

B I O C H E M I E   V A N   S P I E R D Y S T R O F I E

H . R . S c h o l t e

E r a s m u s   U n i v e r s i t y   P r e s s  
R o t t e r d a m

1 9 7 4

*Wat is spierdystrofie? Enige klinische achtergronden*

Spierdystrofie kan worden gedefiniëerd als een voortgaande, niet te stoppen, erfelijke aandoening van de spieren(1). Deze worden, de een na de ander, zwakker door degeneratie van het weefsel. Bij spierdystrofie is het zenuwstelsel intact. Een geheel ander type spierziekten wordt veroorzaakt door beschadigingen van het zenuwstelsel. Hierbij worden de spieren dunner. Dit ziekteproces wordt neurogene atrofie genoemd.

Een van de meest voorkomende spierdystrofieën is het eerst beschreven door, en later genoemd naar, Duchenne(2). Deze Franse geneesheer bestudeerde de fysiologie en pathologie van spieren. De ziekte van Duchenne is X-chromosoom gebonden recessief, en komt dus bij jongetjes tot expressie terwijl hun moeders (draagsters van de ziekte) niet ziek zijn. De ziekte uit zich aanvankelijk door moeilijkheden om vanuit een liggende in een staande houding te komen en een onvermogen tot hardlopen. Vaak zijn de patiëntjes al voor het 10de jaar aangewezen op een rolstoel om zich te kunnen verplaatsen. Ze sterven doorgaans voor hun 20ste jaar (3) aan hart- of ademhalingsstoornissen.

De oorzaak van de ziekte van Duchenne is onbekend. Het is ongeneselijk. Gezien de wijze van overerving is het waarschijnlijk dat het wordt veroorzaakt door een enzymstoornis: door een fout in de genetische informatie die de aminozuurvolgorde van een enzym bepaalt. De activiteit van zo'n enzym wordt daardoor meestal verminderd. Aangezien de ziekte niet onmiddellijk fataal is, maar gaandeweg voortschrijdt, is het waarschijnlijk, dat het bewuste enzym niet van kortlopend vitaal belang is voor de spierprocessen.

De kans voor de onderzoeker om het enzymdefect op te helderen is gering. Veel groepen onderzoekers streven dit doel reeds vele jaren na. Het onderzoek wordt zeer bemoeilijkt doordat veel enzymactiviteiten in de zieke spieren zijn veranderd. Hierbij spelen de volgende factoren een rol:

1. De afbraak van enzymen is toegenomen (zie 4).
2. De lekkage van enzymen uit de spieren naar het bloed is toegenomen (zie 5). Bij de ziekte is ondermeer het serum creatine kinase sterk gestegen. Dit speelt een belangrijke rol bij de diagnose van de ziekte.

Deze publicatie bevat de wetenschappelijke gegevens die de basis vormen voor de rede, die werd uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van gewoon lector in de biochemie, aan de Erasmus Universiteit te Rotterdam, op woensdag 29 mei 1974.

Het onderzoek werd verricht aan het Instituut Biochemie I van de Erasmus Universiteit te Rotterdam, in samenwerking met Dr. H.F.M. Busch van de Afdeling Neurologie van dezelfde Universiteit.

3. De eiwitsynthese is verhoogd(6).
4. Het spierweefsel wordt vervangen door extra bindweefsel, vetweefsel en macrofagen.
5. Uit het voorgaande zal duidelijk zijn, dat het van belang is om de minst zieke spieren van zo jong mogelijke patiëntjes te onderzoeken, omdat daar de kans op het ontdekken van het primaire enzymdefect het grootst is. Van de ontwikkeling van enzymen in spierweefsel van gezonde kinderen is echter weinig bekend.

#### *De organisatie van het onderzoek*

Het onderzoek wordt uitgevoerd in nauwe en hartelijke samenwerking met Dr.H.F.M.Busch, een neuroloog met bijzondere interesse voor spierziekten, die hij september 1972 op mij wist over te dragen.

Om de diagnose bij spierziekten met grotere zekerheid te kunnen stellen voert Dr.Busch wekelijks enige spierbiopsieën uit voor histochemisch en enzymhistochemisch onderzoek. Hierbij worden spierplakjes gesneden van enkele  $\mu$ m dikte en zodanig behandeld, dat bij microscopisch onderzoek celcomponenten en indirect enzymen zichtbaar worden. De enzymhistochemie laat zien hoe de enzymen over de verschillende spiervezeltypen zijn verdeeld. De uitkomsten zijn kwalitatief.

#### *Doel en opzet van het biochemisch onderzoek*

De bepaling van enzymen in gefractioneerd spierweefsel is een goede aanvulling op de enzymhistochemie om de volgende redenen:

1. Er worden kwantitatieve gegevens verkregen over de enzymactiviteiten in gezonde en zieke spieren, waardoor aanwijzingen worden verkregen over mogelijk gestoorde spierfuncties.
2. Gegevens betreffende de intracellulaire localisatie van enzymen worden verkregen. Met behulp van indicatorenzymen kan duidelijk worden gemaakt op welke plaats(en) in de cel de enzymen zich bevinden. Bij een dergelijk onderzoek kan geen onderscheid worden gemaakt tussen de verschillende celtypen. Bindweefsel en vetweefsel, meestal ontoegankelijk voor de enzymhistochemie, zijn nu wel toegankelijk. Zij worden met het spierweefsel ge-

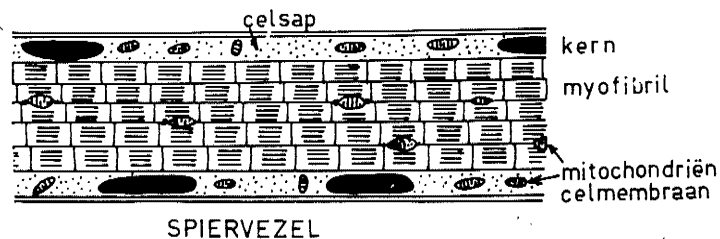
- fractioneerd. Dit nadeel hebben we proberen te overkomen door menselijk vet en bindweefsel apart te fractioneren.
3. Met behulp van de bovenstaande gegevens kan de biochemicus hulp bieden bij de diagnose van spierziekten. In tegenstelling tot sommige literatuurgegevens(7) geeft het histochemisch onderzoek vaak geen absolute zekerheid bij de diagnose. Dit blijkt regelmatig op bijeenkomsten van de Nederlandse Neuro-musculaire Studiegroep. Op grond van histochemisch en electronenmicroscopisch onderzoek is dikwijls meer dan een diagnose mogelijk. De veranderingen in de morfologie zijn vaak weinig specifiek(8).

#### *Uitvoering van de spierfractionering*

Bij een open spierbiopsie is het gebruikelijk, om het gedeelte van de spier dat niet direct voor histochemisch en electronenmicroscopisch onderzoek wordt geprepareerd, snel in te vriezen en zo koud mogelijk te bewaren. Van dit gedeelte, bestemd voor histochemie van zogeheten vriescoupes, kan wel wat worden gemist. Na inleidende experimenten met rattespieren(15) werd berekend dat met 50 mg spier een fractionering mogelijk zou zijn waarbij de verdeling van een stuk of 10 enzymen zou kunnen worden getest. Het bleek dat meestal over meer spier kon worden beschikt.

De gebruikte fractionering is schematisch weergegeven in Fig.1. Bovenaan is de doorsnede van een spiervezel of spiercel getekend. In het midden van de vezel zit het eigenlijke bewegingsapparaat: de myofibrillen. Hiervan zijn alleen de Z-schijven en de myosine-vezels weergegeven. De dunnere actine-vezels zijn weggelaten. Bij de spiercontractie schuiven de Z-schijven naar elkaar toe door interactie van de myosine en de actine. De bundel myofibrillen wordt omgeven door celsap met daarin de kernen en mitochondriën. De laatste bevinden zich ook tussen de myofibrillen. De spiercel is omgeven door een dubbel celmembraan: het plasma membraan en het basaal membraan.

Het verkregen stukje spier wordt eerst heel fijn geknipt in medium (zie Fig.1) en dan fijngewreven in een glazen buis door een draaiende teflon stamper. In het schema betekent iedere omgekeerde T een centrifuge-stap. Het homogenaat wordt eerst gedurende 10 min met een kracht van  $200 \times g_{av}$  (de zwaartekracht in het midden van de cen-



0,1-1 g spier fijnknippen en homogeniseren in 1-4 ml medium  
(0,25M suiker, 10mM tricine, 1mM EDTA ; 0°C pH 7,4)

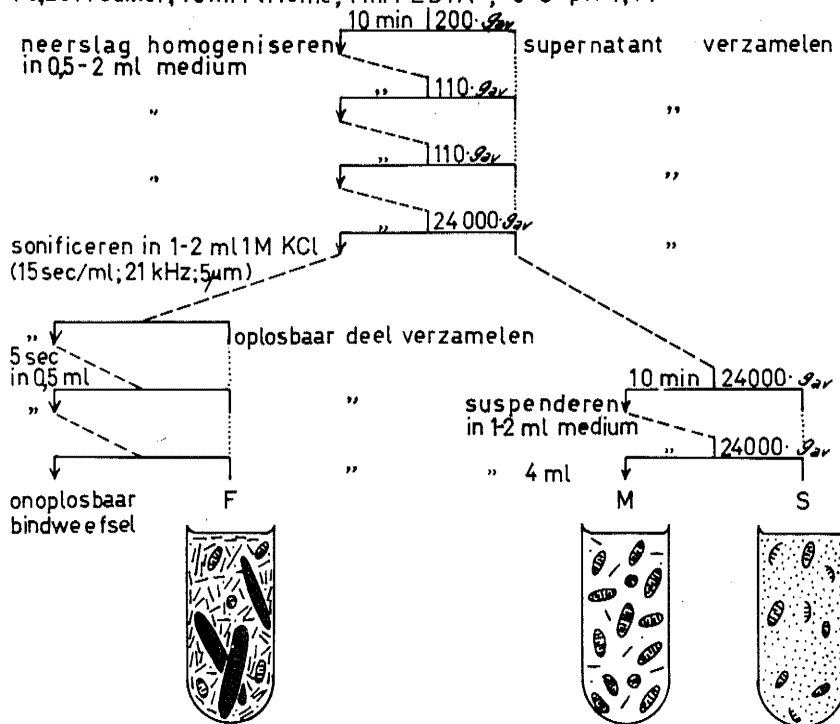


Fig.1. De verdeling van spierweefsel  
Verdere gegevens staan beschreven in de tekst.

trifugebuis) gecentrifugeerd. Nadat de bovenstaande vloeistof, het supernatant, voorzichtig is verwijderd, wordt het overgebleven sediment opnieuw gehomogeniseerd en gecentrifugeerd. Dit wordt herhaald volgens het schema. De 4de centrifugering wordt bij een veel grotere kracht (24000 x  $g_{av}$ ) uitgevoerd en dient om het volume van het gelatineuze neerslag te reduceren.

Het sediment wordt gemengd met een gelijk volume 2 M KCl en gesonificeerd (behandeld met ultrasoon geluid). Hierdoor gaan de myofibrillen in oplossing (15). Het oplosbare gedeelte wordt met een pasteurse pipet afgezogen, en het overgebleven niet opgeloste deel wordt weer gesonificeerd in 1 M KCl. Dit wordt herhaald totdat het oplosbaar gedeelte volkomen helder is geworden. De verzamelde extracten vormen de (myo)fibrillaire fractie F.

De verzamelde supernatanten van de eerste 4 centrifugeringen worden volgens schema gecentrifugeerd, en het sediment wordt in medium gesuspenderd en opnieuw gecentrifugeerd. Het opnieuw gesuspenderde sediment vormt de mitochondriale fractie M, en de verzamelde supernatanten de celsap-fractie S.

*De enzymologie : localisatie en bepaling*

Fig.2 toont de enzymen die werden bepaald en de plaats die ze in het getoonde gedeelte van de spiercel innemen. De localisaties zijn eerst hoofdzakelijk bepaald in hart- en skeletspier van de rat (9-16) en blij-

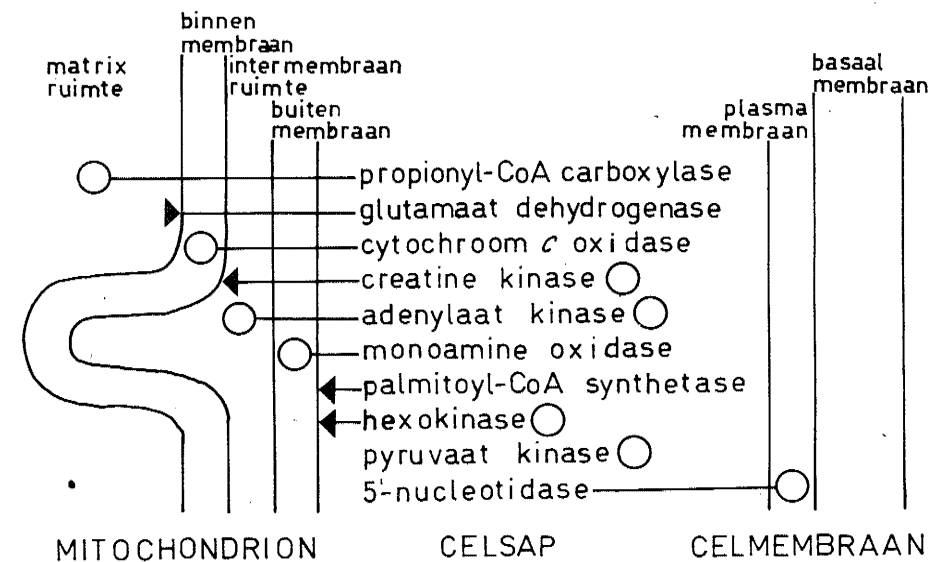


Fig.2. De localisatie van de bestudeerde enzymen in de cel. Creatine kinase en (waarschijnlijk) adenylaat kinase komen ook nog voor in de myofibrillen (15). Een klein gedeelte van de palmitoyl-CoA synthetase bevindt zich in het sarcoplasmatisch reticulum (9).

ken volgens dit onderzoek goed overeen te komen met de localisaties in menselijke skeletspier.

Eiwit, propionyl-CoA carboxylase, glutamaat dehydrogenase (na sonificeren), cytochroom *c* oxidase, creatine kinase, adenylaat kinase, monoamine oxidase (met 0,3 mM tyramine, pH 7,95, of met 0,3 mM serotonine, pH 7,2), palmitoyl-CoA synthetase 37°C, hexokinase (na sonificeren), pyruvaat kinase en 5'-nucleotidase 37°C, werden tenzij anders staat aangegeven bepaald bij 25°C, zoals vermeld in respectievelijk referentie 14,14,17,13,13,14,14,14,16,18,15 en 19. De enzymactiviteiten werden uitgedrukt in E (internationale eenheden). 1 E katalyseert de omzetting van 1 µmol substraat per minuut (bij cytochroom *c* oxidase 1 µat O( $\frac{1}{2}$  µmol O<sub>2</sub>), en bij adenylaat kinase 1 µmol NADP<sup>+</sup>).

*De menselijke weefsels*

De controle spieren werden alle verkregen onder totale narcose. De stukjes spier werden genomen uit de *M. obliquus externus* van een jongen van 7 jaar, de *M. glutaeus maximus* van een meisje van 13 jaar, de *M. pectoralis* van een man van 19, en van vrouwen van 23,26 en 47 jaar.

Bij de Duchenne patiëntjes werden de biopten genomen uit de *M. gastrocnemius* onder plaatselijke verdoving. De leeftijden waren 15,43,43,80,111,124 en 157 maanden. Zij waren allen in het eerste stadium van de ziekte (20).

De neurogeen atrofische spieren werden gebiopteerd uit de *M. gastrocnemius* van een jongen van 79 maanden, de *M. quadriceps* en de *M. deltoideus* van mannen van respectievelijk 20 en 27 jaar.

Het controle bindweefsel was een stukje *Fascia lata* van een man van 18 jaar, het vet (onderhuids) van een 26-jarige man. De leukocyten werden geïsoleerd uit 65 ml bloed van een 34-jarige man. De opbrengst was 0,46 gram cellen (nat gewicht) met 27,4 mg eiwit (volgens ref.21). De verdeling van leukocyten, die vrij veel mitochondriën bevatten, diende om vast te stellen of een verschillend gehalte bloed in de weefsels de resultaten zou kunnen beïnvloeden.

*De verdeling van eiwit en verschillende enzymen over subcellulaire fracties van controle, Duchenne en neurogeen atrofische spieren, van controle bindweefsel, vet en leukocyten*

TABEL I. EIWIT BIJ VERDELINGEN VAN MENSELIJKE WEEFSELS

	F+M+S mg/g nat gewicht	F+M+S mg/g eiwit	F %	M %	S %
C spier (n=7)	165± 9	1000	64±2	4,0±0,6	32±3
D spier (n=7)	128±13	„	60±2	3,6±0,7	37±2
NA spier (n=3)	154	„	66	3,8	30
C bindweefsel	64	„	45	3,6	52
C vet	36	„	18	7,0	75
C leukocyten	60	„	27	31	42

De weefsels werden verdeeld in een myofibrillaire (of op gelijke wijze verkregen) fractie F, een mitochondriale fractie M en een supernatant fractie S.

C staat voor controle, D voor Duchenne en NA voor neurogeen atrofische spieren. n=aantal bepalingen. Bij n >> 5 is de standaardafwijking van het gemiddelde gegeven. Als nat gewicht van de leukocyten diende dat van het geïsoleerde sediment. Deze toelichting geldt ook voor de volgende tabellen.

Bindweefsel, leukocyten en vooral vet bevatten veel minder extraheerbaar eiwit dan spier. Het verminderde eiwitgehalte van de Duchenne spieren zal te wijten zijn aan vet- en bindweefsel dat in de plaats is gekomen van het spierweefsel (tabel I). De neurogeen atrofische spieren bevatten veel minder vet- en bindweefsel dan de Duchenne spieren. Het %age eiwit van de mitochondriale fracties bij de controle spier is 4. Het is nauwelijks verlaagd bij spierziekten.

Propionyl-CoA carboxylase bevindt zich in de mitochondriale matrixruimte, en is niet of nauwelijks gebonden aan de binnenzijde van het mitochondriale binnenmembraan (13). Bij beschadiging van het binnenmembraan lekt het enzym snel weg uit de mitochondriën. Hoewel reeds veel

TABEL II. PROPIONYL-CoA CARBOXYLASE

	F+M+S mE/g nat gewicht	F+M+S mE/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=7)	40+6	237+34	44+4	24+2	32+3
D spier(n=6)	47+10	356+76	42+7	15+4	43+4
NA spier(n=3)	29	189	29	17	55
C bindweefsel	niet aan te tonen				
C vet	29	793	1,6	52	47
C leukocyten	7,1	119	13	57	30

mitochondriën beschadigd zijn bij de verdeling van controle spier (het %age activiteit in fractie S zal voor het grootste deel te wijten zijn aan beschadiging), is het duidelijk dat bij de verdelingen van zieke spier meer mitochondriën beschadigd zijn. Opvallend is de toegenomen activiteit in de gezamenlijke extracten bij de Duchenne spieren en de afgenomen activiteit bij de neurogeen atrofische spieren. Het vetweefsel bevat minder activiteit dan spier (tabel II).

TABEL III. GLUTAMAAT DEHYDROGENASE

	F+M+S E/g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=6)	0,83+0,18	5,0+1,0	32+6	31+6	38+8
D spier(n=5)	1,90+0,19	13,7+1,1	49+7	10+1	41+7
NA spier(n=3)	0,85	5,6	35	15	50
C bindweefsel	0,77	12	1,1	8,7	90
C vet	0,51	14	18	21	62
C leukocyten	1,80	30	9,3	72	19

De opbrengst van glutamaat dehydrogenase in de M fracties van de zieke spieren is laag. De totale activiteit in de Duchenne spieren is in overeenstemming met de literatuur gestegen (23). Heyck en medewerkers schrijven

deze stijging toe aan de hoge glutamaat dehydrogenase activiteit in vet- en bindweefsel. Uit de waarden van tabel III blijkt echter dat, wanneer het gefractioneerde vet- en bindweefsel goede modellen voor de vervette en verbindweefselde spieren zijn, het glutamaat dehydrogenase in de zieke spier zelf moet zijn toegenomen. De activiteit in de neurogeen atrofische spier is niet veranderd.

TABEL IV. CYTOCHROOM c OXIDASE

	F+M+S E/g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=6)	8,3+2,2	46+11	11+5	39+6	50+8
D spier(n=6)	14,4+2,9	132+21	10+1	39+4	51+5
NA spier(n=3)	9,2	59	6,5	38	55
C bindweefsel	2,8	442	0,0	35	65
C vet	17,0	466	5,2	14	81
C leukocyten	4,2	70	0,0	60	40

Cytochroom c oxidase is sterk gebonden aan het mitochondriale binnenmembran, en wordt duidelijk anders over de 3 fracties verdeeld, dan de twee voorafgaande matrix-enzymen (tabel IV). Dit zal voor een deel te wijten zijn aan het verschil in de sterkte van de binding van de enzymen met het binnenmembran, maar het kan tevens komen doordat de enzymatische samenstelling van de mitochondriën die in de buurt van de kernen zitten, en die tussen de myofibrillen in zitten, verschilt (zie 24,25). Het enzym is duidelijk gestegen in de Duchenne spieren, en gelijk gebleven in de neurogeen atrofische spieren. De stijging bij de eerste kan gedeeltelijk te wijten zijn aan het toegenomen vetweefsel. Dreyfus *et al.* (26) vonden dat de cytochroom c oxidase activiteit per nat gewicht in de Duchenne spieren was gedaald, terwijl de specifieke activiteit gelijk was aan de controle. Het verschil is mogelijk gelegen in de metingen, die in de hier beschreven experimenten werden verricht met de oxygraaf (over een korte periode), terwijl de Franse pionierstudie is uitgevoerd met het Warburg-toestel (over een langere periode).

TABEL V. PYRUVAAAT KINASE

	F+M+S E/g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=3)	73	667	5,4	0,26	94
D spier(n=3)	117	940	5,2	0,13	95
NA spier(n=3)	85	551	6,2	0,33	94
C bindweefsel	3,4	53	0,0	0,0	100
C vet	1,2	34	13	1,4	86
C leukocyten	34	569	2,8	1,8	95

Heyck en Laudahn(5,23) hebben een uitgebreide studie gemaakt van het verloop van de activiteiten van verschillende (vooral supernatant-)enzymen met het voortschrijden van de ziekte van Duchenne. Bij dit onderzoek gaat het minder om de absolute activiteiten van deze enzymen dan wel om de vergelijking van de verdelingen. Pyruvaat kinase gebruiken we als het indicator-enzym voor het celsap(15). Hebben we nu een ander enzym, dat voornamelijk in het celsap voorkomt, maar ook nog voor een klein %age in de mitochondriën of de myofibrillen zit, dan is dat te zien aan het hogere %age in deze fracties.

TABEL VI. CREATINE KINASE

	F+M+S E/g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=7)	225 <sub>±</sub> 58	1640 <sub>±</sub> 320	6,1 <sub>±</sub> 1,1	1,1 <sub>±</sub> 0,1	93 <sub>±</sub> 1
D spier(n=6)	229 <sub>±</sub> 29	1880 <sub>±</sub> 280	5,5 <sub>±</sub> 1,2	0,53 <sub>±</sub> 0,08	94 <sub>±</sub> 1
NA spier	niet bepaald				
C bindweefsel	niet aan te tonen				
C vet	0,60	17	4,5	0,5	95
C leukocyten	niet aan te tonen				

In voorbereidende experimenten met hart- en skeletspier van de rat, werd aangetoond, dat creatine kinase voornamelijk is gelocaliseerd in het celsap, maar dat aparte isoënzymen met andere kinetische eigenschappen en lading zijn gelocaliseerd in de mitochondriën en de myofibrillen(15). Dit is ook bij menselijke skeletspier het geval(vergelijk tabel VI met tabel V). Beide deeltjesgebonden creatine kinase isoënzymen zijn bij de Duchenne spieren sterk gedaald. De (veel geringere) enzymactiviteit in het vet zit waarschijnlijk in de bloedvaten die door het vetweefsel lopen(27).

TABEL VII. ADENYLAAT KINASE

	F+M+S E/g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=3)	92	1110	11	0,43	89
D spier(n=3)	206	1590	8,3	0,14	92
NA spier(n=3)	122	817	7,7	0,54	92
C bindweefsel	2,7	43	0,8	1,3	98
C vet	3,7	103	26	4,6	69
C leukocyten	4,4	74	14	36	49

Ook adenylaat kinase heeft aparte mitochondriale(14, ongepubliceerde waarnemingen) en (waarschijnlijk) myofibrillaire isoënzymen(zie Fig.2 in ref.15). Dat kunnen we hier ook weer concluderen door het vergelijken van de adenylaat kinase verdeling met die van pyruvaat kinase (tabel VII en V). In de Duchenne spieren is de activiteit in de mitochondriale fractie sterk gereduceerd, en geconcludeerd kan worden dat daar de mitochondriale buitenmembranen moeten zijn beschadigd. In dat geval lekt namelijk mitochondriaal adenylaat kinase weg uit de mitochondriën(14). Bij de neurogeen atrofische spieren is dit niet het geval. Bij beide spierziekten is het myofibrillaire isoënzym(15) verlaagd.

TABEL VIII. PALMITOYL-CoA SYNTHETASE

	F+M+S mE/g nat gewicht	F+M+S mE/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=7)	183+21	1270+180	25+5	41+5	34+4
D spier(n=6)	197+36	1550+210	26+7	23+4	51+6
NA spier(n=3)	134	864	22	19	59
C bindweefsel	1,5	23	0	32	68
C vet	83	2280	0	22	78
C leukocyten	74	1240	9,4	29	62

Volgens de verdeling komt palmitoyl-CoA synthetase voornamelijk voor in de mitochondriën, en is de activiteit in de skeletspiermicrosomen te verwaarlozen (tabel VIII, zie ook 28). Hoewel de verdeling over de fracties is veranderd, is de activiteit in de Duchenne spieren vrijwel gelijk aan die van de controle spieren. Daarentegen bleek de activiteit in de neurogeen atrofische spieren in 2 van de 3 gevallen aanzienlijk lager te zijn. Alleen bij de jongste was de activiteit gelijk aan de controlewaarde. De schaarse literatuurgegevens betreffende dit enzym kunnen niet dienen ter vergelijking aangezien die mitochondriën werden geïsoleerd met behulp van nagarse, een eiwit-splitsend enzym met een voorkeur voor palmitoyl-CoA synthetase (9,10). De gerapporteerde activiteiten zijn dan ook meer dan een factor 10 lager (29,30) dan in dit onderzoek.

TABEL IX. HEXOKINASE

	F+M+S E /g nat gewicht	F+M+S E/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=6)	1,05+0,12	6,5+0,8	18+4	6,8+1,7	75+4
D spier(n=5)	1,40+0,06	10,0+1,6	29+6	1,0+0,5	70+5
NA spier(n=3)	0,24	1,6	20	6,9	73
C bindweefsel	niet aan te tonen				
C vet	0,12	3,4	0,0	0,0	100
C leukocyten	1,75	29	1,1	16	83

Hexokinase is gestegen in de Duchenne spieren (in tegenstelling tot 23, en in overeenstemming met 31,32, tabel IX) en zeer sterk gedaald bij de neurogeen atrofische spieren. De verdeling over de 3 fracties is echter bij de laatste spieren normaal, terwijl het mitochondriale enzym vrijwel verdwenen is bij de Duchenne spieren. De daling van hexokinase bij de neurogeen atrofische spieren kan kwalijke gevolgen hebben voor de energiehuishouding. In normale spieren heeft dit enzym een geringe activiteit vergeleken met de andere glycolytische enzymen (33).

TABEL X. 5'-NUCLEOTIDASE

	F+M+S mE/g nat gewicht	F+M+S mE/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=6)	144+20	900+150	39+6	19+3	41+4
D spier(n=5)	672+79	5010+690	37+6	9,4+0,7	54+2
NA spier(n=3)	350	2320	46	16	39
C bindweefsel	3410	53000	17	13	70
C vet	133	3640	9,7	21	70
C leukocyten	70	1170	23	47	30

In overeenstemming met de literatuurgegevens (34-37) is de 5'-nucleotidase activiteit in de Duchenne spieren sterk toegenomen. Zoals uit tabel X blijkt is dit te wijten aan een toename van het bindweefsel in de zieke spieren, en niet in het abnormaal zijn van het bindweefsel (34). In de neurogeen atrofische spieren is de activiteit veel minder gestegen en in een geval van schouderbekkengordel dystrofie (*M. biceps*, man van 28 jaar) was de activiteit normaal. Bij ernstige vormen van verschillende niet-Duchenne dystrofiën vonden Kar en Pearson (37) ook sterk gestegen activiteiten. Een hoge 5'-nucleotidase activiteit is dus geen absoluut bewijs dat we te maken hebben met de ziekte van Duchenne. In een vroeg stadium van de ziekte hebben echter alle Duchenne patiëntjes een sterk gestegen spier-5'-nucleotidase.



TABEL XI. MONOAMINE OXIDASE (TYRAMINE)

	F+M+S mE/g nat gewicht	F+M+S mE/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=6)	16,9 <sub>0,8</sub>	122 <sub>19</sub>	33 <sub>6</sub>	37 <sub>3</sub>	30 <sub>3</sub>
D spier(n=7)	11,1 <sub>2,8</sub>	86 <sub>15</sub>	41 <sub>9</sub>	20 <sub>4</sub>	38 <sub>8</sub>
NA spier(n=3)	12,6	81	30	22	48
C bindweefsel	3,3	52	17	38	44
C vet	11,4	314	1,9	51	47
C leukocyten	4,6	77	14	85	1,1

De activiteit van monoamine oxidase met tyramine als substraat is zowel in de Duchenne als in de neurogeen atrofische spieren sterk afgenomen (tabel XI). Bij de Duchenne spieren is echter iets merkwaardigs aan de hand: de activiteit blijkt toe te nemen met de leeftijd. Bij het jongste patiëntje van 15 maanden is de activiteit zeer laag (4,8 mE/g nat gewicht), terwijl de oudste van 157 maanden  $\frac{3}{4}$  van de controle-activiteit heeft.

Het is mogelijk dat de monoamine oxidase activiteit in de spieren van gezonden net zo met de leeftijd toeneemt als bij de patiëntjes. Een controle van 87 maanden bleek echter een veel hogere activiteit (14,8 mE/g nat gewicht) te bezitten, dan Duchenne spier van 80 maanden (8,2 mE/g nat gewicht). De toename van activiteit in de spieren van ouder wordende Duchenne patiënten kan voor een gedeelte worden verklaard door de toename van het vet- en bindweefsel (tabel XI). Een spierbiopt van een 28-jarige Duchenne patiënt, waarbij het spierweefsel voor een groot deel was vervangen door vetweefsel, bezat een monoamine oxidase activiteit van 10,3 mE/g nat gewicht.

De overeenkomstige verdelingen met serotonine als substraat worden getoond in tabel XII. De activiteit in het vetweefsel is nu relatief veel hoger, en maakt de bepaling van het enzym in met vetweefsel geïnfiltrerde spier zinloos. Bij de 28-jarige Duchenne patiënt was de activiteit van monoamine oxidase met serotonine: 0,94 mE/g nat gewicht. Bij de neurogeen atrofische spieren, die veel minder vet- en bindweefsel bevatten, is de serotonine oxidase activiteit sterk afgenomen.

TABEL XII. MONOAMINE OXIDASE (SEROTONINE)

	F+M+S mE/g nat gewicht	F+M+S mE/g eiwit	F %	M %	S %
C spier(n=4)	0,65	3,74	17	55	27
D spier(n=1)	0,55	4,37	20	25	54
NA spier(n=2)	0,22	1,36	24	22	54
C bindweefsel	0,55	8,5	37	35	28
C vet	3,89	107	1,6	52	46
C leukocyten	0,31	5,2	12	73	15

Pas geleden verscheen er in de literatuur een artikel van Kar en Pearson over monoamine oxidase in zieke spieren (38). Het enzym werd gemeten met benzylamine als substraat. Er bleek geen verschil te zijn tussen Duchenne en controle spieren. De activiteit van neurogeen atrofische spieren was zelfs iets hoger.

*Wordt het lijden bij de spierdystrofie van Duchenne veroorzaakt door het ontbreken van monoamine oxidase in de spiermitochondriën?*

Om deze vraag te beantwoorden moeten we de functie van monoamine oxidase weten. Waarschijnlijk is dit het afbreken van de zogeheten biogene of vaatactieve aminen: adrenaline, dopamine, noradrenaline en serotonine. Wanneer de Duchenne spieren niet in staat zijn om deze aminen te deamineren en daardoor te inactiveren, kan dit ten gevolge hebben dat deze aminen zich in de zieke spiervezels op gaan hopen. Zij kunnen dan door het bewerkstelligen van vaatverwijding of -vernauwing, de doorstroming van de capillaire vaatgebieden remmen. Deze krijgen dan geen zuurstof meer, de mitochondriën kunnen geen ATP meer maken, en op den duur sterft de spier af. Een dergelijk defect in de microcirculatie, is door verschillende onderzoekers gepostuleerd als mogelijke oorzaak van de ziekte (39).

Inderdaad hebben recente onderzoekingen uitgewezen, dat bij de ziekte van Duchenne in sommige spiervezels een

stof op hoopt, die na droogvriezen en formaldehyde-behandeling fluoresceert (40), zoals de biogene aminen. Met de hulp van Dr. J. Bruinvels en Dr. P. Krediet van onze Universiteit, hebben we dit kunnen bevestigen. De stof zal worden geïdentificeerd op het laboratorium van Dr. J. S. Ploem te Leiden, door opname van het microfluorescentie-spectrum. De stof was niet opgehoopt in de neurogeen atrofische spieren. Het is dus mogelijk dat in deze spieren de monoamine oxidase activiteit, hoewel sterk gedaald, toch voldoende hoog is om de biogene aminen te deamineren.

Bij modelstudies met ratten bleek het mogelijk om een soort Duchenne-achtige dystrofie op te wekken door ratten te behandelen met serotonine plus imipramine. Imipramine, die de opname van serotonine door de bloedplaatjes remt, was absoluut nodig om de verschijnselen op te wekken (41). Het is echter moeilijk in te zien waarom de kleine hoeveelheid serotonine in de bloedplaatjes (een paar 10tal µg) het effect van de toegediende serotonine (100 mg) zou kunnen versterken. Een veel aannemelijkere verklaring zou zijn dat imipramine de monoamine oxidase in rattespier remt, zodat serotonine zich daar ongestoord zou kunnen ophopen. Imipramine bleek inderdaad de serotonine oxidase activiteit van ratteskeletspiermitochondriën (zowel intact, als in aanwezigheid van een detergens, of na sonificeren) te remmen en wel competitief met een  $K_i$  van 0,48 mM (bij minder dan 1,5 mM imipramine). Bij hogere concentraties nam de remming sterk toe. De enzymkinetica werd dan beter verklaard door de remming van 1 mol enzym door 2 mol imipramine. Deze remming trad ook op bij andere substraten (tyramine) en in andere mitochondriën (uit rattelever) (zie ook ref. 42).

Doordat de farmacologie verschillende stoffen heeft ontwikkeld die biogene aminen in bepaalde weefsels onwerkzaam kan maken, of uit weefsels kan verwijderen, hopen wij dat de ziekte van Duchenne in de niet al te verre toekomst behandeld kan worden met een therapie, die, hopelijk zonder al te onplezierige bijwerkingen, de progressie van de ziekte kan stoppen.

### Dankbetuigingen

De vele hulp, die bij dit onderzoek werd verleend door vele collega's uit Hoogbouw en Ziekenhuis, wordt hier met grote dank gememoreerd.

Het bovenstaande werd mogelijk gemaakt door de voortreffelijke technische assistentie van Janneke D. van Esch en Marcel J. Edixhoven.

Professor Willem C. Hülsmann wordt bedankt voor zijn adviezen.

### L I T E R A T U U R

1. J. N. Walton (1961) Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis. 38, 378
2. G. B. Duchenne (1868) Arch. Gén. Méd. 11, 5 en verder in dit deel.
3. P. E. Becker (1972) Humangenetik 17, 1
4. R. J. Pennington en J. E. Robinson (1968) Enzymol. Biol. Clin. 9, 175
5. H. Heyck en G. Laudahn (1969) Die Progressiv Dystrophischen Myopathien, Springer Verlag, Berlijn
6. V. Ionasescu, H. Zellweger, W. F. McCormick en T. W. Conway (1973) 245
7. R. H. T. Edwards, C. Maunder, P. D. Lewis en A. G. E. Pearse (1973) The Lancet, nov. 10, 1070
8. T. L. Munsat en C. M. Pearson (1967) Develop. Med. Child Neurol. 9, 319
9. J. W. de Jong en W. C. Hülsmann (1970) Biochim. Biophys. Acta 197, 127
10. S. V. Pande en M. C. Blanchaer (1970) Biochim. Biophys. Acta 202, 43
11. De localisatie van hexokinase werd geconcludeerd uit verdelingsstudies van andere weefsels
12. E. J. de Haan, G. S. P. Groot, H. R. Scholte, J. M. Tager en E. M. Wit-Peeters (1973) in Biochemistry of Muscle Mitochondria, Hoofdstuk 9 van Structure and Function of Muscle Vol. III, G. H. Bourne, Ed., Academic Press, New York, 417
13. E. M. Wit-Peeters, H. R. Scholte, F. van den Akker en I. de Nie (1971) Biochim. Biophys. Acta 231, 23
14. H. R. Scholte, P. J. Weijers en E. M. Wit-Peeters (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 764
15. H. R. Scholte (1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 413
16. H. R. Scholte (1973) Biochim. Biophys. Acta 330, 283
17. H. U. Bergmeyer (1970) Methoden der Enzymatische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim

18. 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM glucose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM ATP, 0,2 mM NADP<sup>+</sup>, 5 ug glucose-6-fosfaat dehydrogenase per ml (analoog aan de bepaling van adenylaat kinase)
19. J. Avruch en D.F.H. Wallach (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 233, 334
20. P.J. Vignos Jr. en M. Lefkowitz (1959) *J. Clin. Invest.* 38, 873
21. S.R. Wyss, J.F. Koster en W.C. Hülsmann (1971) *Clin. Chim. Acta* 35, 277
22. J.B. Peter (1968) *Biochem. Med.* 2, 179
23. H. Heyck, G. Laudahn en C.J. Lüders (1963) *Klin. Wschr.* 41, 500
24. W.C. Hülsmann, A.E.F.H. Meyer, J. Bethlem en G.K. van Wijn-garden (1969) *Excerpta Medica Found. Int. Congr. Ser.* 199, 319
25. W.C. Hülsmann (1970) *Biochem. J.* 116, 32 P
26. J.-C. Dreyfus, G. Schapira, F. Schapira en J. Démos, *Clin. Chim. Acta* 1, 434
27. J.E. Kirk (1969) *Enzymes of the Arterial Wall*, Academic Press, New York
28. M. Aas (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 231, 32
29. C.H. Lin, A.J. Hudson en K.P. Strickland (1972) *Life Sci. Vol. II, Part II*, 355
30. A.J. Hudson, F.T. Oteruelo, C.H. Lin, M.D. Haust en K.P. Strickland (1973) *Basic Research in Myology*, B.A. Kakulas, Ed., Excerpta Medica, Amsterdam, 561
31. E. Ronzoni, L. Berg en W. Landau (1961) *Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis.* 38, 721
32. E.F. Davidenkova, N.A. Verzhbinskaya, M.V. Savina en E.I. Schwartz (1970) *Zh. Neuropat. Psikhiat. Korsakow* 70, 1441
33. E.A. Newsholme en C. Start (1973) *Regulation of Metabolism*, John Wiley and Sons, London
34. G.H. Bourne en M.N. Golarz (1959) *Nature* 183, 1741
35. R.J. Pennington (1962) *Proc. Ass. Clin. Biochem.* 2, 17
36. A.G.E. Pearse (1963) *Research in Muscle Dystrophy*, Pitman Medical Publishing Co. Ltd., London, 189
37. N.C. Kar en C.M. Pearson (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 1125
38. N.C. Kar en C.M. Pearson (1974) *Clin. Chim. Acta* 50, 431
39. W.K. Engel (1973) in *Duchenne Muscular Dystrophy: A Histologically Based Ischemia Hypothesis and Comparison with Experimental Ischemia Myopathy*, Hoofdstuk 22 van *The Striated Muscle*, C.M. Pearson en F.K. Mostofi Eds., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 453
40. T.L. Wright, J.A. O'Neill en W.H. Olson, *Neurol.* 23, 510
41. J.M. Parker en J.R. Mendell (1974) *Nature* 247, 103
42. J.A. Roth en C.N. Gillis (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 1138