op zure fosfatase activiteit.

TABEL 19. Resultaten van het onderzoek bij spierziekten van patiënten (neurogene spierziekten).

Leeftijd *	Geslacht	Duur klachten *	Klin. diagn.	Spieroort **	Biopsie nr.	Histologie			Histochemie (zure fosfatase)			Biochemie								
						Afw. spierv.	Inf.	Bindw.	Spierv.	Inf.	Bindw.	ZF	β -G	Cat.	ZM	NM	ZM : NM			
Groep 2a									K	D	K	D	K	D						
1¼	m	1	a	1	B325	3 ^p	0 ^p	1 ^p	2 ^q	1	0	0	1	0	14,8	1,10	0,28	2,46	—	—
1¼	v	¼	b	1	B430	3	0	2	3	2	0	0	1	0	11,6	2,45	0,71	—	—	—
8½	m	8	a	2	B242	2	0	1	1	1	0	0	1	0	16,8	2,10	1,14	—	—	—
19	v	1	c	1	B301	2	1	2	2	1	0	0	2	0	16,4	1,05	0,70	1,14	0,41	2,8
19	m	15	a	1	B238	2	0	2	0	0	0	0	2	0	7,2	1,30	0,71	—	—	—
26	m	¼	c	3	B358	2	0	2	2	1	0	0	1	0	14,0	0,94	1,04	11,03	0,18	63,0
33	v	¼	c	1	B330	3	0	1	2	2	0	0	1	0	16,4	0,88	1,91	—	—	—
38	v	35	c	2	B283	1	0	1	2	1	0	0	0	0	24,6	0,65	1,31	4,72	0,63	7,5
39	v	2	c	1	B275	1	0	1	1	1	0	0	1	0	21,5	1,14	2,00	7,46	1,58	4,8
45	v	14	c	3	B350	1	0	2	1	1	0	0	2	0	20,6	0,64	1,22	4,91	0,88	5,6
46	m	¾	c	1	B361	2	0	1	2	1	0	0	1	0	32,0	2,05	1,70	6,36	—	—
46	m	4	c	5	B280	1	0	0	0	0	0	0	1	0	21,6	1,00	1,14	6,42	0,46	14,0
47	v	3	c	1	B311	3	0	1	3	2	0	0	2	0	50,3	1,32	1,39	8,61	1,81	4,8
62	m	¼	c	3	B408	2	0	2	1	1	0	0	1	0	27,6	1,05	0,85	5,03	1,01	5,0
63	m	½	c	2	B439	2	0	2	2	1	0	0	1	0	21,2	1,85	2,27	12,39	0,97	12,9

63	m	4	c	1	B240	3	0	2	3	2	0	0	1	0	38,6	1,98	7,66	7,88	1,39	5,7
64	m	4	c	1	B388	2	0	1	2	1	0	0	1	0	36,8	0,88	0,87	5,54	1,11	5,0
69	m	18	c	1	B364	1	0	1	1	1	0	0	1	0	16,4	0,67	0,78	9,55	1,22	7,8
71	v	$\frac{1}{4}$	c	3	B299	1	0	1	1	1	0	0	1	0	18,2	0,88	1,22	3,26	0,90	3,6
72	m	$\frac{1}{4}$	c	3	B432	2	0	1	2	1	0	0	1	0	26,4	1,75	1,70	5,33	1,11	4,8
78	v	?	c	1	B326	2	0	1	2	1	0	0	1	0	25,7	0,88	1,91	—	—	—

Groep 2b

$\frac{1}{2}$	v	$\frac{1}{2}$	b	1	B369	3	0	1	3	3	0	0	1	0	41,6	1,41	1,13	9,86	—	—
17	m	2	c	1	B272	3	1	1	2	2	1	0	1	0	25,7	2,84	1,04	3,15	1,52	2,1
18	m	4	c	1	B406	2	0	1	2	1	0	0	2	0	18,8	2,40	0,71	5,42	—	—
18	v	8	a	1	B378	3	0	2	3	3	0	0	2	0	15,6	1,35	0,85	4,53	0,48	9,5
19	m	$\frac{1}{2}$	a	1	B403	2	1	2	1	1	1	1	2	0	10,4	1,55	0,57	—	—	—
26	v	2	c	1	B415	2	0	2	3	2	0	0	1	0	25,2	2,05	0,85	4,73	0,78	6,1
37	m	12	c	2	B419	1	0	1	1	1	0	0	1	0	28,8	1,45	0,99	4,53	1,03	4,4
45	m	28	a	1	B231	3	0	1	3	1	0	0	1	0	15,8	1,58	1,83	4,08	1,62	2,5

Legenda: zie tabel 18.

Klin. diagn. = klinische diagnose.

Groep 2a = biopten met uitsluitend neurogene afwijkingen.

Groep 2b = biopten met neurogene afwijkingen en een myogene component.

ad. klinische diagnose:

a = juveniele vorm van spinale spieratrofie.

b = infantiele vorm van spinale spieratrofie.

c = alleen bekend, dat er een aandoening van het perifere motorisch neuron bestond.

v 0, 1, 2 en 3 betekenen geen, geringe, matige of sterke toename van het aantal afwijkende spiervezels, de hoeveelheid ontstekingsinfiltraat en bindweefsel.

m 0, 1, 2 en 3 betekenen geen, geringe, matige of sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL 20. Resultaten van het onderzoek bij spierziekten van patiënten (primaire myopathieën).

92

Leeftijd *	Geslacht	Duur klachten *	Klin. diagn.	Spiersoort **	Biopsie nr.	Histologie			Histochemie (zure fosfatase)						Biochemie						
						Spierv.	Inf.	Bindw.	Afw. spiev.		Inf.		Bindw.		ZF	β-G	Cat.	ZM	NM	ZM : NM	
Groep 3a									K	D	K	D	K	D							
3½	m	1	d	1	B425	3p	1p	1p	2	2	1	1	1	0	32,0	2,70	0,71	—	—	—	
5	m	2½	d	1	B377	3	1	2	2	1	1	1	1	0	22,0	2,72	1,13	8,03	1,58	5,1	
5¼	m	3	d	1	B327	3	1	1	2	1	1	1	1	0	36,2	3,28	1,15	9,46	0,80	11,9	
5¼	m	?	d	1	B271	2	1	2	2	1	1	0	2	0	42,1	2,34	1,65	7,15	2,12	3,14	
5½	m	¼	d	1	B284	3	0	2	2	1	1	0	2	0	15,0	2,43	0,87	—	—	—	
7	m	5	d	1	B426	2	2	2	2	1	1	1	2	0	36,8	4,10	1,28	—	—	—	
7½	m	4	d	1	B262	3	0	2	2	2	0	0	2	0	26,0	3,33	2,39	—	—	—	
7½	m	5	d	1	B297	3	0	3	2	2	0	0	2	0	17,0	2,84	0,87	1,96	—	—	
8	m	2	d	1	B436	3	0	2	2	1	0	0	2	0	14,8	2,65	0,57	4,70	1,75	2,7	
9¼	m	5	d	1	B392	3	0	2	2	1	0	0	2	0	29,6	3,35	0,85	2,79	0,93	3,0	
9¾	m	4	d	1	B441	3	0	2	2	2	0	0	2	0	27,6	2,90	1,65	2,02	1,23	1,64	
Groep 3b									K	D	K	D	K	D							
¼	m	¼	f	6	B339	3	0	0	3	3	0	0	1	0	44,5	1,43	0,44	0,00	0,94	—	
3	v	½	e	1	B413	0	2	1	0	0	2	1	1	0	51,6	4,10	—	—	—	—	
3¼	v	1	g	1	B315	2	0	1	2	1	0	0	1	0	19,9	2,20	0,87	6,22	1,47	4,2	
3¾	v	¾	g	1	B396	3	0	2	2	1	0	0	2	0	28,8	3,90	1,28	4,12	1,22	3,4	
4½	v	¼	e	1	B366	1	1	1	1	1	1	1	1	1	30,0	0,70	1,04	4,63	1,24	3,7	
5¾	v	2	g	1	B381	2	1	1	1	1	1	1	1	1	18,7	1,35	0,78	9,16	1,19	7,7	
12¾	v	11	g	1	B397	2	0	2	2	1	0	0	2	0	19,4	1,14	0,52	7,10	0,87	8,2	
22¼	v	22	g	2	B393	1	0	1	0	0	0	0	0	0	13,6	0,50	0,43	—	—	—	
28	m	?	f	1	B285	1	0	1	2	2	0	0	1	0	38,6	1,47	2,35	5,64	1,08	5,3	
51	m	2	f	1	B337	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32,8	1,17	0,56	7,88	1,50	5,3	
57	m	2	e	5	B321	0	2	2	0	0	2	1	2	0	18,0	2,60	1,42	5,49	1,07	5,1	

Legenda: zie tabel 18 en 19.

Groep 3a = patiënten met de ziekte van Duchenne.

Groep 3b = patiënten met overige primaire myopathieën.

ad. klinische diagnose:

d = ziekte van Duchenne.

e = polymyositis.

f = glycogeenstapelingsziekte.

g = alleen bekend dat er een primaire myopathie bestond.

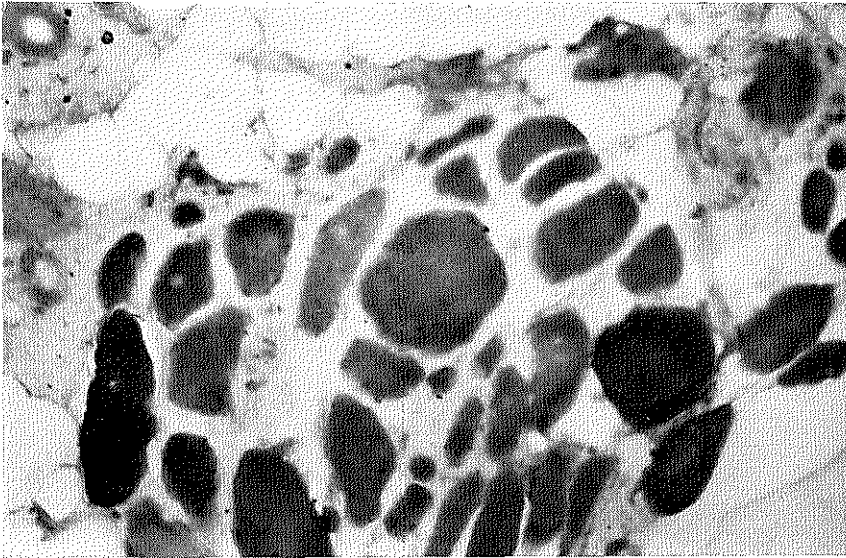


Fig. 26. B 441. Zure fosfatase bepaling 140 x. M. quadriceps femoris. Spierbiopt waarop de diagnose primaire myopathie is gesteld. Toename van de zure fosfatase activiteit in pathologisch veranderde spiervezels.

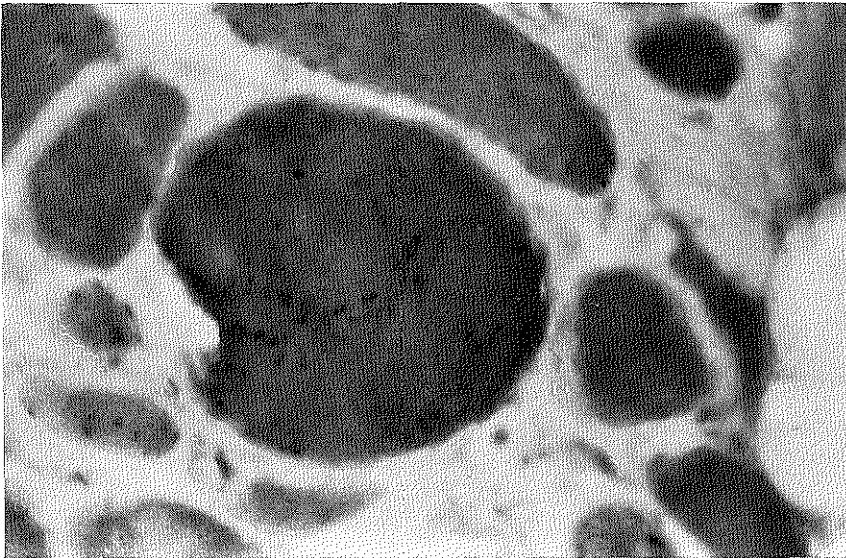


Fig. 27. B 441. Zure fosfatase bepaling 350 x. M. quadriceps femoris (detail figuur 26). Spierbiopt waarop de diagnose primaire myopathie is gesteld. Enige toename van de zure fosfatase activiteit in een pathologisch veranderde spiervezel.

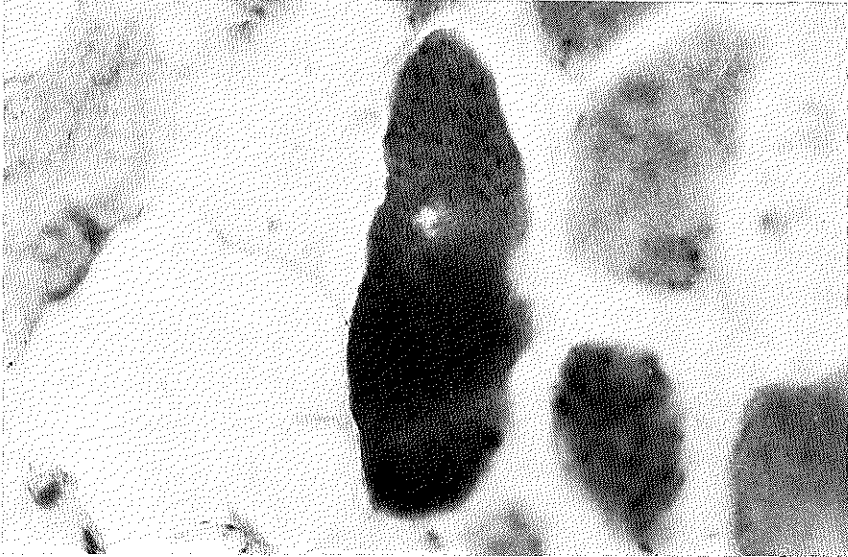


Fig. 28. B 441. Zure fosfatase bepaling 350 x. M. quadriceps femoris (detail figuur 26). Spierbiopt waarop de diagnose primaire myopathie is gesteld. Pathologisch veranderde spiervezels met een aanzienlijke toename van de zure fosfatase activiteit. Er is vooral een grote hoeveelheid niet korrelig neerslag.



Fig. 29. B 441. Zure fosfatase bepaling 350 x. M. quadriceps femoris (detail figuur 26). Spierbiopt waarop de diagnose primaire myopathie is gesteld. Spiervezel met sarcoplasma massa met een belangrijke toename van de hoeveelheid korrelig en niet korrelig kleureerslag.

Duchenne de β -glucuronidase, cathepsine en zure maltase activiteit verhoogd was. Evenals bij patiënten met neurogene spierziekten waren de zure fosfatase en de neutrale maltase activiteit niet toegenomen. (Indien de zure fosfatase activiteit met naftol-AS-BI-fosfaat was bepaald, dan was er mogelijk wel een toename van de activiteit van dit enzym gevonden (zie hoofdstuk 5 paragraaf 6).

Bij de overige patiënten met een primaire myopathie (groep 3b) werden bij histologisch en histochemisch onderzoek in het algemeen geringe tot matige afwijkingen gevonden.

In het biopt van één patiënt met een zure maltase deficiëntie (B 339) was in vrijwel alle spiervezels veel glycogeen gestapeld. Bovendien was de zure fosfatase activiteit in de spiervezels sterk verhoogd.

Bij biochemisch onderzoek (tabel 20 en 21) bleek, dat de β -glucuronidase en cathepsine activiteit in biopten van patiënten met een primaire myopathie, met matige of ernstige afwijkingen in de coupes, gestegen was.

TABEL 21. Resultaten van het biochemisch onderzoek bij spierbiopten van patiënten met tenminste matige zure fosfatase activiteit in de coupes.

Tweesteekeproventoets van Wilcoxon

Vergeleken groepen*	ZF	β -G	Cat.	ZM
2a en 1a	H ₁	A ₁	A ₁	A ₁
2b en 1a	H ₁	A ₁	H ₁	H ₁
3a en 1b	H ₁	A ₁	A ₁	A ₁
3b en 1b	H ₁	A ₁	A ₁	X

Legenda

ZF = zure fosfatase.

β -G = β -glucuronidase.

Cat. = cathepsine.

ZM = zure maltase.

Groep 1a en 1b zijn biopten van de controle groep van patiënten respectievelijk jonger en ouder dan 10 jaar.

Groep 2a biopten van patiënten met een neurogene spierziekte.

Groep 2b biopten van patiënten met een neurogene spierziekte en een myogene component.

Groep 3a biopten van patiënten met de ziekte van Duchenne.

Groep 3b biopten van patiënten met de overige primaire myopathieën.

* Van alle groepen zijn de biopten met minstens een matige zure fosfatase activiteit in spiervezels of infiltraat genomen.

H₁ De enzymactiviteit is in biopten met matige toename van de zure fosfatase activiteit in de coupes gelijk aan de controle groep (zie blz. 47).

A₁ De enzymactiviteit is in biopten met matige toename van de zure fosfatase hoger dan in de controle groep (zie blz. 47).

X De hypothesen zijn niet getoetst omdat in groep 3b de zure maltase activiteit vaak niet was bepaald.

7.2. EEN VERGELIJKING TUSSEN DE BIOCHEMISCH BEPAALDE ACTIVITEITEN VAN ZURE FOSFATASE, β -GLUCURONIDASE, CATHEPSINE EN ZURE MAL-TASE ONDERLING EN EEN VERGELIJKING TUSSEN DE ACTIVITEIT VAN DEZE ENZYMEN MET DE HISTOCHEMISCH BEPAALDE ZURE FOSFATASE ACTIVITEIT

Met Spearman's rangcorrelatiecoëfficiënt werd bij 2 groepen nagegaan of de toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één enzym gepaard ging met de toename van de biochemisch bepaalde activiteit van een tweede enzym.

De eerste groep bestond uit alle biopten van patiënten die jonger dan 10 jaar waren, de tweede groep omvatte alle biopten van patiënten die ouder dan 10 jaar waren.

Bij de eerste groep kon een dergelijke correlatie nooit worden aangetoond (de rangcorrelatiecoëfficiënten waren steeds kleiner dan 0,40).

Bij de tweede groep bestond er een matige samenhang tussen de biochemisch bepaalde β -glucuronidase en cathepsine activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,52) en tussen de biochemisch bepaalde zure maltase en cathepsine activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,50).

Bij het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek werd nagegaan, of er een correlatie tussen de hoeveelheid korrelig neerslag — die bij het aantonen van zure fosfatase activiteit in de spiervezels wordt gevormd — en de bevindingen van het biochemisch onderzoek kon worden aangetoond.

Bij patiënten ouder dan 10 jaar ging de histochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit in een matig aantal gevallen samen met een toename van de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,52). Dit gold *zowel* voor patiënten met een *primaire myopathie* als voor patiënten met een *neurogene spierziekte*.

Indien als steekproef *alle* biopten van patiënten jonger dan 10 jaar werd genomen, dan kon een dergelijke correlatie niet worden aangetoond. *Alleen* bij patiënten jonger dan 10 jaar met een *primaire myopathie* ging de histochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit in een matig aantal gevallen samen met de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit (rangcorrelatiecoëfficiënt 0,50).

DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Het zou interessant geweest zijn om dit onderzoek bij proefdieren met een primaire myopathie en bij proefdieren met een neurogene spierziekte te verrichten. Een neurogene spierziekte bij proefdieren was als model echter niet geschikt, omdat bij dit type aandoeningen de activiteit van zure hydrolasen niet of slechts in geringe mate is toegenomen (WEINSTOCK en LUKACZS, 1965; WEINSTOCK en IODICE, 1969).

De door ons gevonden sterke stijging in activiteit van zure hydrolasen bij vitamine E deficiëntie (tabel 8) is in overeenstemming met de in de literatuur vermelde gegevens (tabel 2 en WEINSTOCK en IODICE, 1969). Volgens TELFORD (1971) zijn de verschillende spieren bij vitamine E deficiëntie niet in dezelfde mate aangedaan. Op grond hiervan was het niet uit te sluiten, dat de toename van de activiteit in aerobe spieren significant zou kunnen verschillen van de toename van de activiteit van anaerobe spieren. Dit kon echter noch bij het histochemisch onderzoek (tabel 5), noch bij het biochemisch onderzoek (tabel 8) worden aangetoond. Indien een dergelijk verschil wel was gevonden, dan zou dit betekend hebben dat de rangcorrelatiecoëfficiënten van Spearman (tabel 7 en 9) voor de *m. soleus* (aeroob) en *m. plantaris* (anaeroob) significant zouden verschillen. De kans dat de activiteitstoename van één enzym gepaard ging met een stijging van de activiteit van een tweede enzym zou dan voor beide spieren niet gelijk zijn (DE JONGE, 1963).

WEST en MASSON (1955), beschreven dat bij vitamine E deficiëntie het diafragma relatief gespaard bleef. Daarentegen laten de waarnemingen van TELFORD (1971) en die van ons (tabel 5 en 8) duidelijk zien dat de afwijkingen in het diafragma niet geringer zijn dan in de andere spieren.

De door ons bij het histochemisch onderzoek gevonden stijging in activiteit van zure hydrolasen in rattenspieren na toediening van DPPD (tabel 13) komt overeen met de bevindingen van ANDERSON en SONG (1966) en van JASMIN en GAREAU (1961) respectievelijk voor zure fosfatase en voor leucine aminopeptidase. Deze histochemisch gevonden stijging in activiteit wordt gesteund door onze biochemische waarnemingen (tabel 16).

Aangezien de samenstelling van de onderzochte groepen patiënten niet

aselect en zeer heterogeen is (tabel 18, 19 en 20) heeft het statistisch onderzoek van het patiënten materiaal een beperkte betekenis.

Voor de beantwoording van de 4 vragen die in de inleiding zijn gesteld is derhalve alleen gebruik gemaakt van de resultaten van het dierexperimenteel onderzoek.

Vraag 1. *De correlatie tussen de toename van de histochemisch bepaalde activiteit van zure hydrolasen.*

Verreweg de meeste histochemici nemen zonder meer aan, dat wanneer de activiteit van één lysosomaal enzym is toegenomen dit ook geldt voor de activiteit van andere zure hydrolasen (hoofdstuk 2). Het is echter de vraag of deze veronderstelling juist is. In de eerste plaats is uit resultaten van onderzoekingen van BOWERS (1971) gebleken, dat er twee populaties lysosomen bestaan. Sommige hydrolasen zijn uitsluitend of voornamelijk in één populatie lysosomen aanwezig. Indien bij een pathologisch proces slechts één van beide groepen in aantal is toegenomen, dan is alleen de activiteit van die zure hydrolasen verhoogd, die zich in deze ene populatie lysosomen bevindt.

Bovendien geven de conventionele technieken geen betrouwbare informatie over de activiteit van zure hydrolasen, omdat slechts de activiteit van de aan of in de lysosomen gebonden enzymen aangetoond worden. Uit het onderzoek van MELJER (1972 b), bleek dat de zure fosfatase activiteit in pathologisch veranderde spieren voor een aanzienlijk gedeelte extralysosomaal (vrij) in het cytoplasma gelocaliseerd is.

Uit de resultaten van het hier beschreven onderzoek bleek, dat wanneer de histochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase verhoogd was (tabel 7 en 15), ook de activiteit van een tweede zure hydrolase was toegenomen.

Indien de activiteit van de zure hydrolasen sterk was gestegen (tabel 5), dan ging de toename van de activiteit van één van de onderzochte zure hydrolasen gepaard met een activiteitstoename van de overige onderzochte zure hydrolasen (tabel 7).

De eerste vraag kan dus voor skeletspieren bevestigend beantwoord worden.

Tevens bleek dat de E 600 resistente naftylesterase activiteit, die bij beide proefdiermodellen gestegen was (tabel 5 en 13), zich gedraagt als een lysosomaal enzym. Dit is in overeenstemming met o.a. de bevindingen van SHIBKO en TAPPEL (1964).

Het feit dat de leucine naftylamidase activiteit was toegenomen, geeft steun aan de mening van o.a. BARRETT (1969), CHAYEN (1971) en

BITENSKI et al., (1973) dat we hier met een lysosomaal enzym te maken hebben.

Vraag 2. *De correlatie tussen de toename van de biochemisch bepaalde activiteit van zure hydrolasen.*

In het algemeen ging een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase gepaard met een toename van de activiteit van een tweede doch niet met meerdere zure hydrolasen (tabel 7 en 15). Dit komt o.a. doordat de zure fosfatase activiteit, bepaald met 4-methylumbelliferylfosfaat, relatief weinig was gestegen t.o.v. de β -glucuronidase activiteit (tabel 10) (later wordt hierop verder ingegaan).

De neutrale maltase activiteit was in tegenstelling tot de zure maltase activiteit niet gestegen (tabel 8 en 16). Hierdoor was het quotient zure maltase/neutrale maltase, dat bij zure maltase deficiëntie in de spier verlaagd is (KOSTER et al., 1972) niet afgenomen.

Vraag 3. *De correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en biochemisch onderzoek.*

Er bestond bij de vitamine E deficiënte konijnen een goede en bij de met DPPD behandelde ratten een matige correlatie tussen de histochemisch en biochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit (tabel 9 en 17). Dit laatste kon ook voor de β -glucuronidase activiteit worden aangetoond. Bovendien ging bij een sterke stijging van de activiteit van de zure hydrolasen de histochemisch bepaalde zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit zowel samen met de biochemisch bepaalde β -glucuronidase als met de cathepsine activiteit.

Indien bij het biochemisch onderzoek het substraat naftol-AS-BI fosfaat was gebruikt, dan was er een sterkere stijging van de zure fosfatase activiteit gevonden (tabel 10). De toename van de biochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit zou dan vaker gepaard zijn gegaan met een toename van de activiteit van andere lysosomale enzymen.

Vraag 4. *De localisatie van de zure hydrolasen.*

Indien er een hoge zure fosfatase of β -glucuronidase activiteit aanwezig was, werden in de coupes grove rode korrels gezien. Bij geringere enzymactiviteit werden fijne rode korrels waargenomen. De localisatie van grove rode korrels in de coupes kwam voor beide enzymen goed overeen. Gezien de geringe dimensie van de fijne korrels, is het moeilijk om na te gaan of deze overeenkomst in localisatie ook voor fijne korrels (geringe enzymactiviteit) geldt. Soms werd bij de zure fosfatase bepaling in één

bepaalde spiervezel geringe enzymactiviteit aangetoond. In de coupe gecubeerd met naftol-AS-BI- β -D-glucuronide, werd dan op een overeenkomstige plaats in deze spiervezel geen enzymactiviteit gevonden. In andere gevallen was uitsluitend β -glucuronidase activiteit aantoonbaar. Dit kan men verklaren door aan te nemen dat sommige lysosomen slechts in één coupe aanwezig waren. Een tweede mogelijkheid is dat sommige lysosomen slechts één van beide enzymen bevatten. Dit kan in overeenstemming zijn met de bevindingen van BOWERS (1971).

Indien de zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit zowel subsarcolemmaal als centraal in de spiervezels aanwezig was, werd de E 600 resistente esterase vaak, en de leucine naftylamidase activiteit uitsluitend subsarcolemmaal in de spiervezels gezien. In het ontstekingsinfiltraat en in het bindweefsel waren alle onderzochte zure hydrolasen aantoonbaar.

Uit het dierexperimenteel onderzoek is gebleken dat er een duidelijk verband tussen de resultaten van het histochemisch en het biochemisch onderzoek bestaat. Aan de histochemie kan derhalve een vervangende betekenis worden toegekend.

Uit het dierexperimenteel onderzoek blijkt bovendien, dat de membraantechniek voor zure fosfatase goede informatie over de localisatie en waardevolle impressies over de enzymactiviteit in de coupes geeft.

De door ons gevonden toename van de zure fosfatase activiteit in de coupes bij patiënten met spierziekten (tabel 19 en 20) is in overeenstemming met de bevindingen van MONTICONE et al, (1970) en SCARLATO en CORNELIO (1970). Een voordeel van ons onderzoek (met de membraanmethode) is dat men ook de extralysosomale zure fosfatase activiteit, die bij de conventionele methode in het incubatiemedium weglegt, kan aantonen. MEIJER (1972 b) toonde de extralysosomale zure fosfatase activiteit o.a. in spiervezels van een patiënt met een zure maltase deficiëntie zeer fraai aan.

Het is opvallend dat de β -glucuronidase activiteit in homogenaten van normaal spierweefsel van kinderen hoger is dan bij volwassenen. Dit kan niet verklaard worden door aan te nemen dat bij kinderen de hoeveelheid bindweefsel — dat relatief een hoge activiteit van zure hydrolasen heeft — was toegenomen (tabel 18).

Alleen bij patiënten met matige of ernstige afwijkingen in de haematoxyline eosine coupes werd bij biochemisch onderzoek een verhoogde β -glucuronidase activiteit gevonden (tabel 19 en 20).

Indien de zure fosfatase activiteit in homogenaten met naftol-AS-BI-

fosfaat was bepaald, was een dergelijke toename wellicht ook voor zure fosfatase gevonden.

Het is relevant te vermelden, dat bij deze patiënten de neutrale maltase activiteit in het algemeen niet was toegenomen.

KOSTER et al., (1972) beschreven dat bij patiënten met zure maltase deficiëntie de neutrale maltase activiteit in de spier soms verhoogd was. Bij het enige geval van zure maltase deficiëntie in ons materiaal (tabel 20, B 339) was de neutrale maltase activiteit echter niet gestegen.

Ook uit het onderzoek van het patiënten materiaal blijkt, dat wanneer men een indruk wil krijgen over de activiteit van zure hydrolasen in spierbiopten, het de voorkeur verdient de zure fosfatase activiteit in de coupes met de membraantechniek volgens Meijer, te bepalen. Deze conclusie is o.i. gerechtvaardigd omdat naar alle waarschijnlijkheid — indien het patiënten materiaal wel aselekt en niet heterogeen was — dezelfde positieve resultaten verkregen zouden zijn als met de twee proef-diermodellen.

Bijzonder interessant zijn de resultaten, die het substraat specificiteit onderzoek heeft opgeleverd. Onze bevindingen zijn in overeenstemming met die van BECKMAN en BECKMAN (1967), die in normaal spierweefsel meerdere isoënzymen van zure fosfatase aantonden.

De isoënzymen van zure fosfatase zijn in pathologisch veranderd spierweefsel door anderen tot dusver niet onderzocht.

Het pH optimum voor de splitsing van 4-methylumbelliferylfosfaat en naftol AS-BI-fosfaat was voor 2 van de 3 door ons onderzochte isoënzymen 4,8. Het pH optimum voor de splitsing van 4-methylumbelliferylfosfaat door het derde isoënzym bedroeg 5,5. Hiermee was de mogelijkheid uitgesloten dat we één of meerdere isoënzymen van een neutrale of een alkalische fosfatase aantonden, die beide substraten bij een pH 5,0 in geringe mate splitsen.

Uit ons onderzoek blijkt verder dat de verschillende isoënzymen van zure fosfatase ten opzichte van naftol-AS-BI-fosfaat en 4-methylumbelliferyl-fosfaat en ten opzichte van de enzymremmers NaF en DL-tartraat, geheel verschillende eigenschappen hebben. Deze bevindingen zijn vergelijkbaar met o.a. die van LUNDIN en ALLISON (1966), DiPIETRO en ZENGERLE (1967), SMITH en WHITBY (1968), AVILA en CONVIT (1973) en FILBURN (1973). α -Naftylfosfaat werd volgens FILBURN (1973) door één isoënzym van zure fosfatase met een molecuulgewicht van 16600 - 20900 in veel geringere mate gesplitst dan door de andere isoënzymen. Bovendien was

het pH optimum voor de splitsing van p-nitrofenylfosfaat hoger dan bij de andere isoënzymen.

Uit ons onderzoek bleek dat naftol-AS-BI-fosfaat door het isoënzym van zure fosfatase met het laagste molecuulgewicht (12500 - 14500) niet werd gesplitst. Het pH optimum voor de splitsing van 4-methylumbelliferyl-fosfaat door dit isoënzym was zoals werd vermeld hoger dan bij de andere isoënzymen.

Bovendien stijgen volgens ons onderzoek in spieren van vitamine E deficiënte konijnen slechts die isoënzymen, die met 4-methylumbelliferyl-fosfaat en ook met het histochemisch substraat zijn aan te tonen. Doordat een ander isoënzym dat slechts met 4-methylumbelliferyl-fosfaat was aan te tonen, in de pathologisch veranderde spieren niet significant in activiteit was gestegen, is het duidelijk geworden, waarom de correlatie tussen de histochemische en biochemische bevindingen voor zure fosfatase niet geheel bevredigend was.

De door DPPD veroorzaakte spierziekte bij ratten geeft een activiteitsstijging van zure fosfatase en β -glucuronidase te zien.

Uit het histochemisch onderzoek (tabel 13) blijkt, dat de stijging in activiteit voor beide enzymen ongeveer dezelfde is.

Indien de enzymactiviteit biochemisch wordt bepaald (tabel 16), dan is deze activiteitsstijging voor zure fosfatase minder uitgesproken. De correlatie tussen de biochemische en histochemische bevindingen is hierdoor voor zure fosfatase veel geringer dan voor β -glucuronidase (tabel 17). Deze bevindingen wijzen er op, dat in rattenspieren hetzelfde fenomeen aanwezig kan zijn als bij het onderzoek naar de substraat specificiteit in konijnenspieren is aangetoond.

Het is te verwachten dat in spieren van patiënten met spierziekten — die matige of ernstige afwijkingen in de haematoxyline eosine coupes van skeletspieren hebben — meerdere isoënzymen van zure fosfatase kunnen worden aangetoond. Bij deze groep patiënten, was zoals reeds werd vermeld, de histochemisch bepaalde zure fosfatase activiteit verhoogd. Bij biochemisch onderzoek bleek dat de β -glucuronidase activiteit was toegenomen (tabel 21).

In onze afdeling worden momenteel de eigenschappen van de verschillende isoënzymen van zure fosfatase in skeletspieren nader onderzocht. In het bijzonder wordt nagegaan in hoeverre deze isoënzymen een rol spelen bij de katabole processen, die in pathologisch veranderd spierweefsel vaak verhoogd zijn.

HOOFDSTUK 9

SAMENVATTING

In de inleiding (hoofdstuk 1) werd vermeld, dat de activiteit van lysosomale enzymen bij primaire myopathieën en neurogene spierziekten verhoogd is. De activiteit van deze enzymen kan zowel met histochemische als met biochemische methoden worden bepaald.

Op de voor- en nadelen van de histochemische technieken werd gewezen. Eén van de nadelen van de conventionele histochemische methoden is het weglekken van het enzym in het incubatiemedium. Dit treedt bij de in ons laboratorium ontwikkelde membraantechniek niet op.

Met deze verbeterde histochemische methode werd nagegaan of in normaal en pathologisch veranderd skeletspierweefsel de volgende correlaties konden worden aangetoond.

1. Gaat een toename van de histochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase (b.v. de zure fosfatase activiteit) gepaard met een toename van de histochemisch bepaalde activiteit van één of meerdere andere zure hydrolasen.
2. Gaat een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één zure hydrolase gepaard met een toename van de biochemisch bepaalde activiteit van één of meerdere andere zure hydrolasen.
3. Bestaat er een correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek.
4. Komen de bij histochemisch onderzoek gevonden localisaties van zure hydrolasen met elkaar overeen.

Indien de eerste 3 vragen bevestigend beantwoord worden, dan betekent dit, dat men met één eenvoudige histochemische methode (b.v. de histochemische zure fosfatase methode) een goede indruk krijgt over de histochemisch en biochemisch bepaalde activiteit van andere zure hydrolasen.

In het literatuuroverzicht (hoofdstuk 2) werd vermeld, dat de lysosomale enzymactiviteit in spierhomogenaten van vitamine E deficiënte konijnen in het algemeen verhoogd was. Door sommigen kon echter geen toename van de zure fosfatase activiteit worden aangetoond. Bovendien

was de activiteit van verschillende andere lysosomale enzymen niet in dezelfde mate gestegen.

Ook na toediening van DPPD aan ratten en bij patiënten met spierziekten was de activiteit van zure hydrolasen verhoogd.

Een vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek waarbij de activiteit van zure hydrolasen in skeletspieren werd bepaald, werd tot dusver niet verricht. Uit een dergelijk onderzoek op andere organen bleek dat er vaak een correlatie tussen de bevindingen van het histochemisch en het biochemisch onderzoek kon worden aangetoond.

Voorts werd beschreven (hoofdstuk 3) dat in de celfracties meerdere isoënzymen van zure fosfatase, die een verschillende substraat specificiteit hebben, aanwezig zijn. Dit verklaart de discrepantie tussen de bevindingen van de onderzoekers die de zure fosfatase activiteit met verschillende substraten bepalen.

Bovendien tonen de verschillende soorten cellen niet eenzelfde isoënzympatroon. Voorts treden er onder invloed van pathologische processen in de cel veranderingen van het isoënzympatroon op.

In hoofdstuk 4 (materiaal en methoden) werden de proefopzet en samenstelling en indeling van het patiëntenmateriaal beschreven.

Bovendien werden de toegepaste histochemische en biochemische methoden vermeld.

Uit het dierexperimenteel onderzoek (hoofdstuk 5 en 6) bleek, dat de activiteit van zure hydrolasen bij vitamine E deficiëntie sterker was gestegen dan na DPPD toediening.

Voor het vergelijkend histochemisch, het vergelijkend biochemisch en het vergelijkend histochemisch en biochemisch onderzoek bij proefdieren gold in het algemeen, dat de toename van de activiteit van één zure hydrolase wel gepaard ging met een toename van de activiteit van een tweede zure hydrolase, doch meestal niet met een toename van alle onderzochte zure hydrolasen (vraag 1, 2 en 3).

Bij vitamine E deficiëntie was deze correlatie vanwege de sterkere toename van de activiteit van de zure hydrolasen hoger dan na DPPD toediening. De histochemisch bepaalde enzymactiviteit was bij vitamine E deficiëntie dermate toegenomen, dat een verhoging van de activiteit van één enzym gepaard ging met een stijging in activiteit van de overige onderzochte zure hydrolasen.

De localisaties (vraag 4) van zure fosfatase en β -glucuronidase activiteit in de spiervezels kwamen meestal goed met elkaar overeen. Indien deze enzymen zich zowel subsarcolemmaal als centraal in de spiervezels bevonden, werd de E 600 resistente naftylesterase activiteit vaak en de

leucine naftylamidase activiteit uitsluitend subsarcolemmaal aangetoond. Alle onderzochte zure hydrolasen waren in het ontstekingsinfiltraat aanwezig.

De eindconclusie uit het correlatie onderzoek luidt, dat wanneer men de activiteit van meerdere zure hydrolasen histochemisch bepaalt men betrouwbare indrukken over de localisatie en de enzymactiviteit kan krijgen.

Uit het onderzoek naar de substraat specificiteit van zure fosfatase bij spieren van vitamine E deficiënte konijnen blijkt, dat de activiteit van het isoënzym, dat alleen 4-methylumbelliferylfosfaat splitst niet is gestegen, terwijl de activiteit van de isoënzymen die zowel dit substraat als naftol-AS-BI-fosfaat splitsen, is toegenomen.

Met gelfiltratie werden 3 isoënzymen van zure fosfatase aangetoond, waarvan de molecuulgewichten 110000 - 130000, 60000 - 78000 en 12500 - 14500 bedroegen. Het pH optimum van de eerste 2 isoënzymen was 4,8, het optimum van het laatste isoënzym bedroeg 5,5. De isoënzymen gedroegen zich ten opzichte van de remmers NaF en DL-tartraat verschillend. Er bleek een verband te bestaan tussen het activiteitspatroon van de isoënzymen en de morfologie van het spierweefsel.

Uit het histochemisch onderzoek van spierbiopten van patiënten (hoofdstuk 7), bleek dat bij neurogene spierziekten en primaire myopathieën, alleen de zure fosfatase activiteit duidelijk was toegenomen. In die gevallen waarbij in de coupes matige of ernstige afwijkingen aanwezig waren, bestond er eveneens een toename van de biochemisch bepaalde β -glucuronidase activiteit. Er kon in het algemeen geen correlatie tussen de toename in activiteit van de verschillende zure hydrolasen worden aangetoond.

Voor het patiënten materiaal gold, dat indien men de activiteit van lysosomale enzymen in spierbiopten op eenvoudige wijze wil bepalen, de membraanmethode voor zure fosfatase hiervoor het meest geschikt is.

SUMMARY

In the introduction (chapter 1) it is stated that in cases of primary myopathies and neurogenic muscle diseases the activity of lysosomal enzymes is increased. The activity of these enzymes can be histochemically or biochemically determined and the advantages and disadvantages of the histochemical techniques are referred to. One of the disadvantages of the conventional histochemical method is the leakage of the enzyme into the incubating medium. This is avoided by use of the membrane technique which was developed in our laboratory.

Using this improved histochemical technique an investigation was performed on pathological skeletal muscle in order to determine whether there is:

1. A histochemically determinable parallel increase of one acid hydrolase (e.g. the activity of the acid phosphatase) and one or more other acid hydrolases.
2. A biochemically determinable parallel increase of one acid hydrolase and one or more other acid hydrolases.
3. A correlation between the histochemical and biochemical investigations.
4. A consistent histochemical localisation of acid hydrolases.

Affirmative observations concerning the first 3 questions would indicate that one could achieve a reasonable impression of overall acid hydrolase activity by using a single simple histochemical method (e.g. the method used for detecting acid phosphatase).

In the literature survey (chapter 2) it is reported that in muscle homogenates of vitamin E deficient rabbits the lysosomal enzyme activity is generally increased. However some authors have been unable to demonstrate an increase in acid phosphatase activity in muscles of vitamin E deficient animals. Others report that the activity of different lysosomal enzymes did not increase to the same degree in those muscles.

The activity of acid hydrolases was elevated in muscles of patients with muscular diseases and in muscles of rats treated with DPPD.

So far a comparative histochemical and biochemical investigation to measure the activity of acid hydrolases in skeletal muscle has not yet been carried out. From a similar investigation on other organs it appears that the histochemical and biochemical procedures are complementary.

Moreover, it is reported (chapter 3) that in cell fractions there are various isoenzymes of acid phosphatase which have different substrate specificities. This explains the discrepancies between the observations of investigators who estimate acid phosphatase activity by using different substrates. In addition, different cells do not show the same isoenzymal pattern of acid phosphatase, which may also be altered by pathological changes within the cell.

In chapter 4 (material and methods) the experimental design, composition and arrangement of the patient material are described together with the methods of histochemical and biochemical techniques.

From the experimental work on rabbits and rats (chapter 5 and 6) it appeared that the increased activity of the acid hydrolases in vitamin E deficiency is greater than that seen following DPPD administration.

In general, for the comparative histochemical, the comparative biochemical and the comparative histochemical and biochemical experiments in animals it appeared, that the increased activity of one acid hydrolase was paralleled by that of a second but not by all of the hydrolases examined (questions 1, 2 and 3).

In vitamin E deficient animals the correlation was much more obvious than in those given DPPD due to the more striking increase in the activity of acid hydrolases found in the vitamin E experiments. The histochemically determined enzyme activity of the vitamin E deficient animals was increased to such an extent that the increased activity of one enzyme was paralleled by increases in the activity of all the other acid hydrolases which were examined.

The localisation (question 4) of acid phosphatase and β -glucuronidase activity in muscle fibres mostly coincided. In cases where these enzymes were localised both centrally and in the sub-sarcolemmal areas was the E 600 resistant naphthoesterase activity frequently, and the activity of leucine naphtholamidase always, demonstrated in the sub-sarcolemmal areas. All of the examined acid hydrolases were found to be present in the inflammatory exudate.

The conclusion of the correlative investigation is that if one measures the activity of acid hydrolases using a histochemical membrane method,

one can gain a reliable impression of the activity and of the localisation of the enzyme.

From the investigation of substrate specificity of acid phosphatase in the muscles of vitamin E deficient rabbits it appears that the activity of the isoenzyme which splits only 4-methylumbelliferylphosphate is not increased whereas the activity of the isoenzymes which split both 4-methylumbelliferylphosphate and naphthol-AS-BI-phosphate, are increased.

3 Isoenzymes of acid phosphatase were demonstrated by gel filtration. These had molecular weights of 110,000 - 130,000, 60,000 - 78,000 and 12,500 - 14,500. The optimum pH value for the first two isoenzymes is 4.8; that of the third 5.5. The isoenzymes behave differently under the affect of the inhibitors NaF and DL-tartrate.

There appears to be a correlation between the activity pattern of the isoenzymes and the morphological appearance of the muscle.

From the histochemical investigations on muscle biopsies from patients (chapter 7) it appeared that in cases of neurogenic muscular disorders and primary myopathies, only the acid phosphatase activity was obviously increased. In those cases where there were moderate or severe morphological changes there was also an increased biochemically determined β -glucuronidase activity. In general there was no demonstrable correlation between the increased activity of the different acid hydrolases.

It appears that if one wishes to determine the activity of lysosomal enzymes in muscle tissue from patients by using a simple method, the membrane method for acid phosphatase is the most appropriate.

LITERATUURLIJST

- ABDULLAH, F., PENNINGTON, R. J.: Ribonuclease activity in normal and dystrophic human muscle. *Clin. Chim. Acta*, 20, 365-371 (1968).
- ABRAHAM, R., MORRIS, M., HENDY, R.: Lysosomal changes in epithelial cells of the mouse thymus after hydrocortisone treatment. *Histochemie*, 17, 295-311 (1969).
- ANDERSON, P. J., SONG, S. K.: Experimental myositis: A cytochemical and electron microscopic study of drug induced degeneration. In: *Proceedings Vth international congress of neuropathology, Zürich*, Ed. by F. Lüthy, A. Bischoff. Excerpta Medica, Amsterdam, 687 - 693 (1966).
- ANDREWS, P.: Molecular sieve chromatography to molecular size and molecular weight estimation. *Labor Pract.* 16, 851-855 (1967).
- ANSON, M. L.: The estimation of cathepsin with haemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.*, 20, 565-574 (1937).
- ARNOLD, F., KUNZE, K. D., GROSSMAN, H.: Über den Einfluss der Gelinkubation mit Polyvinylalkohol auf die Löslichkeit der Fructose-1,6 diphosphat-Aldolase. *Histochemie*, 13, 196-202 (1968).
- AVILA, J. L., CONVIT, J.: Heterogeneity of acid phosphate activity in human polymorphonuclear leukocytes. *Clinica Chimica Acta*, 44, 21-31 (1973).
- BARRETT, A. J., POOLE, A. R.: Unsuitability of leucine naftylamide for the histochemical demonstration of lysosomal proteolytic activity. *Nature*, 224, 279-280 (1969).
- BARRETT, A. J.: Properties of lysosomal enzymes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology 2*, 245-312 (1969). Ed. by J. T. Dingle and H. B. Fell. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- BARRON, K. D., ORDINARIO, A. T., BERNSOHN, J., HESS, A. R., HEDRICK, M. T.: Cholinesterases and nonspecific esterases of developing and adult (normal and atrophic) rat gastrocnemius. I. Chemical assay and electrophoresis. *J. Histochem. Cytochem*, 16, 346-361 (1968).
- BARROW, P. C., HOLT, S. J.: Differences in distribution of esterase between cell fractions of rat liver homogenates prepared in various media; relevance to the lysosomal location of the enzyme in the intact cell. *Biochem. J.*, 125, 545-555 (1971).
- BECK, C., MAHADEVAN, S., BRIGHTWELL, R., DILLAND, C. J., TAPPEL, A. L.: Chromatography of lysosomal enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 369-377 (1968).
- BECKMAN, L., BECKMAN, G.: Individual and organ-specific variations of human acid phosphatase. *Biochemical Genetics*, 1, 145-153 (1967).
- BERGMEYER, H. U.: *Methods of enzymatic analyses*, 856-860 (1974). Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, Inc. New York and London.
- BETHLEM, J.: *Muscle Pathology, introduction and atlas*, 11-13 (1970) North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

- BITENSKI, L., BUTCHER, R. G., CHAYEN, J.: Quantitative cytochemistry in the study of lysosomal function. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, 3, 498-504 (1973). Ed. by J. T. Dingle. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- BÖCKING, A., GOSSARTH, C., VON DEIMLING, O.: Esterase XVIII Biochemical and histochemical investigation of the subcellular location of the non-specific esterase. *Histochemistry*, 42, 359-375 (1974).
- BOTS, G. T. A. M.: Enzyme histopathology of primary tumors of the human nervous system in relation of the accompanying tissue reaction. In: *Proceedings Vth International congress of neuropathology*, 497-508 (1970). Paris. Publ. Masson, Paris.
- BOWERS, W. E., DUVE, C. DE: Lysosomes in lymphoid tissue III. Influence of various treatments of the animals on the distribution of acid hydrolases. *J. Cell Biol.*, 32, 349-364 (1967).
- BOWERS, W. E.: Distribution of tissue proteinases in lymphoid tissues. In: *Tissue proteinases*, 221-242 (1971). *Proceedings of the Royal Society Wates Symposium*, held at the Strangeways Research Laboratory, Cambridge. Ed. by: A. J. Barrett, J. T. Dingle. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- BRAGDON, J. H., LEVINE, H. D.: Myocarditis in vitamin E-deficient rabbits. *Am. J. Pathol.*, 25, 265-270 (1949).
- BUCHANAN-SMITH, J. G., NELSON, E. C., TILLMAN, A. D.: Effect of vitamin E and selenium deficiencies on lysosomal and cytoplasmic enzymes in sheep tissues. *J. Nutr.*, 99, 387-394 (1969).
- BUNYAN, J., MCHALE, D., GREEN, J., MARCINKIEWICZ, S.: Biological potencies of epsilon- and zeta-1-tocopherol and 5-methyltolcol. *Brit. J. Nutr.*, 15, 253-257 (1961).
- BUNYAN, J., MURRELL, E. A., GREEN, J., DIPLOCK, A. T.: On the existence and significance of lipid peroxides in vitamin E deficient animals. *Brit. J. Nutr.*, 21, 475-495 (1967).
- CALVERT, C. C., DESAI, I. D., SCOTT, M. L.: Effect of linoleic acid on nutritional muscular dystrophy in the chick. *J. Nutr.*, 83, 307-313 (1964).
- CHAYEN, J., BITENSKI, L.: Evidence for altered lysosomal membranes in synovial lining cells from human rheumatoid joints. *Beitr. Path. Bd.*, 142, 137-149 (1971).
- COHN, Z. A., BENSON, B.: The differentiation of mononuclear phagocytes, morphology, cytochemistry and biochemistry. *J. Exp. Med.*, 121, 153-169 (1965 a).
- COHN, Z. A., BENSON, B.: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. I. The influence of inhibitors and the results of autoradiography. *J. Exp. Med.*, 121, 279-287 (1965 b).
- DAHL, H. A., MELLGREN, S. I.: The effect of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone on diffusion artifacts in lactate dehydrogenase histochemistry. *Histochemie*, 24, 354-370 (1970).
- DAHL, H. A., FROM, S. H.: Some effects of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone on the activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes. *Histochemical and biochemical studies*. *Histochemie*, 25, 182-190 (1971).
- DÉMOS, J., PLACE, TH., CHEREAU, H.: Myopathy - a disorder of the microcirculation. In: *Muscle Diseases: Proceedings of an international Congress: Milan*, 408-411 (1970). Ed. by J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Exerpta Medica, Amsterdam.

- DESAI, I. D., CALVERT, C. C., SCOTT, M. L., TAPPEL, A. L.: Peroxidation and lysosomes in nutritional muscular dystrophy of chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115, 462-466 (1964).
- DESAI, I. D.: Activity of lysosomal enzymes in white muscle disease. *Nature*, 209, 1349 (1966).
- DINGLE, J. T., FELL, H. B.: *Lysosomes in Biology and Pathology deel 1 en 2* (1969). North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- DINGLE, J. T.: *Lysosomes in Biology and Pathology deel 3* (1973). North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- DIPIETRO, D. L., ZENGERLE, F. S.: Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. *J. Biol. Chem.*, 242, 3391-3396 (1967).
- DORP, A. VAN: Logische aspekten van het verband tussen vitamine E, als moleculaire bouwsteen van de structuur der levende cel, en de oxidatieve fosforylering als functie welke daarvan de invloed kan ondergaan. Proefschrift Amsterdam (1964).
- DRAGMAN, D. E., MURPHY, S. R., NIGAM, M. P., HILLS, J. R.: Myopathic changes in chronically denervated muscle. *Arch. Neurol. (Chicago)* 16, 14-24 (1967).
- DRAPER, H. H.: Ineffectiveness of selenium in the treatment of nutritional muscular dystrophy in the rabbit. *Nature*, 180, 1419 (1957).
- DUBOIS, G., TURPIN, M. J. C.: Utilisation de l'électrophorèse pour la détection de la leucodystrophie métagénétique à partir de leucocytes humaines. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 278, 1401-1403 (1974).
- DUBOWITZ, V., BROOKE, M. H.: Muscle biopsy. A modern approach 1-33; 105-470 (1973). W. B. Saunders Company, London.
- DUGGAN, D. E.: Spectrofluorometric determination of tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 116-122 (1959).
- DIJN, A. P. VAN, WILLIGHAGEN, R. G. J. VAN, MEIJER, A. E. F. H.: Increase of acid phosphatase activity in mouse liver after dextran storage. *Biochem. Pharmacol.*, 2, 177-181 (1959).
- ENGEL, W. K.: Duchenne muscular dystrophy: a histologically based ischemia hypothesis and comparison with experimental ischemia myopathy. In: *The striated muscle* 453-472 (1973). Edited by C. M. Pearson, F. K. Mostofi. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- FAHIMI, H. D., AMARASINGHAM, C. R.: Cytochemical localization of lactic dehydrogenase in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 22, 29-48 (1964).
- FILBURN, C. R.: Acid phosphatase isoenzymes of *Xenopus laevis* tadpole tails I. Separation and partial characterization. *Arch. of Biochem. Biophys.* 159, 683-693 (1973).
- FISHMAN, W. H., IDE, H., RUFO, R.: Dual localization of acid hydrolases in endoplasmic reticulum and in lysosomes. I. β -Glucuronidase staining reactions and cytochemical studies on kidney in androgen-stimulated mice. *Histochemie*, 20, 287-299 (1969).
- FREEMAN, F. R.: Avitaminosis E: Organ distribution of arylsulfatase elevation. *J. Neurol. Sci.*, 13, 315-319 (1971).
- FRIEDE, R. L., FLEMING, L. M., KNOLLER, M. A.: A quantitative appraisal of enzyme histochemical methods in brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 11, 232-245, (1963).

- GESCHICKTER, C. F., ATHANASIADOU, P. A., O'MALLEY, W. E.: The role of mucinolyases in collagen disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 30, 93-111 (1958).
- GIANETTO, R., DE DUVE, C.: Tissue fractionation studies. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. *Biochem. J.*, 59, 433-438 (1955).
- GOETTSCH, M., PAPPENHEIMER, A. M.: Nutritional muscular dystrophy in the guinea pig and rabbit. *J. Exp. Med.*, 54, 145-165 (1931).
- GOLDFISCHER, S.: The cytochemical demonstration of lysosomal arylsulfatase activity by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 520-522 (1965).
- GOODMAN, L. S., GILMAN, A.: The pharmacological basis of therapeutics. 1702-1706 (1965). Mc Millan Comp., New York 3e dr.
- HAASE, G. R., SHY, G. M.: Pathological changes in muscle biopsies from patients with peroneal muscular atrophy. *Brain*, 83, 631-637 (1960).
- HARRIS, P. L., JENSEN, J. L., JOFFE, M., MASON, K. E.: Biological activity of natural and synthetic tocopherols. *J. Biol. Chem.*, 156, 491-498 (1944).
- HARTOG JAGER, W. A. DEN, MEIJER, A. E. F. H., JONG, J. M. B. V. DE: A dystrophy like myopathy in thyroidectomized rabbits. *J. Neurol. Sci.*, 6, 301-304 (1968).
- HAYASHI, M.: Comparative histochemical localization of lysosomal enzymes in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 83-92 (1967).
- HELMINEN, H. J., ERICSSON, J. L. E., ORRENIUS, S.: Studies on mammary gland involution. IV. Histochemical and biochemical observations on alterations in lysosomes and lysosomal enzymes. *J. Ultrastruc. Res.*, 25, 240-252 (1968).
- HOLT, S. J.: Some observations on the occurrence and nature of esterases in lysosomes. In: *Lysosomes*, 114-115 (1963). Ed. by A. V. S. de Reuck en M. P. Cameron. Churchill. Ltd., London.
- HOOF, C., LACY, P. DE, LAMBERT, V.: Etude comparative de l'activité enzymatique du tissu musculaire de l'enfant normal et d'enfants atteints de dystrophie musculaire progressive aux différents stades de la maladie. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 11, 510-518 (1966).
- HOPU-HAVU, V. K., EKFOR, T. O.: Distribution of a dipeptide naphthylamidase in rat tissues and its localization by using diazo coupling and labeled antibody techniques. *Histochemie*, 17, 30-38 (1969).
- HOVE, E. L., FRY, G. S., SCHWARZ, K.: Ineffectiveness of factor 3-active selenium compounds in muscular dystrophy of rabbits on vitamin E-free diets. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 98, 27-29 (1958).
- HÜLSMANN, W. C., BETHLEM, J., MEIJER, A. E. F. H., FLEURY, P., SCHELLENS, J. P. M.: Myopathy with abnormal structure and function of muscle mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 30, 519-520 (1967).
- HÜLSMANN, W. C., MEIJER, A. E. F. H., BETHLEM, J., WIJNGAARDEN, G. K. VAN: Different mitochondrial species in human skeletal muscle. In: *Muscle diseases. Proceedings of an international congress Milan*. Ed. by J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Excerpta Medica, Amsterdam. 319-322 (1970).
- IDE, H., FISHMAN, W. H.: Dual localization of β -glucuronidase and acid phosphatase in lysosomes and microsomes II. Membrane-associated enzymes. *Histochemie*, 20, 300-321 (1969).
- IODICE, A. A., WEINSTOCK, I. M.: Cathepsin A in nutritional and hereditary muscular dystrophy. *Nature*, 207, 1102 (1965).

- JACOBSEN, N. O.: The histochemical localization of lactic dehydrogenase isoenzymes in the rat nephron by means of an improved polyvinyl alcohol method. *Histochemie*, 20, 250-265 (1969).
- JAGER, F. C.: High linoleic acid intake and vitamin E requirement in rats. *Nutr. Diet.*, 11, 270-279 (1969).
- JASMIN, G., GAREAU, R.: Histopathological study of muscle lesions produced by paraphenylenediamine in rats. *Br. J. Exp. Pathol.*, 42, 592-596 (1961).
- JASMIN, G.: Action toxique de la paraphényl-énediamine chez le rat et quelques autres rongeurs. *Rev. Can. Biol.*, 20, 37-46 (1961).
- JÖBSIS, A. C.: Histochemische indrukken en biochemische waarden. Een vergelijkend onderzoek toegepast op skeletspier na experimentele innervatiewijziging. Proefschrift Amsterdam (1971).
- JÖBSIS, A. C., MEIJER, A. E. F. H.: Evaluation of enzyme histochemical observations for metabolic studies. A combined histochemical and biochemical investigation of experimentally induced skeletal muscle changes. I. The histochemical investigation. *Histochemie*, 36, 51-61 (1973 a).
- JÖBSIS, A. C., MEIJER, A. E. F. H.: Evaluation of enzyme histochemical observations for metabolic studies. A combined histochemical and biochemical investigation of experimental induced muscle changes. II. The biochemical investigation and comparison with histochemical observations. *Histochemie*, 36, 63-71 (1973 b).
- JOFFE, M., HARRIS, P. L.: The biological potency of the natural tocopherols and certain derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 925-927 (1943).
- JONGE, H. DE: Inleiding tot de medische statistiek deel I en II. In: *Verhandeling van het Nederlands Instituut voor Preventieve Geneeskunde Leiden*, tweede druk (1963).
- KALINA, M., GAHAN, P. B.: A quantitative study of the validity of the histochemical demonstration for pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Histochemie*, 5, 530-546 (1965).
- KANEKO, A., IKEDA, T., ONOÉ, T.: Acid phosphatases from different cell types in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 222, 218-221 (1970).
- KAR, N. C., PEARSON, C. M.: Acid, neutral and alkaline cathepsins in normal and diseased human muscle. *Enzyme*, 13, 188-196 (1972 a).
- KAR, N. C., PEARSON, C. M.: Acid hydrolases in normal and diseased human muscle. *Clin. Chim. Acta*, 40, 341-346 (1972 b).
- KATSUYUKI, I., OMARA, T., SATO, R.: Biochemical characterization of microsomes isolated from heart and skeletal muscles. *J. Biochem. Tokyo*, 60, 274-285 (1966).
- KHAN, M. A., HOLT, P. G., KNIGHT, J. O., KAKULAS, B. A.: Incubation film technique for the histochemical localization of creatine kinase. *Histochemie*, 26, 120-125 (1971).
- KHAN, M. A., PAPADIMITRIOU, J. M., HOLT, P. G., KAKULAS, B. A.: A histochemical analysis of mammalian oxidative skeletal muscle fibres using the enzymes of energetic metabolism. *Histochemie*, 33, 301-312 (1973).
- KNOOK, D. L., SLEYSER, E. C.: Age related changes in lysosomal enzyme activities of parenchymal and non parenchymal rat liver cells. In: *Annual report Radiobiological Institute T.N.O. etc.* 187-189 (1974 a).
- KNOOK, D. L., BEZOYEN, C. F. A. VAN: Age related phenomena in liver cells isolated from young and old rats. Respiratory capacity and lysosomal activities. *Proceedings 4th. European Symp. on Basic Research in Gerontology. Varberg, Sweden. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 141, 30-31 (1974 b).

- KOSTER, J. F., SLEE, R. G., HÜLSMANN, W. C.: The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of a variant of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *Europ. J. Clin. Invest.*, 2, 467-471 (1972).
- KOSZALKA, T. R., MASON, K. E., KROL, G.: Relation of vitamin E to proteolytic and autolytic activity of skeletal muscle. *J. Nutr.*, 73, 78-84 (1961).
- KUNZE, K. D.: Beitrag zur Histochemie der Lactatdehydrogenase. *Histochemie*, 11, 350-359 (1967).
- LI, C. Y., YAM, L. T., LAM, K. W.: Acid phosphatase isoenzymes in human leucocytes in normal and pathological conditions. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 473-481 (1970 a).
- LI, C. Y., YAM, L. T., LAM, K. W.: Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leucocytes. Demonstration of isoenzyme cell specificity. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 901-910 (1970 b).
- LIN, C. W., FISHMAN, W. H.: Microsomal and lysosomal acid phosphatase isoenzymes of mouse kidney. Characterization and separation. *J. Histochem. Cytochem.*, 20, 487-498 (1972).
- LISY, V., KOVÁRO, H., LODIN, Z.: In vitro effects of polyvinylpyrrolidone and sucrose on the acetylcholinesterase, succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities in the brain. *Histochemie*, 26, 205-211 (1971).
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., LEWIS FARR, A., RANDALL, R. J.: Protein measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- LUNDIN, L. G., ALLISON, A. C.: Acid phosphatases from different organs and animal forms compared by starch-gel electrophoresis. *Acta Chem. Scand.*, 20, 2579-2592 (1966).
- MACKENZIE, C. G.: Cure of repeated attacks of nutritional muscular dystrophy in the rabbit by alpha-tocopherol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49, 313-317 (1942).
- MAGGI, V., FRANKS, L. M., CARBONELL, A. W.: Histochemical study of a number of hydrolases, including a new acid phosphatase, in various tissues of men and mice. *Histochemie*, 6, 305-316 (1966).
- MAGGI, V., CARBONELL, A. W.: Lysosomes and acid phosphatases during growth and differentiation in mice: a light and electron microscope study. *Histochem. J.*, 1, 383-403 (1969).
- MAMELI, L., POTIER, M., GIANETTO, R.: Difference in electrophoretic mobility between the lysosomal and the microsomal β -glucuronidase of rat liver. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 46, 560-563 (1972).
- MAX, S. R., MAYER, R. F., VOGELSANG, L.: Lysosomes and disuse atrophy of skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146, 227-232 (1971).
- McMILLAN, P. J.: Differential demonstration of muscle and heart type lactic dehydrogenase of rat muscle and kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 21-31 (1967).
- McMILLAN, P. J., WITTUM, R. L.: Lactic acid dehydrogenase isoenzymes of rat soleus muscle fibers as demonstrated by histochemical staining and electrophoresis. *J. Histochem. Cytochem.*, 19, 421-425 (1971).
- MEAD, J. A. R., SMITH, J. N., WILLIAMS, R. T.: Studies in detoxication. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of β -glucuronidase. *Biochem. J.*, 61, 569-574 (1955).

- MEIJER, A. E. F. H., WILLIGHAGEN, R. G. J.: Increased activity of acid phosphatase and β -glucuronidase in the liver and spleen of mice after intraperitoneal administration of various macromolecular substances. *Biochem. Pharmacol.*, 8, 389-397 (1961).
- MEIJER, A. E. F. H.: The change in shape of the pH-activity curve of acid phosphatase in the liver and spleen of mice after intraperitoneal administration of macromolecular substances. *Biochem. Pharmacol.*, 11, 125-134 (1962).
- MEIJER, A. E. F. H.: Changes in the pH-activity curve of β -D-glucuronidase in the liver and spleen of mice after intraperitoneal administration of various macromolecular. *Biochem. Pharmacol.*, 11, 1141-1153 (1963).
- MEIJER, A. E. F. H.: Improved histochemical method for the demonstration of the activity of α -glucan phosphorylase. I. The use of glucosyl acceptor dextran. *Histochemie*, 12, 244-252 (1968).
- MEIJER, A. E. F. H.: Histochemical method for the demonstration of myosin adenosine triphosphatase in muscle tissue. *Histochemie*, 22, 51-58 (1970).
- MEIJER, A. E. F. H., BETHLEM, J., WJUNGAARDEN, G. K. VAN: Diagnostic value of electrophoretical isoenzyme determination of L-lactate dehydrogenase in affected quadriceps muscle of patients with neuromuscular diseases. *Clin. Chim. Acta*, 33, 247-252 (1971).
- MEIJER, A. E. F. H.: Mitochondria with defective respiratory control of oxidative phosphorylation isolated from muscle tissue of thyroidectomized rabbits. *J. Neurol. Sci.*, 16, 445-453 (1972 a).
- MEIJER, A. E. F. H.: Semipermeable membranes for improving the histochemical demonstration of enzyme activities in tissue sections. I. Acid phosphatase. *Histochemie*, 30, 31-39 (1972 b).
- MEIJER, A. E. F. H., VLOEDMAN, A. H. T.: Semipermeable membranes for improving the histochemical demonstration of enzyme activities in tissue sections. II. Non-specific esterase and β -glucuronidase. *Histochemie*, 34, 127-134 (1973).
- MIRANDOLLE, J. F.: De spierbiopsie bij aandoeningen van het perifere motorische neuron. Proefschrift Amsterdam (1972).
- MITTELBACH, F., PONGRATZ, D.: Über den histochemischen Leucin-Amino-peptidase-Nachweis in der menschlichen Skelettmuskulatur bei verschiedenen Myopathien. *Virchows. Arch. Abt. A.*, 346, 68-73 (1969).
- MIYAYAMA, H., SASAKI, M., FISHMAN, W. H.: Demonstration of non lysosomal ultrastructural sites for acid phosphatase with p-nitrophenylphosphate-Pb salt technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 287-288 (1974).
- MOLENAAR, I., VOS, J., JAGER, F. C., HOMMES, F. A.: The influence of vitamin E deficiency on biological membranes. An ultrastructural study on the intestinal epithelial cells of ducklings. *Nutr. Metabol.*, 12, 358-370 (1970).
- MONTICONE, G. F., GABELLA, G., BERGAMINI, L.: Ultrastructural and histochemical changes in some human myopathies. In: *Muscle diseases. Proceedings of an international congress 44-52 (1970)*. Ed. by J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Excerpta Medica, Amsterdam.
- NACHLAS, M. M., PRINN, W., SELIGMAN, A. M.: Quantitative estimation of lyo- and desmo-enzymes in tissue sections with and without fixation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 487-502 (1956).
- NEIL, M. W., HORNER, M. W.: Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. Acid p-nitrophenyl phosphate phosphohydrolases of adult guinea pig liver. *Biochem. J.*, 92, 217-224 (1964 a).

- NEIL, M. W., HORNER, M. W.: Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. 2. Acid phenyl phosphomonoesterases of adult mouse liver. *Biochem. J.*, 93, 220-224 (1964 b).
- NEUFELD, H. A., SCOTT, C. R., STOTZ, E.: Purification of heart muscle succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 210, 869-876 (1954).
- NORDLIE, R. C., ARION, W. J.: Glucose-6-phosphatase, in *Methods in Enzymology*. Ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan. Acad. Press, New York, 9, 619-625 (1966).
- NUTTAL, F. Q., WEDIN, D. S.: A simple rapid colorimetric method for determination of creatine kinase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 68, 324-332 (1966).
- OPIE, L. H., NEWSHOLME, E. A.: The activities of fructose 1,6 diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenol-pyruvate carboxy kinase in white and red muscle. *Biochem. J.*, 103, 391-399 (1967).
- OSTROWSKI, W., RYBARSKA, J.: Studies on human prostatic acid phosphomonoesterase. Further purification and molecular weight of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 196-198 (1965).
- OTTO, K.: Cathepsin B₁ and B₂. In: *Tissue proteinases. Proceedings of the Royal Society Wates Symposium, held at the Strangeways Research Laboratory 1-18 (1971)*. Ed. by A. J. Barrett, J. T. Dingle. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry: Theoretical and applied*. Churchill. London, deel 1 en 2 (1968), deel 3 (1972).
- PENNINGTON, R. J.: Biochemistry of dystrophic muscle. II. Some enzyme changes in dystrophic mouse muscle. *Biochem. J.*, 88, 64-68 (1963).
- PENNINGTON, R. J., ROBINSON, J. E.: Cathepsin activity in normal and dystrophic human muscle. *Enzymol. Biol. Clin.*, 9, 175-182 (1968).
- RITTER, J. VON, WENK, H., GERTH, C.: Quantitative Untersuchungen zum Diffusionsproblem enzymatisch reduzierter Pyridinnucleotide, ein Beitrag zum histochemischen Nachweis pyridinnucleotidabhängiger Dehydrogenasen. *Acta Histochem.*, 40, 51-63 (1971).
- ROBINSON, D., WILLCOX, P.: 4-Methylumbelliferyl phosphate as a substrate for lysosomal acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 183-186 (1969).
- ROELS, O. A.: Present knowledge of vitamin E. *Nutr. Rev.*, 25, 33-37 (1967).
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. Oldenbourg Verlag, München (1968).
- ROSENBAUM, R. M., ROLON, C. I.: Species variability and the substrate specificity of intracellular acid phosphatases: A comparison of the lead-salt and azo-dye methods. *Histochemie*, 3, 1-6 (1962).
- ROY, A. B.: The sulfatase of ox liver. I. The complex nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 53, 12-15 (1953).
- SASAKI, M., FISHMAN, W. H.: Dual ultrastructural localization of acid phosphatase in mouse kidney tubule cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 653-660 (1973).
- SCARLATO, G., CORNELIO, F.: Histochemical correlations in some neuromuscular disorders. In: *Muscle Diseases. Proceedings of an international Congress, Milan, 33-43 (1970)*. Ed. by J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Excerpta Medica, Amsterdam.
- SCHOLTE, H. R.: *Biochemie van spierdystrofie*. Openbare les Rotterdam (1974).

- SCOTT, M. L., CALVERT, C. C.: Evidence of a specific effect of cystine in the prevention of nutritional muscular dystrophy in vitamin E deficient chicks. *J. Nutr.*, 77, 105-108 (1962).
- SCOTT, M. L.: Studies on the interrelationship of selenium, vitamin E and sulfur amino acids in a nutritional myopathy of the chick. In *Ann. NY. Acad. Sci.*, 138, 82-89 (1966). Experimental primary myopathies and their relationship to human muscle diseases. Cons. Ed. by E. Bajusz.
- SCOTT, M. L.: Nutritional and metabolic interrelationships involving vitamin E, selenium and cystine in the chicken. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 40, 334-343 (1970).
- SHIBKO, S., TAPPEL, A. L.: Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 76-86 (1963).
- SHIBKO, S., TAPPEL, A. L.: Distribution of esterases in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 106, 259-266 (1964).
- SMITH, J. K., WHITBY, L. G.: The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 607-618 (1968).
- SUR, B. K., MOSS, D. W., KING, E. G.: Apparent heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Bioch. J.*, 84, 55P (1962).
- SWEENEY, P. R., BROWN, R. G.: Ultrastructural changes in muscular dystrophy. I. Cardiac tissue of piglets deprived of vitamin E and selenium. *Am. J. Pathol.*, 68, 479-485 (1972).
- TAPPEL, A. L., ZALKIN, H., CALDWELL, K. A., DESAI, I. D., SHIBKO, S.: Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 340-346 (1962).
- TELFORD, I. R.: Experimental muscular dystrophies in animals. A comparative study, 80-93 (1971). Charles C. Thomas publisher. Springfield.
- VANHA-PERTTULA, T.: Subcellular distributions and properties of rat testicular acid phosphatases: *Histochem. J.*, 3, 151-161 (1971).
- VARUTE, A. T.: β -glucuronidase in testes and ovaries of frogs (*Rana tigrana*): A correlation of observations on histochemistry and biochemistry. *Acta Histochem.*, 42, 77-86 (1972).
- VASINGTON, F. D., REICHARD, S. M., NASON, A.: Biochemistry of vitamin E. *Vitamins and Hormones*, 18, 43-87 (1960).
- VERITY, M. A., BROWN, M. J.: Murine hepatic and cerebral lysosomal acid phosphomonoesters. *Exp. Cell. Res.*, 35, 84-99 (1964 a).
- VERITY, M. A., BROWN, W. J.: Spectrofluorometric determination of β -glucuronidase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 106, 386-393 (1964 b).
- VLEET, J. F. VAN, HALL, B. V., SIMON, J.: Vitamin E deficiency. A sequential light and electron microscopic study of skeletal muscle degeneration in weanling rabbits. *Am. J. Pathol.*, 52, 1067-1076 (1968).
- VOGTMANN, H., PRABUCKI, A. L.: Über den Einfluss der Art des Futterfettes auf das Fettsäuremuster der Leberlipide sowie auf den Vitamin A und E Gehalt der Leber von Legehennen. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 41, 33-41 (1971).
- Vos, J.: Cellulaire membranen bij vitamine E gebrek. Een ultrastructureel en biochemisch onderzoek van de lever bij de peking-eend. Proefschrift Groningen (1972).

- WALTER, E., MORGENSTERN, E., WEBER, E.: Lysosomal and microsomal acid phosphatase in blood platelets *Naturwissenschaften*, 58, 575 (1971).
- WASSERMAN, R. H., TAYLOR, A. N.: Metabolic roles of fat soluble vitamins D, E and K. *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 179-202 (1972).
- WEINSTOCK, J. M., LUKACS, M.: Enzyme studies in muscular dystrophy. V. Vitamin E deficiency and denervation atrophy. *Enzymol. Biol. Clin.*, 5, 89-102 (1965).
- WEINSTOCK, J. M., IODICE, A. A.: Acid hydrolase activity in muscular dystrophy and denervation atrophy. In: *Lysosomes in biology and pathology deel I*, 450-468 (1969). North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- WEST, W. T., MASSON, K. E.: Degeneration and regeneration in experimental muscular dystrophy. *Amer. J. Physical. Med.*, 34, 223-239 (1955).
- WIJNGAARDEN, G. K. VAN: De spierbiopsie. Interpretatie en diagnostische waarde. Proefschrift Amsterdam (1962).
- WIJNGAARDEN, G. K. VAN, BETHLEM, J., MEIJER, A. E. F. H., HÜLSMANN, W. C., FELTKAMP, C.: Skeletal muscle disease with abnormal mitochondria. *Brain*, 90, 577-592 (1967).
- WIJNGAARDEN, G. K. VAN, BETHLEM, J.: Benign infantile spinal muscular atrophy, a prospective study. *Brain*, 96, 163-170 (1973).
- WILLIGHAGEN, R. G. J.: Histochemisch onderzoek van de activiteit van alkalische en zure fosfatase in normaal en pathologisch veranderd menselijk weefsel. Proefschrift Leiden (1960).
- WYSS, S. R., KOSTER, J. F., HÜLSMANN, W. C.: Choice of leucocyte preparation in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *Clin. Chim. Acta*, 35, 277-280 (1971).
- YU, B. P., KUMMEROW, F. A., NISHIDA, T.: Acid phosphatases of rat polymorphonuclear leucocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 1045-1048 (1966).
- ZALKIN, H., TAPPEL, A. L., CALDWELL, K. A., SHIBKO, S., DESAI, I. D., HOLLIDAY, T. A.: Increased lysosomal enzymes in muscular dystrophy of vitamin E deficient rabbits. *J. Biol. Chem.*, 237, 2678-2682 (1962).

BIJLAGEN

TABEL A. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met konijnen. Controle dieet (groep 1).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β-Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase			
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	
																		K D
E315 - 72	a0	0	0	0	0	b0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E404 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E412 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E474 - 72	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E476 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E517 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E021 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E022 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
E023 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
E026 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
II																		
E315 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E404 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
E412 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E474 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E476 - 72	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E517 - 72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
E021 - 73	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
E022 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
E023 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
E026 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

III

E315 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E404 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E412 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E474 - 72	0 0 0 0 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0
E476 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E517 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E021 - 73	0 0 0 1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0
E022 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0
E023 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0
E026 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0

IV

E315 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E404 - 72	0 0 0 0 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E412 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E474 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E476 - 72	0 0 0 0 0	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E517 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0
E021 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E022 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E023 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0
E026 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0

Legenda

I = M. Gastrocnemius, II = M. Soleus, III = M. Plantaris,
 III = Diafragma.

Niet eos = spiervezels waarvan het cytoplasma zwakker of
 even sterk met eosine kleurt als normale spiervezels.

Hyalien = spiervezels met hyaliene veranderingen.

Floccul = spiervezels met flocculaire veranderingen.

Inf. = ontstekingsinfiltraat, Reg. = regenererende spiervezels.

Spier = spiervezels.

K = korrelige neerslag, D = niet korrelige neerslag.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en
 zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline
 eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en
 zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL B. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met konijnen. 12 Dagen vitamine E deficiënt dieet (groep 2).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β-Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase		
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.
						K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D
I																	
E349 - 72	a0	0	0	0	0	b0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E352 - 72	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
E391 - 72	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
E400 - 72	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
E486 - 72	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
E487 - 72	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
E488 - 72	1	0	0	1	0	2	2	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0
E001 - 73	0	0	1	2	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	1
E002 - 73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
E003 - 73	0	0	1	2	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0
II																	
E349 - 72	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
E352 - 72	1	0	1	3	0	2	1	3	2	1	0	1	1	2	1	0	0
E391 - 72	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E400 - 72	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
E486 - 72	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
E487 - 72	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
E488 - 72	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0
E001 - 73	1	0	1	2	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0

E002 - 73	0 0 0 1 0	1 0	1 0	1 0	1 1	0 0	1 0	0 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E003 - 73	1 0 1 1 0	1 0	1 0	1 0	1 1	1 1	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
III															
E349 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E352 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E391 - 72	0 1 0 1 0	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0
E400 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E486 - 72	1 0 0 1 0	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E487 - 72	1 0 1 1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	0 0	1 1	0 0	1 0	0 0	0 0
E488 - 72	0 0 0 1 1	1 0	0 0	1 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E001 - 73	0 0 0 1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	1 0	0 0
E002 - 73	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E003 - 73	0 0 1 1 0	1 1	1 1	1 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0
IV															
E349 - 72	0 0 1 1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	0 0	0 0	0 0	1 0	1 0	1 0
E352 - 72	1 2 0 2 0	1 0	1 0	1 0	2 1	1 0	1 0	1 0	1 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E391 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E400 - 72	0 0 0 0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0
E486 - 72	0 0 0 1 0	1 1	0 0	2 0	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	1 0	0 0	0 0
E487 - 72	0 0 0 1 1	1 0	0 0	2 0	1 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0
E488 - 72	0 0 0 0 0	1 0	0 0	2 0	1 0	0 0	2 0	0 0	0 0	2 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0
E001 - 73	0 0 0 1 0	1 1	1 1	1 0	1 1	1 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	2 0	1 0	0 0	0 0
E002 - 73	0 0 1 1 0	1 1	1 1	1 0	1 1	1 1	0 0	0 0	1 1	1 0	1 0	1 0	0 0	0 0	0 0
E003 - 73	0 0 1 1 0	1 1	1 1	1 0	2 1	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	0 0	0 0	1 0	1 0	1 0

Legenda zie bijlage tabel A.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL C. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met konijnen. 19 Dagen vitamine E deficiënt dieet (groep 3).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β -Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase			
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	
																		K D
I																		
E360 - 72	a2	0	1	2	0	b2	1	2	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0
E392 - 72	2	1	2	3	0	4	3	3	3	1	0	3	2	2	1	1	0	0
E399 - 72	2	0	1	2	0	1	1	2	1	1	0	2	1	2	1	1	0	0
E403 - 72	3	0	1	3	0	4	3	3	2	1	0	4	3	2	1	1	0	0
E441 - 72	3	0	1	3	1	3	2	3	2	1	0	3	2	2	1	1	0	0
E443 - 72	1	0	2	2	1	2	2	2	1	1	0	3	2	2	1	1	0	0
E480 - 72	2	0	0	3	1	2	2	3	2	1	0	3	2	3	2	1	0	0
E498 - 72	2	0	0	2	0	2	2	2	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0
E012 - 73	0	0	0	3	1	2	2	3	2	1	0	3	3	2	1	0	0	0
E013 - 73	1	0	0	3	0	2	2	3	3	1	0	3	3	3	2	0	0	0
II																		
E360 - 72	2	0	2	2	0	4	3	2	1	0	0	2	2	1	1	1	0	0
E392 - 72	3	1	0	2	0	3	3	2	1	1	0	3	3	2	1	1	0	0
E399 - 72	2	0	2	2	1	2	1	2	1	1	0	2	1	2	1	1	0	0
E403 - 72	3	0	1	3	0	4	3	3	2	1	0	4	3	2	1	1	0	0
E441 - 72	2	1	0	3	0	2	2	2	1	1	0	2	2	2	1	1	0	0
E443 - 72	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	0	3	2	2	1	1	0	0
E480 - 72	2	0	0	2	1	2	2	2	2	1	0	2	2	2	1	1	0	0
E498 - 72	2	0	1	3	2	3	3	2	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0

E012 - 73	2 0 0 2 0	3 2	2 1	1 0	3 2	2 1	0 0	1 1	1 1	0 0	1 0	0 0	0 0
E013 - 73	2 0 0 2 1	2 2	2 2	1 0	3 2	2 2	1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	0 0	0 0
III													
E360 - 72	2 0 1 2 0	2 1	2 1	1 0	2 1	2 1	1 0	1 1	1 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E392 - 72	3 1 1 2 0	3 3	2 1	1 0	3 3	2 1	1 0	2 1	2 1	1 0	2 0	1 0	1 0
E399 - 72	2 0 1 2 0	2 1	2 1	1 0	2 1	2 1	1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	1 0	0 0
E403 - 72	3 0 1 3 0	3 2	3 2	1 0	3 2	2 2	1 0	2 1	1 1	0 0	2 0	1 0	0 0
E441 - 72	2 1 2 2 1	2 1	2 1	1 0	3 2	2 1	1 0	2 1	2 1	0 0	1 0	1 0	0 0
E443 - 72	2 0 0 2 1	2 2	2 1	1 0	3 2	2 1	1 0	1 1	2 1	0 0	1 0	1 0	0 0
E480 - 72	2 0 1 2 0	2 1	2 1	1 0	3 3	2 1	1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	1 0	0 0
E498 - 72	0 0 2 2 0	2 2	2 2	1 0	2 1	2 2	0 0	0 0	1 1	0 0	1 0	0 0	1 0
E012 - 73	2 1 0 2 1	2 1	3 2	1 0	2 1	3 2	1 0	0 0	2 1	0 0	1 0	1 0	1 0
E013 - 73	1 0 0 3 1	2 2	2 2	1 0	3 3	2 1	1 0	2 1	2 1	0 0	2 0	0 0	0 0
IV													
E360 - 72	2 1 1 2 0	2 1	2 2	1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	2 1	0 0	1 0	0 0	1 0
E392 - 72	0 2 0 2 0	2 1	2 1	0 0	2 2	2 1	1 0	1 1	1 0	1 0	2 0	2 0	1 0
E399 - 72	2 0 2 2 1	3 2	2 1	1 0	3 2	1 0	1 0	1 1	1 1	0 0	2 0	1 0	1 0
E403 - 72	3 0 0 3 0	4 3	3 2	1 0	4 3	2 1	1 0	1 1	1 1	0 0	3 0	2 0	0 0
E441 - 72	2 1 1 2 1	2 2	2 1	1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	2 1	1 0	1 0	1 0	0 0
E443 - 72	0 0 0 3 1	3 2	2 1	1 0	3 2	2 1	1 0	1 1	2 1	1 0	1 0	1 0	0 0
E480 - 72	1 0 0 1 0	1 1	0 0	1 0	1 1	1 1	1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	1 0	0 0
E498 - 72	2 0 1 2 2	3 2	1 0	1 0	3 2	1 0	1 0	2 2	2 2	0 0	2 0	1 0	0 0
E012 - 73	1 0 1 3 1	2 1	2 1	1 0	3 2	2 1	1 0	1 1	1 1	0 0	2 0	2 0	1 0
E013 - 73	1 0 0 2 0	2 2	2 1	2 0	3 3	1 0	1 0	2 2	1 1	0 0	2 0	1 0	1 0

Legenda zie bijlage tabel A.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL D. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met konijnen. Konijnen met meer dan 19 dagen vitamine E deficiënt dieet (restgroep, groep 4).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β-Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase															
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.													
																		K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D	K D				
I																														
E442 - 72	a4	2	1	4	1	b4	3	3	2	1	0	3	3	3	2	1	0	1	1	3	2	1	0	3	0	3	0	1	0	
E446 - 72	3	2	0	4	1	3	2	4	3	1	0	4	3	3	2	1	0	2	2	1	3	2	1	0	2	0	2	0	1	0
E448 - 72	3	2	0	3	0	3	3	3	2	1	0	3	3	3	2	1	0	2	2	3	2	1	0	2	0	2	0	1	0	
E450 - 72	2	2	0	4	0	4	4	4	4	1	0	4	4	4	4	1	0	1	1	3	3	1	0	1	0	0	0	1	0	
E477 - 72	2	0	0	3	1	3	3	4	3	1	0	3	3	3	3	1	0	1	1	3	3	1	0	1	0	1	0	1	0	
E478 - 72	0	0	0	4	1	4	4	4	4	1	0	4	4	4	4	1	0	2	2	3	3	1	0	3	0	3	0	0	0	
E481 - 72	2	0	0	3	2	3	3	3	2	1	0	4	4	2	2	1	0	3	1	2	2	1	0	2	0	2	0	1	0	
E497 - 72	2	0	0	3	1	2	2	3	2	1	0	3	3	3	2	1	0	1	1	2	2	1	0	1	0	1	0	1	0	
E506 - 72	2	0	0	3	2	2	2	3	3	1	0	2	2	3	2	1	0	1	1	2	2	1	0	1	0	1	0	1	0	
E004 - 73	2	0	0	3	1	2	2	3	2	1	0	3	2	3	2	1	0	1	1	2	2	1	0	1	0	0	0	1	0	
II																														
E442 - 72	3	1	0	3	1	4	3	3	2	1	0	3	3	3	2	1	0	1	1	2	1	1	0	2	0	2	0	0	0	0
E446 - 72	2	3	0	2	1	3	2	2	1	1	0	3	2	2	1	1	0	2	2	2	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0
E448 - 72	3	1	0	4	1	3	3	3	2	1	0	3	3	3	2	1	0	2	2	3	2	1	0	2	0	2	0	0	0	0
E450 - 72	2	0	0	3	0	2	1	3	2	1	0	2	1	3	2	1	0	1	1	2	2	1	0	1	0	0	0	1	0	
E447 - 72	1	0	0	3	2	3	3	4	3	1	0	3	3	4	3	1	0	1	1	2	2	1	0	1	0	1	0	1	0	
E478 - 72	0	0	0	3	1	3	3	3	3	1	0	3	3	3	3	1	0	2	2	2	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
E481 - 72	0	0	0	4	1	2	2	3	3	1	0	2	2	3	3	1	0	1	1	2	2	1	0	2	0	2	0	1	0	
E497 - 72	2	0	0	4	1	4	4	4	4	1	0	4	4	4	4	1	0	2	2	2	2	1	0	3	0	2	0	1	0	

E506 - 72	2 0 0 3 1	2 2	3 2	1 0	2 2	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	1 0	0 0	1 0
E004 - 73	0 0 0 3 2	2 1	3 2	1 0	2 1	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	1 0	1 0

III

E442 - 72	3 2 1 3 1	4 3	3 2	1 0	3 2	3 2	1 0	2 1	3 2	1 0	2 0	2 0	0 0
E446 - 72	3 3 0 3 1	3 3	3 2	1 0	3 2	2 1	1 0	2 2	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E448 - 72	3 2 0 3 0	3 2	3 2	1 0	3 2	3 2	1 0	2 2	2 1	1 0	2 0	2 0	1 0
E450 - 72	0 2 0 4 0	3 3	3 3	1 0	3 3	3 3	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	1 0	1 0
E477 - 72	1 0 0 3 3	3 3	3 3	1 0	3 3	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	1 0	1 0	1 0
E478 - 72	2 0 0 3 2	4 3	4 3	1 0	3 3	3 3	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E481 - 72	2 0 0 3 2	2 2	3 3	1 0	3 3	3 3	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E497 - 72	2 0 0 3 1	2 2	3 3	1 0	2 2	3 3	1 0	1 1	2 2	1 0	1 0	0 0	1 0
E506 - 72	2 0 0 3 1	2 1	3 2	1 0	2 2	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	0 0	0 0	1 0
E004 - 73	0 0 0 3 1	2 2	3 2	1 0	2 2	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	1 0	1 0	1 0

IV

E442 - 72	3 2 0 2 1	2 2	2 1	1 0	3 2	2 1	1 0	2 1	2 1	1 0	2 0	2 0	1 0
E446 - 72	1 3 1 3 1	3 2	3 2	1 0	3 2	3 2	1 0	2 2	3 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E448 - 72	2 2 0 3 1	2 2	2 1	1 0	2 2	3 2	1 0	2 2	2 1	1 0	2 0	2 0	1 0
E450 - 72	0 0 0 3 0	2 1	2 2	1 0	2 1	2 2	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E477 - 72	2 0 0 3 2	2 1	2 1	1 0	2 1	2 1	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	1 0	1 0
E478 - 72	0 0 0 3 1	2 1	2 2	1 0	3 2	2 1	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E481 - 72	0 0 0 3 1	2 2	2 3	1 0	3 3	3 3	1 0	1 1	2 2	1 0	1 0	1 0	1 0
E497 - 72	2 0 0 3 1	3 3	2 2	1 0	3 3	2 2	1 0	2 2	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E506 - 72	2 0 0 2 1	2 2	2 2	1 0	3 2	2 2	1 0	2 2	2 2	1 0	2 0	2 0	1 0
E004 - 73	1 0 0 3 1	2 2	3 2	1 0	3 2	3 2	1 0	1 1	2 2	1 0	2 0	1 0	1 0

Legenda zie bijlage tabel A.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL E. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met ratten. Controle groep (groep 1).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β-Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase		
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.
I																	
E298 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E301 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
E322 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
E326 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
E355 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
E356 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
E423 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
E424 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
E432 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
E433 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
II																	
E298 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
E301 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
E322 - 72	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
E326 - 72	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1

E355 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00
E356 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	10
E423 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	00	00	00	00
E424 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	00	00	00	00
E432 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	00	00	00	00
E433 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	10
III																	
E298 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	10
E301 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00
E322 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	00	00	00	00	00	00	10
E326 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00
E355 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00
E356 - 72	0	0	0	0	0	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	10
E423 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	00	00	00	00	00	00	00
E424 - 72	0	0	0	0	0	00	10	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00
E432 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	00	00	00	00	00	00	10
E433 - 72	0	0	0	0	0	00	00	10	00	00	10	00	00	10	00	00	00

Legenda

I = M. biceps femoris, II = M. gastrocnemius, III = M. rectus femoris.

Niet eos. = spiervezels waarvan het cytoplasma zwakker of even sterk met eosine kleurt als normale spiervezels.

Hyalien = spiervezels met hyaliene veranderingen.

Floccul. = spiervezels met flocculaire veranderingen.

Inf. = ontstekingsinfiltraat, Reg. = regenererende spiervezels, K = korrelig neerslag, D = niet korrelig neerslag.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

E413 - 72	0	2	2	2	0	2	2	2	1	1	0	2	1	1	1	0	2	1	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0
E415 - 72	1	2	1	1	0	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
E428 - 72	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E437 - 72	1	3	1	1	0	3	2	1	0	1	0	2	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0
E490 - 72	0	2	1	1	0	2	1	1	0	1	0	2	1	1	0	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
E491 - 72	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
III																												
E320 - 72	0	2	1	1	0	2	2	1	0	1	0	2	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
E321 - 72	0	3	1	1	0	2	2	1	0	1	0	2	1	0	0	1	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
E350 - 72	0	3	1	1	0	3	2	1	0	1	0	2	1	1	0	1	2	1	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0
E351 - 72	0	3	1	1	0	2	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E413 - 72	2	1	1	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
E415 - 72	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
E428 - 72	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E437 - 72	0	2	1	1	0	2	1	0	0	1	0	2	1	1	0	1	2	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0
E490 - 72	0	2	1	2	0	2	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	0	1	0
E491 - 72	1	1	0	2	0	1	0	2	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0

Legenda zie bijlage tabel E.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL G. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met ratten. 7 Dagen DPPD (groep 3).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β -Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase			
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	
						KD	KD	KD	KD	KD	KD	KD	KD	KD	KD	KD		
E288 - 72	a0	4	2	2	1	b3	2	2	1	0	2	1	1	0	2	0	1	0
E289 - 72	0	2	1	2	0	2	1	1	1	0	2	1	1	0	2	0	0	0
E307 - 72	0	2	1	2	0	2	2	2	1	0	2	1	1	0	2	0	1	0
E323 - 72	0	1	2	2	0	3	2	1	0	1	3	2	1	0	1	0	0	0
E324 - 72	0	1	2	2	0	2	1	2	1	1	2	1	1	0	1	0	0	0
E325 - 72	1	0	1	2	0	2	1	1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0
E357 - 72	1	0	2	2	0	2	3	1	1	1	2	1	2	0	1	0	0	0
E420 - 72	1	0	2	2	0	2	1	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0
E439 - 72	1	1	1	2	0	2	1	2	1	1	2	1	2	0	1	0	0	0
E440 - 72	0	2	1	2	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	0	0	0	1
II																		
E288 - 72	0	3	2	2	0	2	2	2	1	0	2	2	1	1	2	0	1	0
E289 - 72	1	2	1	2	0	2	1	1	0	0	2	1	1	1	2	0	1	0
E307 - 72	0	2	1	2	0	3	3	2	1	0	3	2	2	1	2	0	1	0
E323 - 72	2	1	1	2	0	3	2	1	0	0	2	1	2	2	1	0	0	0

E324 - 72	0	1	2	2	0	2	2	2	1	1	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0
E325 - 72	2	0	1	3	0	3	2	2	1	1	0	3	2	2	1	0	0	0	0	0
E357 - 72	2	1	2	2	0	3	2	2	1	1	0	3	2	1	1	0	0	0	0	0
E420 - 72	1	0	2	2	0	2	1	2	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
E439 - 72	1	1	2	2	0	2	2	2	2	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0
E440 - 72	0	0	2	3	0	2	2	3	3	1	0	2	2	3	3	1	0	2	0	0
III																				
E288 - 72	0	3	2	2	0	3	2	2	1	1	0	3	2	1	1	0	0	2	0	0
E289 - 72	0	2	1	2	0	2	2	2	2	1	0	2	1	1	1	0	0	2	0	0
E307 - 72	0	1	2	2	0	2	1	2	1	1	0	2	1	1	0	1	0	1	0	0
E323 - 72	1	2	1	1	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
E324 - 72	0	2	2	2	0	2	1	2	1	0	0	2	1	2	1	0	0	2	0	0
E325 - 72	2	0	1	2	0	3	2	2	2	0	0	3	2	2	1	0	0	2	2	0
E357 - 72	2	1	2	2	0	2	1	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	1	2	0
E420 - 72	2	1	2	2	0	3	3	1	1	0	0	2	2	1	0	0	0	2	2	0
E439 - 72	0	2	2	2	0	2	1	2	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	0	0
E440 - 72	0	2	1	3	0	2	1	3	3	1	0	2	1	2	1	0	0	2	1	0

Legenda zie bijlage tabel E.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxylie eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL H. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met ratten. 9 Dagen DPPD (groep 4).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β-Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase			
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	
																		K D
I																		
E314 - 72	a0	1	1	2	1	b2	1	2	1	0	2	1	1	0	1	0	0	0
E327 - 72	1	0	1	2	0	2	1	2	1	1	0	2	1	1	1	0	1	0
E328 - 72	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	2	1	1	0	0	1	0
E358 - 72	3	1	2	2	0	3	2	2	1	0	0	2	1	2	1	0	0	0
E359 - 72	1	0	1	2	0	3	2	2	1	0	0	2	1	2	1	0	1	0
E361 - 72	1	0	2	2	1	2	2	2	1	1	0	2	1	2	1	0	1	0
E362 - 72	1	1	1	2	0	2	1	2	1	0	0	2	1	2	1	0	0	0
E364 - 72	2	2	2	2	0	3	2	2	1	0	0	2	1	2	1	0	0	0
E425 - 72	1	0	1	2	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
E445 - 72	0	1	0	2	0	2	2	2	1	1	0	2	1	2	1	0	2	0
II																		
E314 - 72	1	1	2	3	1	3	3	2	1	1	0	3	2	2	1	1	0	0
E327 - 72	0	1	2	2	0	2	2	2	1	1	0	2	1	2	1	1	0	0
E328 - 72	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0	2	1	1	1	0	0	0
E358 - 72	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0

E359 - 72	1 0 1 2 0	2 1	1 0	1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	2 2	0 0	0 0	0 0	0 0
E361 - 72	1 1 2 2 0	2 1	1 0	1 0	1 0	1 0	1 0	1 1	1 1	0 0	1 0	0 0	1 0
E362 - 72	1 0 1 1 0	2 1	1 0	0 0	2 1	1 0	0 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E364 - 72	2 0 1 1 0	3 2	1 0	0 0	2 1	1 0	0 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E425 - 72	1 0 1 1 0	1 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E445 - 72	0 1 0 3 0	1 1	3 3	4 0	1 1	2 2	0 0	1 1	2 2	0 0	2 0	2 0	0 0
III													
E314 - 72	0 2 1 2 1	2 2	2 1	1 0	2 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E327 - 72	0 1 2 2 0	2 2	2 1	1 0	3 2	2 1	0 0	2 1	2 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E328 - 72	1 0 2 2 0	3 2	1 0	1 0	2 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E358 - 72	2 0 1 1 0	2 2	1 0	0 0	2 1	1 0	0 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E359 - 72	0 1 2 2 0	2 1	1 1	1 0	2 1	1 0	0 0	0 0	2 2	0 0	0 0	0 0	1 0
E361 - 72	1 0 2 2 0	2 1	2 1	1 0	2 1	1 0	0 0	1 1	2 2	0 0	1 0	0 0	0 0
E362 - 72	1 0 1 2 0	3 2	1 0	1 0	2 1	1 0	0 0	1 1	2 2	0 0	1 0	0 0	0 0
E364 - 72	2 1 1 1 0	3 2	1 0	0 0	2 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E425 - 72	1 1 2 2 0	2 2	2 1	1 0	2 1	2 1	0 0	1 1	2 2	0 0	1 0	0 0	0 0
E445 - 72	0 1 1 2 0	2 2	2 1	0 0	2 1	2 1	0 0	1 1	2 2	0 0	0 0	0 0	0 0

Legenda zie bijlage tabel E.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

TABEL I. Resultaten van het histologisch en enzymhistochemisch onderzoek met ratten. 11 Dagen DPPD (groep 5).

Proefdier nr.	Haematoxyline eosine					Zure fosfatase			β -Glucuronidase			E 600 resistente naftylesterase			Leucine naftylamidase			
	Niet eos.	Hyalien	Floccul.	Inf.	Reg.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	Spier	Inf.	Bindw.	
																		K D
I																		
E366 - 72	2	0	1	1	0	2	2	1	0	2	2	1	1	1	0	0	0	1
E367 - 72	1	0	1	1	0	2	1	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0	0
E427 - 72	0	2	1	1	0	2	1	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0	0
E451 - 72	2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
E452 - 72	2	2	1	1	0	2	1	1	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1
E 29 - 73	2	0	0	1	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	0	0	0	1
E 30 - 73	2	0	1	1	0	2	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
E 31 - 73	1	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
E 32 - 73	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
E 33 - 73	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
II																		
E366 - 72	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0
E367 - 72	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1
E427 - 72	1	2	1	1	0	2	1	2	1	0	2	1	1	1	0	0	0	0
E451 - 72	2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0

E452 - 72	2 0 1 1 0	2 2	1 0	1 0	2 1	1 1	1 0	2 1	1 1	0 0	0 0	0 0	1 0
E 29 - 73	2 0 0 1 0	1 1	1 0	1 0	1 1	1 0	1 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	1 0
E 30 - 73	1 0 1 2 0	1 1	1 1	1 0	1 1	1 0	1 0	0 0	1 1	1 0	0 0	0 0	1 0
E 31 - 73	1 0 0 0 0	1 0	0 0	1 0	1 1	0 0	1 0	0 0	1 1	1 0	0 0	0 0	1 0
E 32 - 73	1 0 0 1 0	1 1	1 0	1 0	1 1	1 0	1 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E 33 - 73	0 0 1 2 0	2 1	1 1	1 0	2 1	1 1	1 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0

III

E366 - 72	2 0 0 1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	1 0	0 0	0 0	1 1	1 0	0 0	0 0	0 0
E367 - 72	2 0 1 2 0	2 1	1 1	1 0	2 1	2 1	1 0	1 1	1 1	1 0	0 0	0 0	0 0
E427 - 72	0 2 1 1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	0 0	1 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E451 - 72	2 0 1 1 0	2 1	2 1	1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
E452 - 72	2 0 0 0 0	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
E 29 - 73	2 0 1 1 0	2 1	1 0	1 0	2 1	0 0	1 0	2 1	2 1	1 0	0 0	0 0	1 0
E 30 - 73	2 0 0 1 0	2 1	1 0	1 0	2 1	1 0	1 0	0 0	1 1	1 0	0 0	0 0	1 0
E 31 - 73	1 0 0 0 0	1 1	1 0	1 0	2 1	1 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0
E 32 - 73	1 0 0 1 0	1 1	0 0	1 0	1 1	0 0	0 0	0 0	1 1	1 0	0 0	0 0	1 0
E 33 - 73	1 1 0 2 0	2 1	2 1	0 0	2 1	1 1	0 0	1 1	1 1	0 0	1 0	0 0	1 0

Legenda zie bijlage tabel E.

a = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de afwijkingen in haematoxyline eosine coupes.

b = 0, 1, 2, 3 en 4 betekenen geen, geringe, matige, sterke en zeer sterke toename van de enzymactiviteit.

David E. Israël, geboren in 1939 te Amsterdam, werd in 1966 aan de Gemeente Universiteit van Amsterdam tot arts bevorderd. Vervolgens werd de militaire dienstplicht vervuld.

Van 1967 tot 1971 was hij als hoofdassistent en wetenschappelijk medewerker werkzaam op de afdelingen voor Algemene Pathologie (Hoofd Prof. Dr. M. J. de Vries) en Pathologische Anatomie (Hoofden destijds Prof. Dr. H. E. Schornagel en Dr. O. J. ten Thije) van de Erasmus Universiteit. In deze periode werd een experimenteel onderzoek naar de invloed van anti lymfocyten serum en imuran op de cellulaire en humorale immuniteit verricht. Bovendien werd deelgenomen aan een onderzoek over de morfologische afwijkingen in getransplanteerde hondelharten. Voorts werd met de specialisatie in de pathologische anatomie begonnen. Van 1971 tot 1975 was schrijver dezes als assistent en wetenschappelijk medewerker 1e klas aan het Pathologisch Anatomisch Laboratorium (Hoofd Prof. Dr. C. A. Wagenvoort) van het Wilhelmina Gasthuis te Amsterdam verbonden. In deze periode werd de specialisatie in de pathologische anatomie voltooid en werd het promotie onderzoek op de afdelingen voor Biochemie en Histochemie (Hoofd Dr. A. E. F. H. Meijer) van bovengenoemd laboratorium verricht.

In 1972 werd hij als patholoog anatoom in het specialisten register van de Koninklijke Nederlandse Maatschappij ter Bevordering der Geneeskunst ingeschreven.

Sinds 1975 is de auteur als patholoog anatoom bij de Stichting Pathologisch Anatomisch en Cytologisch Laboratorium West-Brabant werkzaam en als staf lid aan het Sint Franciscus Ziekenhuis te Roosendaal verbonden.

Naast mijn promotor ben ik velen dank verschuldigd voor het tot stand komen van dit proefschrift.

Het manuscript werd door Prof. Dr. C. A. Wagenvoort en Dr. H. F. M. Busch kritisch geëvalueerd. Van hun waardevolle suggesties werd dankbaar gebruik gemaakt.

Prof. Dr. J. Bethlem, Prof. Dr. W. A. den Hartog Jager en Dr. G. K. van

Wijngaarden stelden welwillend de klinische gegevens en spierbiopten van patiënten met spierziekten ter beschikking.

De creatine kinase bepalingen werden op het Klinisch Chemisch Laboratorium (Hoofd Dr. A. F. Willebrands) van de Cardiologische Kliniek van het Wilhelmina Gasthuis (Hoofd Prof. Dr. D. Durrer) verricht.

Drs. H. E. Elffers werkzaam op het Mathematisch Centrum te Amsterdam verrichtte het statistische onderzoek.

Van de medewerkers van het Pathologisch Anatomisch Laboratorium van het Wilhelmina Gasthuis ben ik in het bijzonder de Heer A. H. T. Vloedman zeer erkentelijk voor de adviezen en het vele werk dat hij voor mij heeft verricht. Het biochemisch onderzoek werd door hem en Mej. E. Sleyster, Mej. A. J. Span en de Heren H. de Jong, C. M. van der Loos en A. J. Tigges uitgevoerd, terwijl de histochemische bepalingen door Mevr. H. G. Romijn-van Straalen en de Heren T. Evenaars en J. L. Hof werden verricht.

Het gefixeerde materiaal werd door Mej. H. J. Dijk en de Heer E. M. E. Heeren bewerkt.

De dierexperimenten konden worden uitgevoerd dank zij de adviezen en medewerking van de Heren L. H. J. Eijgenstein en J. van de Weg.

De fotografie werd verzorgd door de Heren R. E. Verhoeven en C. Kruse. Het manuscript werd door Mevr. R. Nauta-Haagsma uit Amsterdam en Mej. M. A. D. C. Rombouts uit Bergen op Zoom getypt.

Mej. G. Brink verleende assistentie bij het samenstellen van de literatuurlijst.

De samenvatting werd door Dr. W. N. Eastham in het engels vertaald.

