

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. O. PROKOP)
und der Abteilung für Elektronenmikroskopie
(Leiter: Dozent Dr. med. H. DAVID)
am Pathologischen Institut der Humboldt-Universität
(Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER)

Fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen am Herzmuskel der Ratte nach Leuchtgasvergiftungen

Von

G. KORB und H. DAVID

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Juli 1961)

Wie wir kürzlich berichteten (KORB), lassen sich bei genauer Untersuchung des Herzmuskels auch nach einer akuten, tödlichen Leuchtgasvergiftung in einem hohen Prozentsatz morphologische Veränderungen nachweisen. Ihre Ätiologie wird nicht einheitlich beurteilt. Während sich zahlreiche Autoren für eine Sauerstoffmangelwirkung aussprechen, gibt es auch Stimmen, die eine zusätzliche Giftwirkung in Erwägung ziehen (Literatur bei KORB). Tierexperimentelle Versuche zur Klärung dieser Frage liegen nur in geringer Zahl vor, die Ergebnisse sind widersprechend. Während CHRIST am Kaninchen und EHRLICH u. Mitarb. sowie LEWEY und DRABKIN an Hunden mit Leuchtgas Herzmuskelveränderungen erzeugen konnten, beobachtete ZONDEK lediglich eine akute Herzdilatation. GODIN gelang es weder an Kaninchen noch an Hunden nachweisbare Schäden zu erzielen, zu gleichen Resultaten kam STEIN bei Versuchen mit kleinen Nagern.

In der vorliegenden Arbeit stellten wir uns die Frage, ob es bei der Ratte mit modernen Untersuchungsmethoden gelingt, am Herzmuskel nach einer Leuchtgasvergiftung Veränderungen festzustellen.

Methodik

Insgesamt wurden 25 Ratten mit Leuchtgas vergiftet (Tabelle). Die Gaszufuhr wurde auf zwei Stufen einreguliert. Bei der ersten verstarben die Tiere nach 2—3 Std, bei der zweiten nach ungefähr 5 Std. Die Kohlenoxydsättigung des Blutes betrug beim Tode 50—75%. Bei einem Teil der Tiere wurde die Vergiftung bei der zweiten Stellung nach 2—4 Std unterbrochen und wiederholt, drei Tiere wurden nach einer Überlebenszeit von 24 bzw. 48 Std getötet. Um unter denselben Verhältnissen zu untersuchen, wie sie in der Praxis vorkommen, wurden weitere Tiere bis zu 6 Tage nach der tödlichen Vergiftung gelagert und dann erst das Herz

entnommen. 25 Ratten dienten für Kontrolluntersuchungen. Die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen erfolgten an unfixierten, nach der Messertiefkühlmethode hergestellten Schnitten. Zur Färbung verwendeten wir gepufferte, auf p_{H} 6,9 eingestellte Acridinorange- und Coriphosphinlösungen einer Konzentration von 1:10000. Zur Fettdarstellung bewährte sich eine wäßrige Astraphosphinlösung einer Konzentration von 1:1000. An ungefärbten Schnitten wurde die Eigenfluoreszenz geprüft. Formalinfixierte Gewebsstücke färbten wir mit Hämalaun-Eosin und Sudan III. Die Filterkombination des Fluoreszenzmikroskopes setzte sich aus BG 12- und OG 1-Filtern zusammen.

Tabelle

Nr.	Vers. Tier	Dauer der Leuchtgasvergiftung
1	R ₁	nach 3 Std verstorben
2	R ₅	nach 3 Std verstorben
3	R ₂₅	nach 3 Std verstorben
4	R ₂₂	nach 4 $\frac{1}{2}$ Std verstorben
5	R ₂₃	nach 5 Std verstorben
6	R ₇	nach 5 Std verstorben
7	R ₈	nach 5 Std verstorben
8	R ₉	2 Std Leuchtgas, nach 24 Std getötet
9	R ₁₀	4 Std Leuchtgas, nach 24 Std getötet
10	R ₁₃	2 Std Leuchtgas, nach 48 Std getötet
11	R ₁₁	an 2 Tagen je 3 Std Leuchtgas, am 3. Tag getötet
12	R ₁₂	an 2 Tagen je 3 Std Leuchtgas, am 3. Tag getötet
13	R ₆	an 2 Tagen je 4 Std Leuchtgas, am 3. Tag getötet
14	R ₂	an 4 Tagen je 2 Std Leuchtgas, am 5. Tag getötet
15	R ₃	an 4 Tagen je 2 Std Leuchtgas, am 5. Tag getötet
16	R ₄	an 4 Tagen je 2 Std Leuchtgas, am 5. Tag getötet
17	R ₁₄	nach 4 Std verstorben, 3 Tage Autolyse
18	R ₁₉	nach 3 Std verstorben, 4 Tage Autolyse
19	R ₁₅	nach 4 Std verstorben, 5 Tage Autolyse
20	R ₁₆	nach 2 Std verstorben, 6 Tage Autolyse
21	R ₂₀	nach 2 Std verstorben, 6 Tage Autolyse
22	R ₂₁	nach 4 $\frac{1}{2}$ Std verstorben, 6 Tage Autolyse
23	R ₁₇	nach 4 $\frac{1}{2}$ Std verstorben, 6 Tage Autolyse
24	R ₂₄	nach 5 Std verstorben, 6 Tage Autolyse
25	R ₁₈	nach 5 $\frac{1}{2}$ Std verstorben, 6 Tage Autolyse

Zur elektronenoptischen Untersuchung wurden Teile der Herzmuskulatur sofort nach dem Tode in 1 mm großen Stücken in 1%iger isotonischer, gepufferter OsO_4 -Lösung fixiert, in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und in Vestopal W eingebettet. Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Ultramikrotom nach NIKLOWITZ. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit einem elektromagnetischen Mikroskop des VEB-Fernsehelektronik Berlin angefertigt. Die Originalvergrößerung betrug 10000:1 bis 30000:1, die Aufnahmen wurden lichtoptisch nachvergrößert.

Ergebnisse

1. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen

Beim Tod nach einer 2—4stündigen Leuchtgaseinatmung zeigten die Herzen keine pathologischen Veränderungen.

Nach 5stündiger Leuchtgasvergiftung stellten sich bei 3 Tieren (R₇, R₈ und R₂₄) in feinverteilter Form innerhalb der Herzmuskelfasern

kleine Granula mit gelbbraunlicher Eigenfluoreszenz dar. In zwei Herzen (R_7 und R_8) fielen in der Nähe der subendokardialen Zone des linken Ventrikels kleine Gruppen von Herzmuskelfasern durch eine grasgrüne Fluoreszenz nach einer Acridinorange färbung auf, durch die sie sich gut von den umgebenden gelbgrün leuchtenden Muskelfasern abhoben (Abb. 2).

Nach einer 2- bzw. 4-stündigen Leuchtgasvergiftung und einer Überlebenszeit von 24 Std (R_9 und R_{10}) fanden sich herdförmige feintropfige Verfettungen im Bereich des linken Ventrikels. Sehr vereinzelt waren lichtmikroskopisch einzelne Muskelfasernekrosen zu erkennen. In beiden Herzen zeigten nach einer Coriphosphinfärbung die Sarkosomen eine auffällig unterschiedliche Leuchtintensität. 48 Std nach einer kurzen Vergiftung (R_{13}) konnten keine Veränderungen beobachtet werden.

Nach mehrmaliger kurzfristiger Leuchtgas-einatmung an vier aufeinanderfolgenden Ta-

gen (R_2 , R_3 und R_4) enthielten zwei Herzen wieder Granula mit gelbbraunlicher Eigenfluoreszenz. Einzelne Muskelfasern waren feintropfig verfettet, ab und zu hoben sich einzelne Muskelfasern durch eine grasgrüne Fluoreszenz nach einer Acridinorange färbung von der umgebenden Muskulatur ab. Mehrfach lag eine Verquellung von Gefäßwandabschnitten vor. Es ließ sich dabei in der Gefäßwand, aber auch perivasculär ein eiweißhaltiges Substrat nachweisen. Zu Blutungen war es nicht gekommen.

Bei den Autolyseversuchen konnte nach einer mindestens 3—4stündigen Vergiftung und einer Autolyse von 4 Tagen und länger nach einer

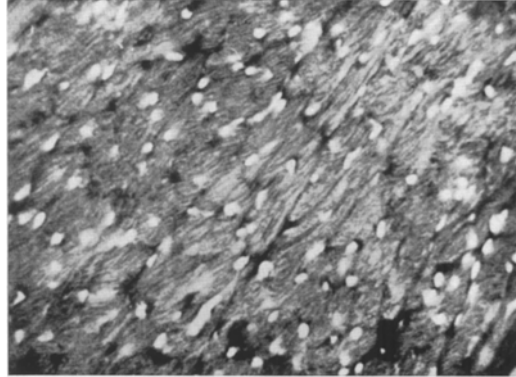


Abb. 1. Normaler Herzmuskel der Ratte. Acridinorange pH 6,9, Konzentration 1:10000, 625fach

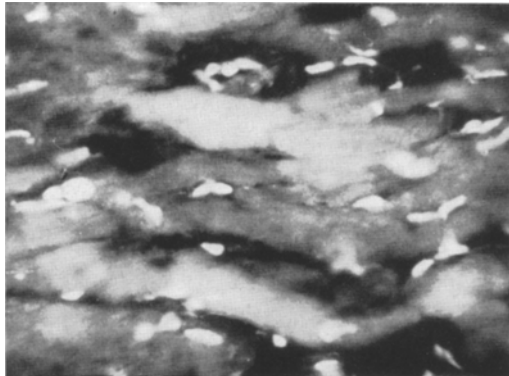


Abb. 2. R_8 , 5 Std Leuchtgas, CO—Hb 71%. Helle Muskelfasern, im Fluoreszenzmikroskop mit grasgrüner Fluoreszenz. Acridinorange pH 6,9, Konzentration 1:10000, 1000fach

Acridinorange färbung eine zunehmende orangerote Fluoreszenz der sonst gelbgrünen Myofibrillen beobachtet werden (R_{14} , R_{16} , R_{18} , R_{21} und R_{24}). Mehrfach waren die Fibrillen granulär zerfallen, die Granula leuchteten ebenfalls orangerot (Abb. 3). Bei Kontrolltieren konnten diese Befunde weder in der gleichen Regelmäßigkeit noch in der gleichen Ausdehnung erzeugt werden.

Kleine Rundzellansammlungen im Herzmuskel führten wir nicht auf die Vergiftung zurück, da sie ab und zu auch bei Kontrolltieren auftraten.

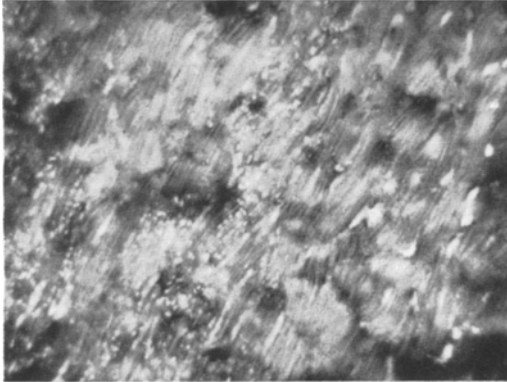


Abb. 3. R_{17} , 4,5 Std Leuchtgas. Nach dem Tod sechs Tage gelagert, deutliche Myofibrillen, stellenweise Granula. Myofibrillen und Granula im Fluoreszenzmikroskop orangerot. Acridinorange pH 6,9, Konzentration 1:10 000, 625fach

2. Elektronenoptische Beobachtungen

Die untersuchten Herzen zeigten elektronenoptisch gleichartige Befunde, die bei den einzelnen Tieren mehr quantitative als qualitative Unterschiede aufwiesen. Die Veränderungen waren in Übereinstimmung mit den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen nach einer 5tündigen Vergiftung am stärksten ausgebildet.

Normalerweise sind die Mitochondrien der Herzmuskulatur durch eine doppelte Außenmembran und zahlreiche in die Matrix mitochondriales hineinragende Cristae gekennzeichnet. In der Matrix sind jeweils mehrere osmiophile Granula sichtbar. Nach einer Leuchtgasvergiftung treten Strukturveränderungen in zwei Richtungen auf. Am häufigsten ist ein Zerfall einzelner oder Gruppen von Cristae mitochondriales zu beobachten (Abb. 4). Die Matrix weist in diesen Fällen osmiophile, homogen erscheinende Degenerationsherde auf. Im weiteren Verlauf kann es zu einer vollkommenen Zerstörung aller Cristae und einer osmiophilen Verdichtung des gesamten Innenraumes der Mitochondrien kommen. Daneben konnten Mitochondrien beobachtet werden, die bei einer allgemeinen Zunahme der Osmiophilie lediglich eine Engstellung der sonst erhaltenen Cristae zeigen (Abb. 5). Diese Mitochondrien können später bis auf die Größe von Fetttropfen schrumpfen, es sind aber auch dann noch deutliche Innenstrukturen zu erkennen. Die zweite Art der Mitochondrienveränderungen ist mit einer Flüssigkeitseinlagerung verbunden. Es kommt zu Auflockerungen, Aufhellungen und zu Herauslösungen der Matrixsubstanz (Abb. 6a). Gleichzeitig schwellen die Mitochondrien. Dieses Geschehen kann zum Platzen der Außenmembran und zum Zerfall der Mitochondrien führen (Abb. 6b). Vereinzelt sind intramitochondriale Vacuolen sichtbar.

Die normalerweise vorhandenen Mitochondriengranula schwinden bei der Leuchtgasvergiftung.

Das Sarkoplasmareticulum in der Umgebung der Mitochondrien und unter dem Sarkolemm ist vacuolisiert. In den vorliegenden Schnitten finden sich keine

Veränderungen der Myofilamente. Eine Vermehrung von Fetttropfen und Lipofuscingranula ist nicht festzustellen. Elektronenoptisch zeigen die Capillaren einen normalen Aufbau.



Abb. 4. Ausschnitt aus der Herzmuskulatur einer Ratte nach 4stündiger Leuchtgasvergiftung. Neben normal aufgebauten Mitochondrien (*M*) zeigen andere eine umschriebene Auflösung der Cristae sowie eine vollständige Verdichtung der Matrix (*X*). Aufn.-Nr. 1495. Org.-Vergr. 15 000:1, Ges.-Vergr. 30 000:1

Diskussion

Während lichtmikroskopisch lediglich Verfettungen und bei zwei Tieren nekrotische Veränderungen einzelner Muskelfasern zu erkennen waren, ist das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen reichhaltiger. So fielen zunächst in einer gewissen Abhängigkeit zur

Vergiftungsdauer in Gruppen von Herzmuskelfasern Granula mit einer gelbbraunlichen Eigenfluoreszenz auf. Sie ähneln in der Anordnung und dem Erscheinungsbild Lipofuscinablagerungen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß wir beim Menschen nach einer akuten, tödlichen Leuchtgasvergiftung regelmäßig und unabhängig vom Alter eine hochgradige Lipofuscinose des Herzmuskels vorfanden. Sollten unsere

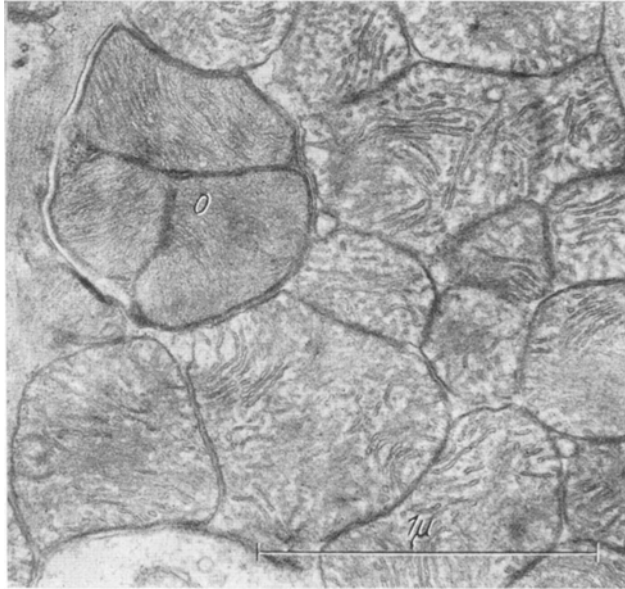


Abb. 5. Mitochondriengruppe (O) mit stärkerer Osmiophilie der Matrix nach 5stündiger Leuchtgasvergiftung. In den übrigen Mitochondrien umschriebene Homogenisierung der Cristae. Aufn.-Nr. 1511. Org.-Vergr. 20 000:1, Ges.-Vergr. 60 000:1

Granula mit Lipofuscin identisch sein, so ist ihre Anwesenheit mit der plötzlichen Mehrbelastung des Herzens zu erklären. Die zeitlichen Verhältnisse würden mit Ergebnissen von v. FINK übereinstimmen, der durch eine medikamentöse Beeinflussung der Herzarbeit eine Lipofuscinzunahme erzielen konnte.

Verfettungen von Herzmuskelfasern dürften mit Sicherheit durch die Vergiftung entstanden sein, da wir im Zusammenhang mit anderen Fragestellungen eine große Zahl von Kontrolltieren überblicken, die im Herz nie Verfettungen erkennen ließen.

Wie beim Menschen, zeigten bei einigen Versuchstieren nach einer Acridinorangefärbung einzelne oder kleine Gruppen von Muskelfasern eine auffällige grasgrüne Fluoreszenz. Wie wir bereits an anderer Stelle berichteten (HECHT, KORB und DAVID), entspricht dieser Farbumschlag

einem frühen Stadium der Nekrobiose, wobei wir heute noch nicht sagen können, ob diese Veränderung reversibel ist.

Die geringen Befunde bei der Darstellung der Sarkosomen sind normalerweise nicht sicher zu deuten. Es sei nur erwähnt, daß wir eine

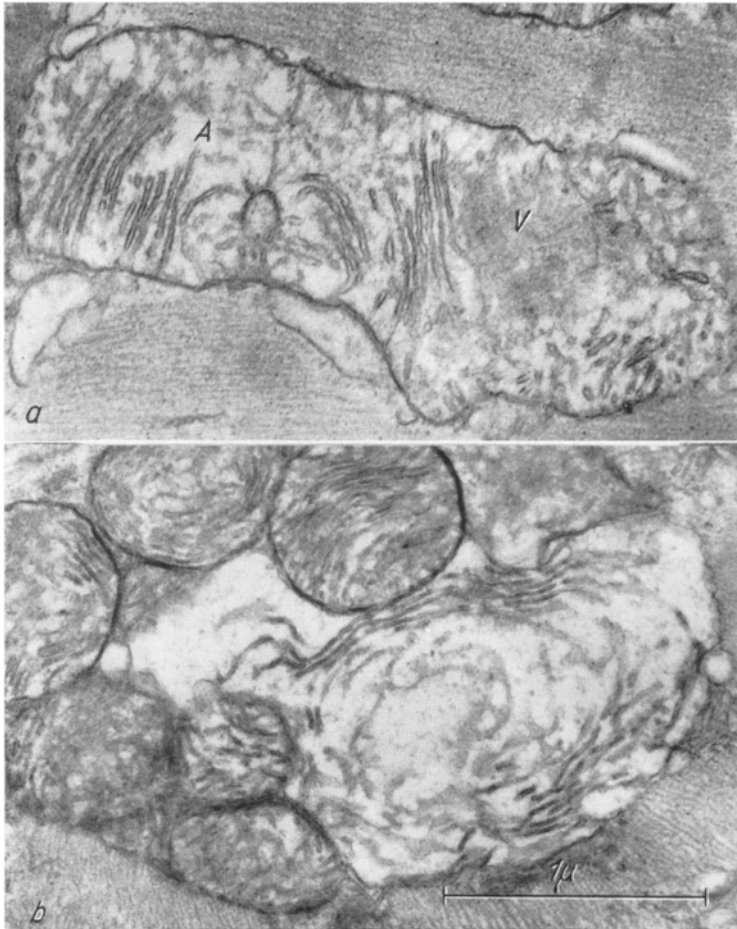


Abb. 6. a Vergrößertes Mitochondrion aus der Herzmuskulatur der Ratte nach Leuchtgasvergiftung. Aufhellungs- (A) und Verdichtungszone (V) der Matrix mitochondrialis. b Zerfallendes Mitochondrion. Nur noch einzelne Cristae-Teile sind sichtbar. In der Umgebung befinden sich nur wenig veränderte Mitochondrien. Aufn.-Nr. 1513, 1522. Org.-Vergr. 15 000:1, Ges.-Vergr. 45 000:1

ähnliche unterschiedliche Leuchtintensität dieser Gebilde auch im Randgebiet experimenteller Herzinfarkte feststellen konnten.

Die Autolyseversuche führten wir im Zusammenhang mit Beobachtungen am menschlichen Herzen durch. Herzen die erst vier Tage

oder später nach der Vergiftung obduziert wurden, zeigten regelmäßig eine orangefarbene Fluoreszenz der Myofibrillen und das Auftreten gleichleuchtender Granula und Schollen. Diese Befunde konnten am Rattenherzen reproduziert werden. Es dürfte sich dabei um Erscheinungen handeln, die mit einem veränderten postmortalen Abbau zusammenhängen.

Die elektronenmikroskopischen Befunde an den Mitochondrien, die vereinzelt bereits bei Kontrolltieren vorzufinden sind, sind auf eine Störung der Atemtätigkeit zurückzuführen. Sie sind in ähnlicher Form beim experimentellen Herzinfarkt schon nach wenigen Minuten zu erkennen (BRYANT u. Mitarb., CAULFIELD und KLIONSKY, HECHT, KORB und DAVID, TAKAKI u. Mitarb.), wurden aber auch bei einer akuten Oxydationshemmung und Störung der Atemtätigkeit beschrieben (BÜCHNER, LINDNER und WELLENSIEK, MÖLBERT). Bei allen diesen Untersuchungen sind die Veränderungen jedoch viel tiefgreifender gewesen und zu wesentlich früheren Zeitpunkten beobachtet worden als bei uns. Diese Diskrepanz läßt sich jedoch gut durch das bei unserer Versuchsanordnung mehr subakut einsetzende Geschehen erklären. Als besonderes Charakteristikum sind die Verkürzungen oder der Zerfall der Cristae mitochondriales hervorzuheben. Ein Großteil der Mitochondrienveränderungen ist als rückbildungsfähig anzusehen. Der Grund für die Tatsache, daß bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zusätzliche Befunde erhoben werden konnten, dürfte darin zu suchen sein, daß bei dieser Methode größere Gewebsareale zu überblicken sind.

Aus unseren Beobachtungen geht hervor, daß nach einer Leuchtgasvergiftung der Ratte, die ersten Zeichen einer Schädigung des Herzmuskels an den Mitochondrien auftreten. Da die Mitochondrien Sitz der Enzyme der Atmungskette sind, werden damit biochemische Befunde im Gefolge einer Leuchtgasvergiftung morphologisch untermauert. Die elektronenoptischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunde ähneln weitgehend Ergebnissen, die nach andersartigen Sauerstoffmangelzuständen beschrieben wurden. Für eine sichere spezifische Giftwirkung liegen keine Anzeichen vor. Das quantitative Ausmaß der Veränderungen spricht dafür, daß jedenfalls bei der Ratte, der durch eine Leuchtgas-einatmung bedingte Sauerstoffmangel nicht plötzlich, sondern allmählich eintritt.

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit Beobachtungen am menschlichen Herzen nach einer akuten, tödlichen Leuchtgasvergiftung, wurde versucht, im Experiment auch bei Ratten durch Leuchtgaseinatmung Herzmuskelveränderungen zu erzielen. Während lichtmikroskopische Befunde wenig eindrucksvoll sind, führen fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zu verwertbaren Ergebnissen.

Literatur

- BRYANT, R. E., W. A. THOMAS and R. M. O'NEAL: An electron microscopic study of myocardial ischemia in the rat. *Circulat. Res.* **6**, 699—709 (1958).
- BÜCHNER, F.: Die Veränderungen der Ultrastruktur der Herzmuskelzelle bei Störungen der Aerobiase. *Ärztl. Forsch.* **13**, I/307—I/314 (1959).
- CAULFIELD, J., and B. KLIONSKY: Myocardial ischemia and early infarction: An electron microscopic study. *Amer. J. Path.* **35**, 489—524 (1959).
- CHRIST, K.: Experimentelle Kohlenoxydvergiftung. Herzmuskelnekrosen und Elektrokardiogramm. *Beitr. path. Anat.* **94**, 111—125 (1934).
- EHRLICH, W. E., S. BELLET and F. H. LEWEY: Cardiac changes from CO-poisoning. *Amer. J. med. Sci.* **208**, 511—523 (1944).
- FINK, M. v.: Über die Beziehung der Ablagerung braunen Pigments zur Herzmuskel-funktion im Tierversuch. *Virchows Arch. path. Anat.* **297**, 404—409 (1936).
- GODIN, v.: Chemische, klinische und histologische Untersuchungen über länger fortgesetzte Kohlenoxydvergiftungen mit niedrigen Dosen im Tierversuch. *Z. ges. exp. Med.* **111**, 269—280 (1943).
- HECHT, A., G. KORB u. H. DAVID: Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes bei der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 267—284 (1961).
- KORB, G.: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel bei der akuten Leuchtgasvergiftung. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* (im Druck).
- LEWEY, F. H., and D. L. DRABKIN: Experimental chronic carbon monoxide poisoning of dogs. *Amer. J. med. Sci.* **208**, 502—510 (1944).
- LINDNER, E., u. H. J. WELLENSIEK: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Langendorff-Hezen unter normalen und abnormalen Bedingungen. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, S. 326—327. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- MÖLBERT, E.: Die Herzmuskulatur nach akuter Oxydationshemmung im elektronenmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **118**, 421—435 (1957).
- STEIN, W.: Tierexperimentelle Untersuchungen über Cytochrom C bei chronischer Kohlenoxydeinwirkung. *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* **14**, 251—259 (1955).
- TAKAKI, F., T. SUZUKI, H. YASUDA, H. YAMAGUCHI and Y. ONODERA: Electron-microscopic observations on experimentally produced infarction of dog hearts. *Acta path. jap.* **6**, 397 (1956).
- ZONDEK, H.: Herzbefunde bei Leuchtgasvergiftung. *Dtsch. med. Wschr.* **1920**, 235—236.

Dr. med. G. KORB, Path. Inst. d. Universität Marburg,
355 Marburg a. d. Lahn, Robert-Koch-Str. 5

Dozent Dr. med. H. DAVID,
Path. Inst. d. Charité, Berlin N 4, Schumannstr. 20/21