

## Untersuchungen an Myokardinfarkten mit der Neotetrazolmethode

C. HODEL

Pathologisches Institut der Universität Basel  
(Vorsteher: Prof. Dr. A. WERTHEMANN)

Eingegangen am 2. August 1965

Der Herzinfarkt, erstmals 1881 von ZIEGLER aus der Gruppe der Myokarditis herausgelöst und als „Myomalacia cordis“ bezeichnet und definiert<sup>4</sup>, wurde in der Folge immer häufiger kasuistisch und experimentell untersucht. Ohne Zweifel ist der Herzinfarkt heute in ständigem Zunehmen begriffen. Nach MÖRL<sup>10</sup> stieg der Anteil der mittelbar oder unmittelbar zum Tode führenden Myokardinfarkte im ganzen Sektionsgut in den 20 vergangenen Jahren von 3,02% auf 6,34%. Im hiesigen Institut wurden im Jahre 1963 unter 2195 Sektionen sogar 199 frische oder alte Myokardinfarkte (als Haupt- oder Nebenbefund) festgestellt, also 9,06%.

Immer wieder kommt es vor, daß Patienten an einem Myokardinfarkt sterben, bevor klinisch die Diagnose gesichert werden konnte. 20% aller Myokardinfarkte sollen zudem klinisch stumm verlaufen<sup>10</sup>. Auch erfahrene Obduzenten können mit den üblichen makroskopischen und lichtmikroskopischen Methoden eine frische Nekrose des Herzmuskels mit Sicherheit frühestens nach 6 Std nachweisen<sup>2, 3, 11, 13, 14, 16</sup>.

Eine Ausnahme bilden unter den übereinstimmenden Meinungen der Autoren die Untersuchungen aus der Schule LINZBACHS<sup>5, 6</sup>. Danach soll die Faserdilatation durch mangelhaft eintretende Totenstarre schon nach 30 min im Tierexperiment die Diagnose des Infarktes ermöglichen. Befunde beim Menschen liegen allerdings kaum vor. Der völlige thrombotische Verschuß des Kranzgefäßes, welcher in 34% der Infarktfälle vorkommen soll<sup>10</sup>, kann die Diagnose erleichtern. Gerade bei unklaren Todesfällen ist die Diagnose einer örtlichen beginnenden Nekrose oder Nekrobiose im Myokard eine wichtige, aber auch schwierige Aufgabe.

Um die Diagnostik zu verbessern, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Verfahren angegeben, welche elektronenoptische, fluoreszenzmikroskopische und histochemische Methoden zu Hilfe nehmen<sup>1-3, 7-9, 11, 13-16</sup>. Im Tierversuch kann der Herzinfarkt leicht ausgelöst und in genauen Zeitabständen vom auslösenden Ereignis an untersucht werden. Das histochemische Vorgehen erwies sich dabei als relativ einfach, makroskopisch verwendbar und auch auf den Menschen übertragbar<sup>8, 11, 13, 16</sup>. In einer eigenen Untersuchungsreihe haben wir geprüft, ob mit einer

histochemischen Methode vergleichbare Resultate beim Menschen gewonnen werden können. Es galt, eine einfache makroskopische Technik zu finden, welche sich routinemäßig während der Sektion durchführen läßt.

### Methodik

Wir gingen von zwei prinzipiell verschiedenen Methoden aus. Die eine benützt den Nachweis von Malatdehydrogenase, wobei Kaliumtellurit als Wasserstoffacceptor verwendet wird<sup>8</sup>. Bei der anderen wird die Bernsteinsäuredehydrogenase (SDH) mit Tetrazolsalz nachgewiesen<sup>1, 13, 16</sup>. Die erste Methode haben wir bald verlassen, weil sie für unsere Zwecke zu viele Nachteile aufwies. Einerseits ist das Kaliumtellurit als Wasserstoffacceptor unbeständig, worauf auch von anderer Seite<sup>15</sup> hingewiesen wurde. Andererseits muß die Inkubation relativ lange und im Dunkeln durchgeführt werden, was sich für eine Routinemethode erschwerend auswirkt. Beim Nachweis der SDH verwendeten wir das Neotetrazoliumchlorid (NTC) als Wasserstoffacceptor. Es hat ein stärkeres Redoxpotential als das TTC und ist billiger als das Nitro BT.

An Material wurde benötigt:

0,1% Lösung von Neotetrazoliumchlorid (*Schuchardt, München*);

0,2 m Lösung von Natriumsuccinat;

0,2 m Phosphatpuffer pH 7,6;

Glasschale, heißes Wasserbad.

Die einzelnen Lösungen sind bei 4° 1—2 Monate haltbar, dürfen aber erst unmittelbar vor Gebrauch zu gleichen Teilen zusammengewaschen werden. Herzmuskelstücke aus der linken Kammerhinterwand, der linken Kammervorderwand und aus dem Septum interventriculare verdächtiger Infarktherzen wurden gleich nach dem Anschnitt in Phosphatpuffer gespült und mit dem Lösungsgemisch in der Glasschale ins Wasserbad gestellt. Eine Temperatur von 37° und eine Inkubationszeit von 10 min erwiesen sich als ideal<sup>17</sup>. Bei geringerer Temperatur erschöpft sich die Reaktion sehr schnell. Bei längerer Inkubation wird der erreichte Kontrast nicht schärfer.

Die bei der Oxydation von Nasuccinat freigewordenen Elektronen werden wahrscheinlich direkt oder über eine Diaphorase auf das Tetrazolsalz übertragen. Sicher bestimmen auch andere Dehydrogenasen den Ablauf der Reaktion. Läßt man das spezifische Substrat weg, so ist auch dann eine schwache Reaktion erkennbar. Diese kann natürlich ebenso durch die im Herzmuskel schon vorhandene Bernsteinsäure bewirkt werden. Es empfiehlt sich jedenfalls, genügend Reagens zuzugeben, damit das Präparat von allen Seiten überspült wird. So werden mögliche Oxydationsprozesse durch Luftsauerstoff vermieden<sup>11</sup>.

Erhaltenes Myokard nimmt bei der Reduktion des NTC und dem dabei entstehenden Formazan eine tiefrote samtige Farbe an. Frische

Nekrosen werden wesentlich schwächer bzw. nicht angefärbt und setzen sich deutlich ab. Schwielen bleiben weiß. Das Ergebnis kann während der Sektion abgelesen werden und ohne weiteres kann das Präparat in einem Gemisch von NaCl und Formaldehyd (10:1) über einige Tage zu Demonstrationszwecken bei 4° aufbewahrt werden.

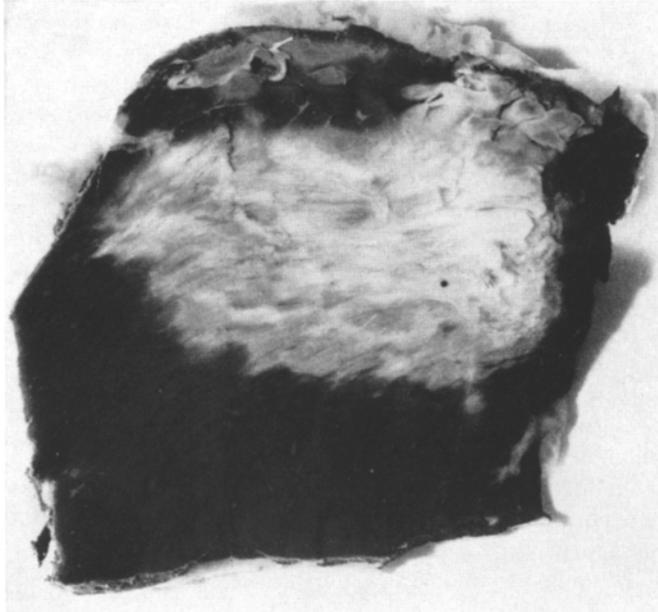


Abb. 1. Herzmuskelstück aus dem Septum interventriculare eines 58jährigen Mannes, welcher tot ins Spital eingeliefert wurde (SN 1968/64). SDH-Reaktion: Frischer Infarkt. Mikroskopisch deutliche Faserverfettungen

Alle untersuchten Herzmuskelstücke wurden anschließend histologisch mit den üblichen HE- und Fettfärbungen aufgearbeitet. Da das Formazan nur 1—2 mm weit eindringt, lassen sich ohne Bedenken die inkubierten Präparate verwenden. Zur Kontrolle dienten Myokardstücke, bei denen ein Infarkt von vornherein ausgeschlossen war.

#### *Ergebnisse*

Insgesamt kamen 50 Herzen bei fraglichem Infarkt zur Untersuchung. Zehn unauffällige Kontrollherzen zeigten gleichmäßige dunkelrote Farbe.

Unter den verdächtigen Infarkten gingen in über zwei Dritteln der Fälle eine Infarktanamnese mit typischen Retrosternalschmerzen, Lungenödem und Kollaps von unterschiedlicher Dauer voraus. Bei der

Autopsie fand sich 13mal ein thrombotischer Verschuß des Kranzgefäßes. Es gelang immer, eine umschriebene oder diffuse Coronarsklerose darzustellen. 18 Herzen zeigten sofort erkennbare makroskopische Veränderungen in Form von grauroten oder lehmigen, zum Teil schon deutlich demarkierten Verfärbungen und auch kleinen Blutungen. Die SDH-

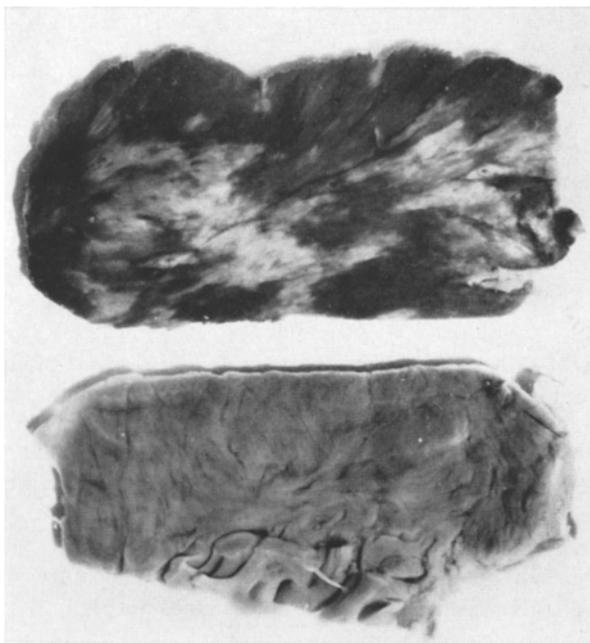


Abb. 2. Herzmuskelstück aus der linken Kammerseitenwand eines 49jährigen Mannes mit Hypertonie (SN 854/65). Oben: SDH-Reaktion: Frische Infarzierungen. Mikroskopisch vereinzelt Faserverfettungen. Unten: nicht inkubiertes Gegenstück

Reaktion ließ die nekrotische Zone als fermentarm mit reduzierter oder fast fehlender Formazanbildung noch deutlicher hervortreten. Fortgeschrittene lichtmikroskopische Veränderungen ergänzten das Bild.

In weiteren 20 Fällen fehlten sichere makroskopische Kennzeichen des Infarktes, hingegen zeigten sich im Mikroskop die typischen Veränderungen wie frische Faseruntergänge, Verfettungen und vereinzelt leukocytäre Emigrationen. Die SDH-Reaktion machte die Nekrose auch makroskopisch deutlich und ließ die Größe der Infarktzone abschätzen (Abb. 1).

In sieben Fällen fand sich weder eine makroskopische noch eine mikroskopische Veränderung. Hingegen deutete die unterschiedliche Formazanfärbung auf eine frische Herzmuskelnekrose hin (Abb. 2). Fünfmal

schließlich verhielt sich auch die SDH-Reaktion negativ. In zweien dieser Fälle hatte eine Lungenembolie, in einem eine Massenblutung im Gehirn unmittelbar zum Tode geführt. Abb. 3 veranschaulicht die Möglichkeit der makroskopischen Diagnoseverbesserung.

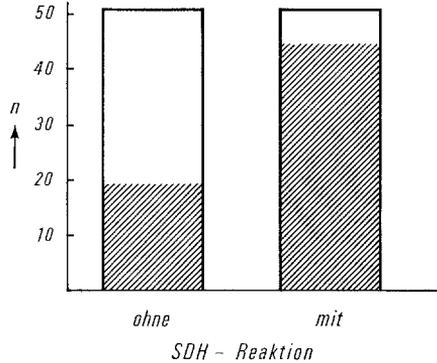


Abb. 3. Vergleich der makroskopischen Diagnose des Herzinfarktes mit und ohne SDH-Reaktion

### Diskussion

In allen Fällen, bei denen makroskopische oder lichtmikroskopische Veränderungen als Zeichen einer Herzmuskelnekrose erkennbar sind, läßt sich mit der SDH-Reaktion schon während der Sektion die Diagnose bestätigen. Darüber hinaus gibt uns die SDH-Reaktion unter Umständen auch dann positive Resultate, wenn noch keine morphologisch faßbaren Veränderungen aufgetreten sind.

Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, daß beim Kaninchen 45 min nach Unterbindung der Kranzarterie Ausfälle von SDH sich darstellen<sup>15</sup>. Bei der Ratte dauert der gleiche Prozeß 3 Std<sup>3</sup>, beim Hund gar 4—6 Std<sup>4</sup>. Während beim Tier diese Zeiten immer wieder reproduzierbar und genau zu messen sind, wird beim Menschen eine solche Zeitangabe problematisch. Offenbar ist der Zeitpunkt des auslösenden Ereignisses nicht immer mit dem Einsetzen der Symptomatik identisch, oder die Symptome fehlen gar. SANDRITTER und JESTÄDT<sup>13</sup> geben Fälle an, bei denen nach ausgesprochen kurzer Symptomatik (15 min bis 1 Std) positive Resultate auftraten, während bei 6—15 Std dauernden Symptomen weder histochemisch noch morphologisch Zeichen von Nekrose gefunden wurden. KOLIN und NEORAL<sup>8</sup> datieren die frühesten positiven Resultate auf 7 Std, NACHLAS und SHNITKA<sup>11</sup> auf 8 Std beim Menschen. Im Gegensatz dazu geben WACHSTEIN und MEISEL<sup>16</sup> 2 Std als genügend an. Eigene Fälle mit kurzer Symptomatik und deutlich positivem Resultat

bestätigen diese Unsicherheit. Immerhin können wir festhalten, daß wenige Stunden vollständiger Ischämie zum Fermentausfall führen. Die SDH-Reaktion gibt uns nicht nur einen wichtigen Hinweis, sie lokalisiert vor allem die Infarktzone und ermöglicht eine *gezielte* mikroskopische Untersuchung.

Die Fermentverminderung darf als typisches Infarktzeichen gelten. Die Farbunterschiede, wie sie im Tierexperiment nach 4—6 resp. 24 Std auftreten, sind qualitativ identisch<sup>11</sup>. Weiterhin konnten CAIN und ASSMANN<sup>1</sup> zeigen, daß beim Hund in dem Moment die Blutenzyme signifikant ansteigen, wenn die ersten ischämischen Myokardschäden histochemisch faßbar sind.

Als wertvoll hat sich die Reaktion zur Demonstration erwiesen. Dem Kliniker kann der Infarkt deutlich gezeigt werden. Die Haltbarkeit des Präparates im Eisschrank über Tage läßt auch eine Verwendung in Demonstrationskursen zu.

Alle hier verwerteten Autopsien gelangten innerhalb von 48 Std nach eingetretenem Tode zur Durchführung. In dieser Zeitspanne ist die SDH zur Genüge vorhanden, um eine einwandfreie Reaktion zu ermöglichen. Nach NANIKAWA und JANSSEN<sup>12</sup> kommt es erst nach 48 Std zu einem fleckförmigen Ausfall der SDH im Myokard. Endgültig verschwindet die SDH allerdings erst nach 6—7 Tagen<sup>3, 12</sup>. Nach 48 Std, oder wenn die Leiche bei Temperaturen von 25—37° gelagert wurde, schon nach 8 Std<sup>11</sup>, muß der Reaktionsausfall vorsichtig beurteilt werden. Da aber die Fermentaktivität in allen Herzabschnitten relativ gleichmäßig reduziert wird, sind auch nach größeren Zeitintervallen meines Erachtens Infarkt-diagnosen mit der Neotetrazol-Methode möglich.

Abschließend können wir sagen, daß die SDH-Reaktion eine wertvolle Bereicherung der Infarkt Diagnostik bringt. Sie hilft mit zur Früherkennung und zur Lokalisation ischämischer Herzmuskelschäden.

#### *Zusammenfassung*

50 verdächtige menschliche Infarktherzen wurden mit Neotetrazoliumchlorid inkubiert. Die dabei nachgewiesene SDH ist in nekrotischen Zonen deutlich vermindert. In 45 Fällen gelang es, die Diagnose bei der Sektion zu sichern und damit eine entscheidende Verbesserung der Infarkt Diagnostik zu erreichen. Die SDH-Reaktion ist immer positiv, wenn gleichzeitig makroskopische oder lichtmikroskopische Veränderungen vorhanden sind, kann aber auch dann positiv sein, wenn solche Veränderungen fehlen. Vor allem wird durch die genaue Lokalisation der Infarkte eine gezielte mikroskopische Untersuchung möglich.

*Summary*

50 possible human myocardial infarct hearts were incubated with neotetrazolium chloride solution. The presence of succinodehydrogenase tested by this method shows that it is greatly decreased in necrotic myocardial areas. In 45 cases we were able to verify immediately the diagnosis of infarct at autopsy. The succinodehydrogenase reaction is always positive when there are signs of macroscopic or microscopic changes. However, it can also be positive even if such changes are not yet evident. Above all the exact localization of the infarct allows an accurate microscopic investigation.

**Literatur**

- <sup>1</sup> CAIN, H., u. W. ASSMANN: Bedeutung und Problematik enzymatischer Gewebs- und Serumbefunde beim frischen Myocardinfarkt. *Klin. Wschr.* **38**, 433—443 (1960).
- <sup>2</sup> HECHT, A., G. KORB u. H. DAVID: Vergleichende histochemische, fluoreszenz-mikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 267—284 (1961).
- <sup>3</sup> — Fermenthistochemische Frühveränderungen beim experimentellen Herzinfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 414—423 (1964).
- <sup>4</sup> HODEL, C.: ERNST ZIEGLER (1849—1905) ein großer Forscher und Lehrer. (Im Druck)
- <sup>5</sup> HORT, W.: Ventrikeldilatation und Muskelfaserdehnung als früheste morphologische Befunde beim Herzinfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 72—82 (1965).
- <sup>6</sup> —, u. S. DA CANALIS: Untersuchungen am Rattenherzen mit Dauerligatur der linken Kranzarterie unter besonderer Berücksichtigung der Infarktgröße. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 53—60 (1965).
- <sup>7</sup> JESTÄDT, R., u. W. SANDRITTER: Erfahrungen mit der TTC-Reaktion für die pathologisch-anatomische Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Z. Kreislforsch.* **48**, 802—809 (1959).
- <sup>8</sup> KOLIN, A., L. NEORAL u. R. KODOUSEK: Die enzymatische Makroreaktion zur pathologisch-anatomischen Diagnostik der Frühstadien des Myocardinfarktes unter Anwendung der Dehydrogenasereaktion. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 233—258 (1959).
- <sup>9</sup> KORB, G., u. G. KNORR: Vergleichende licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen frischer Herzmuskelschäden beim Menschen. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 159—164 (1962).
- <sup>10</sup> MÖRL, H.: Über den Myocardinfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 383—394 (1964).
- <sup>11</sup> NACHLAS, M. M., and TH. K. SHNITKA: Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Amer. J. Path.* **42**, 379—405 (1963).
- <sup>12</sup> NANIKAWA, R., u. W. JANSSEN: Über das postmortale Verhalten der Succinodehydrogenaseaktivität in Geweben und Leukocyten. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **56**, 44—56 (1965).
- <sup>13</sup> SANDRITTER, W., u. R. JESTÄDT: Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh. dtsh. path. Ges.* **41**, 165—170 (1957).

- <sup>14</sup> SHNITKA, TH. K., and M. M. NACHLAS: Histochemical alteration in ischemic heart muscle and early myocardial infarction. *Amer. J. Path.* **42**, 507—523 (1963).
- <sup>15</sup> STOFER, A. R.: Die Früherfassung des experimentellen Herzinfarktes der Ratte mit der TTC-Reaktion. *Path. et Mikrobiol. (Basel)* **27**, 467—473 (1964).
- <sup>16</sup> WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Succinodehydrogenase activity in myocardial infarction and in induced myocardial necrosis. *Amer. J. Path.* **31**, 353—365 (1955).
- <sup>17</sup> ZIMMERMANN, H., u. D. PLATT: Experimentelle vergleichende Untersuchungen über qualitative und quantitative Darstellung von Dehydrogenasen und Diaphorasen. *Histochemie* **2**, 125—135 (1960).

Dr. C. HOEDEL  
Pathologisch-anatomisches Institut der Universität  
Basel/Schweiz, Hebelstraße 24