

Aus dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin,  
dem Rudolf-Virchow-Haus der Charité (Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER)

## Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte\*

Von

ARNO HECHT, GERHARD KORB und HEINZ DAVID

Mit 10 Textabbildungen, davon 2 farbigen

(Eingegangen am 6. Februar 1961)

Nach wie vor ist die Zahl der Fälle groß, bei denen klinisch die Zeichen des Herzinfarktes vorliegen, pathologisch-anatomisch aber die Infarktdiagnose wegen der Kürze der Überlebensdauer nicht gestellt werden kann.

Die bisher entwickelten Verfahren zur *Makrodiagnose* eines Frühinfarktes (SANDRITTER und JESTÄDT 1957, JESTÄDT und SANDRITTER 1959 und KOLIN u. Mitarb. 1959) haben sich wegen der Kompliziertheit in ihrer Anwendung nicht durchsetzen können. Versuche, einen Frühinfarkt klinisch wie auch postmortal durch *Enzymveränderungen im Blut* zu sichern, sind bisher unbefriedigend verlaufen, da die Spezifität der entsprechenden Befunde nicht ausreichend ist (BING u. Mitarb. 1956, SIEGEL und BING 1956, SCHLIEF und KAMM 1958, DOTZAUER 1959, CAIN und ASSMANN 1960, zusammenfassende Darstellung bei JENNINGS und WARTMAN 1957).

Mit den üblichen *lichtmikroskopischen Methoden* ist nach übereinstimmenden Angaben ein Herzinfarkt frühestens nach 5—6 Std sicher zu erkennen (CAULFIELD und KLIONSKY 1959, SAPHIR 1959). Lediglich SOLBACH (1941) gibt an, daß bei hypoxämischen Schädigungen bereits nach 15 min greifbare Veränderungen vorliegen.

*Histochemisch* und *elektronenoptisch* sind bereits kurz andauernde Durchblutungsstörungen durch einen Glykogenverlust und Mitochondrienveränderungen zu erfassen. Untersuchungen zur Ultrastruktur des Herzmuskels bei der Aerobiose unter verschiedenen Bedingungen liegen von der Büchnerschen Schule vor (MÖLBERT 1957, MÖLBERT und ILJIMA 1958, 1959; BÜCHNER, MÖLBERT und THALE 1959, BÜCHNER 1959). Das elektronenoptische Bild des experimentellen Herzinfarktes ist von TAKAKI u. Mitarb. (1956) am Hundeherzen, von BRYANT u. a. (1958) am Rattenherzen und von CAULFIELD und KLIONSKY (1959) am Kaninchenherzen beschrieben worden. Allerdings wird bei einer Anwendung in der Praxis die Aussagekraft dieser Methoden schon allein durch den Einfluß postmortalen Veränderungen abgeschwächt.

Da nur wenige und unzureichende Angaben über *Sekundärfluoreszenzen* am normalen Herzmuskel vorliegen (SCHÜMMELFEDER 1950, KRIEG 1953 sowie HICKS und MATTHAEI 1955), ist es nicht überraschend, daß Veröffentlichungen über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen beim Herzinfarkt bisher nicht bekannt sind. Lediglich KNOLLE und TYMMEL (1958) streifen das Problem, indem sie mit Hilfe der Benzypren-Coffein-Methode Herzmuskelverfettungen beim Herzinfarkt darstellen.

Auf Grund der angeführten Tatsachen haben wir die Frühveränderungen beim Herzinfarkt mit den Methoden der Histochemie, Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie gleichzeitig untersucht. Das erste Auftreten histochemischer Veränderungen diente dabei als Gradmesser für die Leistungsfähigkeit der Fluoreszenzmikroskopie. Die elektronenoptischen Untersuchungen sollten die Ergebnisse ergänzen und vor allem die Veränderungen in den ersten beiden Stunden des Infarktgeschehens aufzeigen.

\* Herrn Professor Dr. L. H. KETTLER zum 50. Geburtstag gewidmet.

### Methodik

Die meisten experimentellen Untersuchungen zum Infarktproblem wurden bisher an Hunden vorgenommen (BLUMGART u. Mitarb. 1941, KENT und DISEKER 1955, BING u. Mitarb. 1956, WARTMAN u. Mitarb. 1956, CAIN und ASSMANN 1958). Da aber beim Hund das Versorgungsgebiet der Herzkranzarterien in Zusammenhang mit Anastomosenbildungen unterschiedlich sein kann und es daher schwierig ist, stets Infarkte gleicher Ausdehnung und Lokalisation zu erhalten, wählten wir die Ratte als Versuchstier. Als erster hat HEIMBURGER (1946) bei ihr die Ligatur der linken Herzkranzarterie durchgeführt. Wir stützten uns bei der Technik auf die Angaben von JOHNS und OLSON (1954). Bei einiger Übung läßt sich der Eingriff in kombinierter Urethan-Äther-Narkose und O<sub>2</sub>-Beatmung in wenigen Minuten ausführen. Die Ausdehnung des Infarktes reicht von der Basis bis zur Spitze der linken Herzvorderwand. Insgesamt kamen 56 Herzinfarkte von unterschiedlicher Dauer zur Beobachtung (s. Tabelle).

Tabelle

Anzahl der Ratten	4	1	1	8	5	7	2	8	6	6	2	6
Infarktdauer . . .	10 bis 20 min	30 min	1 Std	2 Std	3 Std	4 Std	5 Std	6 Std	8 Std	10 Std	15 Std	20 Std

Ein Teil des Herzens wurde jeweils sofort unfixiert nach der Messertiefkühlmethode geschnitten, der Rest in 4% Neutralformalin fixiert. Weiter wurden für die elektronenoptischen Untersuchungen Teile aus der Herzmuskulatur im Gebiet des Infarktes 15 und 20 min sowie 2, 4 und 6 Std nach Anlage der Ligatur entnommen. Neben HE- und HS-Färbungen wurden an den unfixierten Schnitten folgende histochemische Fermentnachweise durchgeführt: Succinodehydrogenase (nach SELIGMAN und RUTENBERG), alkalische Phosphatase (nach GOMORI) und Cytochromoxydase (Nadi-Reaktion). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden unfixierte und fixierte Schnitte mit Acridinorange (Bayer), Coriphosphin 0 (Grübler) sowie zur Fettdarstellung mit Astraphosphin (Bayer) gefärbt. Die ersten beiden Fluorochrome kamen, in Veronal-Acetat-Puffer nach MICHAELIS gelöst, in einer Konzentration von 1:10000 zur Anwendung. Bei der Färbung des unfixierten Materials wurden die Farblösungen auf einen p<sub>H</sub>-Wert von 4,5 und 7,0 eingestellt. Die Färbung des fixierten Materials erfolgte mit Acridinorange (AO) bei einem p<sub>H</sub>-Wert von 5,0 und mit Coriphosphin (CO) bei einem p<sub>H</sub>-Wert von 4,0 und 6,0. Die Färbedauer betrug 10 min; anschließend wurden die Schnitte in farbstofffreien Pufferlösungen gespült und eingedeckt. Es erwies sich als notwendig, die Farblösungen spätestens nach 8 Tagen neu anzusetzen. Astraphosphin verwendeten wir in wäßriger Lösung in einer Konzentration von 1:1000.

Als Lichtquelle diente uns ein HBO 200-Quecksilberhöchstdruckbrenner. Die Filterkombination setzte sich aus BG 12- und OG 1-Filtern zusammen.

Das für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen entnommene Gewebe wurde eine Stunde in gepufferter, isotonischer OsO<sub>4</sub>-Lösung fixiert mit anschließender Entwässerung in Aceton und Einbettung in Vestopal W nach RYTER und KELLENBERGER (1958). Die Ultradünnschnitte wurden mit Ultramikrotomen nach NIKLOWITZ hergestellt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem elektrostatischen Gerät Typ D<sub>2</sub> der Firma VEB Carl Zeiss Jena. Die Originalvergrößerungen betrugen 7200:1 und 12800:1, dazu kamen lichtoptische Nachvergrößerungen.

### Ergebnisse

**I. Lichtmikroskopische und histochemische Ergebnisse.** Bis zu 5 Std nach der Unterbindung ist in den mit Hämalaun-Eosin oder Hämalaun-Sudan gefärbten

Schnitten lediglich in einem begrenzten Bezirk der linken Vorderwand eine deutliche Dissoziation der Muskelfasern zu erkennen. Sie findet sich erstmalig 2 Std nach der Unterbindung und dürfte auf die Ausbildung eines intercellulären Ödems zurückzuführen sein. Während nach 4 Std nur ganz vereinzelt eine beginnende Verfettung der Muskelfasern zu erkennen ist, treten nach 5—6 Std regelmäßig verfettete Muskelfasern längs der Infarkttränder und vereinzelt auch in der zum Infarktgebiet gehörenden subendokardialen Zone auf. Zu diesem Zeitpunkt haben die Muskelfasern in der äußeren Infarktzone meist ihre Querstreifung verloren, besonders in den Randgebieten sind Kernveränderungen im Sinne von Karyolysis und Pyknosen zu erkennen. Stellenweise dringen von der Randzone her Leukocyten in den Infarkt ein.

Bei den histochemischen Untersuchungen zeigt die Succinodehydrogenase 3 Std nach der Unterbindung erstmalig eine sicher erkennbare Aktivitätsverminderung, durch die sich die Infarkte in ihrer ganzen Ausdehnung abheben. Die Abnahme wird mit der Zeit stärker, jedoch läßt sich im Infarktgebiet die SDH auch nach 20 Std noch nachweisen.

Die alkalische Phosphatase verhält sich ähnlich (Abb. 1 und 2), allerdings verläuft die Aktivitätsminderung wesentlich schneller. Bereits nach 8—10 Std liegt ein fast völliger Schwund des Enzyms vor und nach 20 Std ist im Infarktgebiet unter den gegebenen Bedingungen keine alkalische Phosphatase mehr nachweisbar. Eigenartig ist das Verhalten der Cytochromoxydase, da hier eine Verminderung der Aktivität erst nach 15—20stündiger Unterbindung zu beobachten ist. Zu früheren Zeitpunkten liegt eine sichere Erhöhung der Aktivität vor, die nicht etwa durch sich mitanfärbende Fette vorgetäuscht wird. Diese heben sich vielmehr deutlich in der Randzone des Infarktes durch ihren bläulich-violetten Farbton ab. Eine erhöhte Enzymaktivität findet sich auch bei der SDH im Randgebiet, was besonders gut bei Tieren mit 5stündiger Unterbindung zu erkennen ist. Auch die übrige, nicht betroffene Muskulatur der

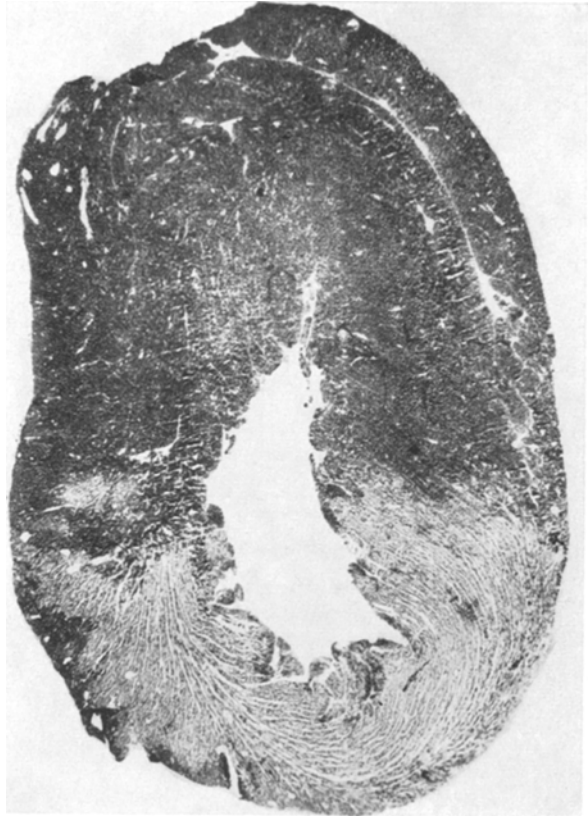


Abb. 1. Deutliche Verminderung der Succinodehydrogenaseaktivität nach 6stündiger Unterbindung. Vergr. 9fach

Infarktherzen zeigt eine zwar gering, aber doch eindeutig verstärkte SDH-Reaktion.

Bei allen drei Reaktionen konnten auch nach 20 Std in der zum Infarkt gehörenden subendokardialen Zone keine Veränderungen festgestellt werden.

**II. Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse<sup>1</sup>.** 1. *Unfixierte Schnitte.* Da an anderer Stelle das fluoreszenzmikroskopische Bild des normalen Herzmuskels

ausführlich geschildert wird (KORB u. HECHT), möchten wir uns sofort den pathologischen Veränderungen beim Herzinfarkt zuwenden, zum besseren Verständnis jedoch jeweils einen kurzen Hinweis auf die normalen Befunde geben.

*Eine Stunde* nach Unterbindung der linken Herzkranzarterie sind in einem begrenzten Teil des Herzmuskels bei CO pH 4,5 einzelne Muskelfasern zu erkennen, deren Struktur zum Teil verwischt, zum Teil durch vergrößerte Myofibrillen gekennzeichnet ist. Diese Fasern leuchten etwas intensiver grün bis oliv-grün als normal. Bei AO pH 7,0 ist die Fluoreszenz geringgradig nach gelb-

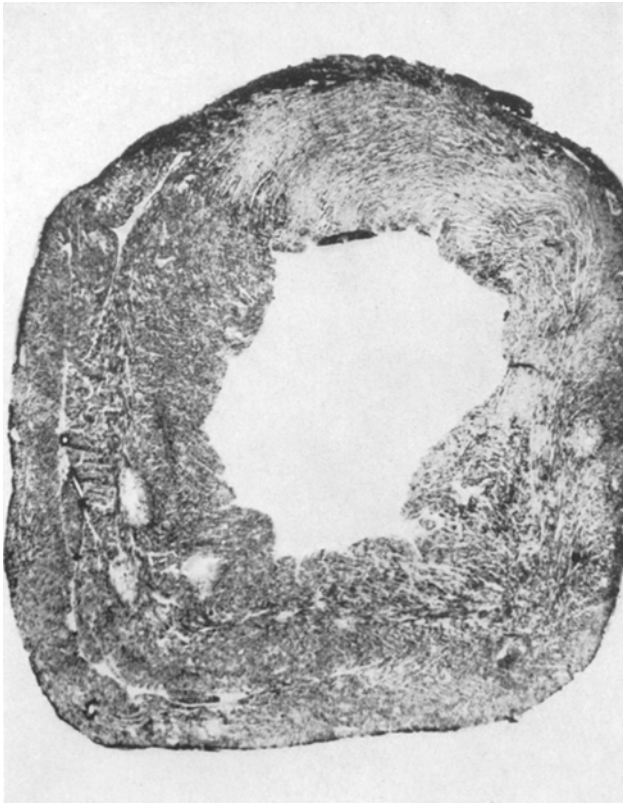


Abb. 2. Erheblicher Schwund der alkalischen Phosphatase bei einem 6stündigen Infarkt. Vergr. 9fach

grün verschoben, im Gegensatz zu der normalerweise gelb-grünen bis schwach orangefarben nachzuweisenden Mischfluoreszenz (Abb. 3).

Nach *zwei Stunden* hebt sich der Infarkt bei Färbung mit Astraphosphin in seiner ganzen Ausdehnung durch eine hellere, mehr grüne Fluoreszenz von dem schwach bräunlichen Farbton der nicht veränderten Umgebung ab. Dies gilt besonders für die Randzone; im Inneren des Infarktes sind die Veränderungen mehr fleckförmig ausgebildet. *Im Infarktzentrum zeigen einzelne Muskelfasern bei AO und CO pH 4,5 eine deutliche Querstreifung*, die sonst fluoreszenzmikroskopisch nicht zu erkennen ist.

<sup>1</sup> In gekürzter Form auf der Tagung der Nord- und Westdeutschen Pathologen in Kiel vom 30. 9.—2. 10. 1960 vorgetragen.

Nach *drei Stunden* hat die Intensität der Fluoreszenz des Infarktes bei Astraphosphinfärbung weiter zugenommen. An den Infarktträndern treten erstmalig feinste Fetttropfchen längs der Myofibrillen auf. Bei AO, in geringerem Maße

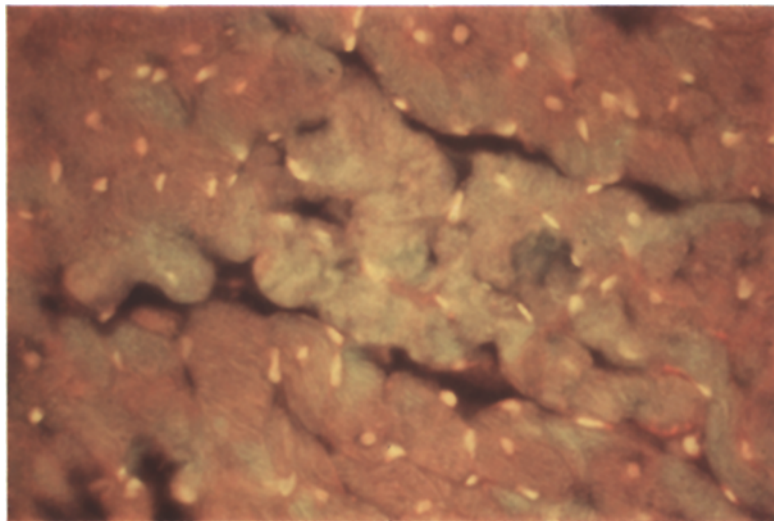


Abb. 3. Umschriebene Muskelfaserveränderung mit Auflockerung des Gewebes nach einstündiger Unterbindung. AO 1:10000,  $p_H$  7,0, Vergr. 500fach

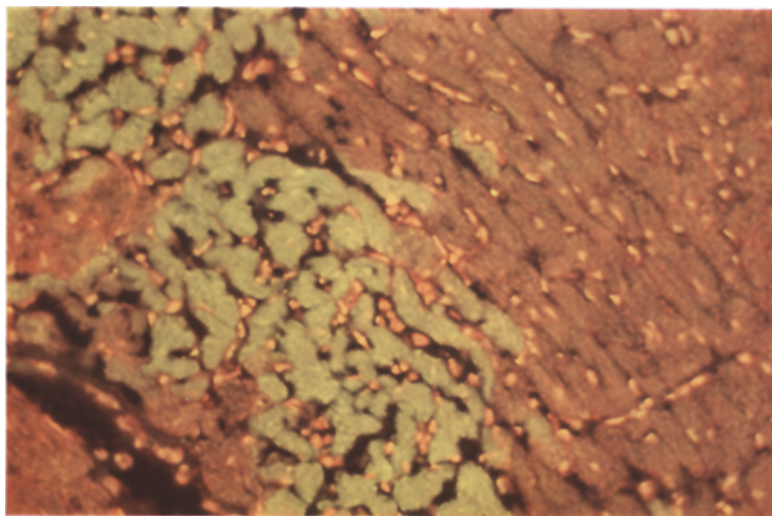


Abb. 4. Infarktgrenze mit Farbumschlag nach Grün und Darstellung der Granula nach 8stündiger Unterbindung. CO 1:10000,  $p_H$  7,0, Vergr. 312fach

auch bei CO  $p_H$  7,0, zeigen die Infarkte eine Verschiebung der Fluoreszenzfarbe nach oliv-grün. (Die Muskelfasern stellen sich im normalen Herzmuskel bei CO  $p_H$  7,0 gelb-bräunlich dar und sind gleichmäßig von gelborange leuchtenden Granula durchsetzt.) Bei AO und CO  $p_H$  4,5 heben sich die geschädigten Muskelpartien von der mattgrün bzw. intensiv grün bis oliv-grün leuchtenden Umgebung

durch eine hellere und mehr hellgrüne Fluoreszenz ab. Entlang den Infarktgrenzen haben zahlreiche Muskelfasern ihre Fibrillenstruktur verloren, ihr Cytoplasma erscheint schollig umgewandelt. Andere Muskelfasern dieser Region besitzen plumpe und in ihrem Verlauf unterbrochene Myofibrillen. Im Infarktzentrum ist jetzt häufig eine deutliche Querstreifung zu erkennen.

Nach *vier Stunden* ist bei CO  $p_H$  7,0 im Infarkt eine geringe Verminderung der Granula zu bemerken. Dies gilt nicht für die subendokardialen Muskelfaserschichten. Die Farbunterschiede zwischen Infarkt und nicht betroffenen Herzmuskelabschnitten sind deutlicher geworden.

Nach *fünf Stunden* liegt bereits eine erhebliche Verfettung an den Grenzonen vor.

Nach *sechs Stunden* heben sich die Infarkte bei AO und CO  $p_H$  7,0 scharf begrenzt durch eine kräftige Grünfluoreszenz ab. Die Granula haben im Infarkt weiter abgenommen. Subendokardial und an den Infarktgrenzen stellen sie sich dagegen besonders deutlich dar. Im Infarktzentrum weisen die Kerne eine wesentlich intensivere und gelbe Fluoreszenz bei AO und CO  $p_H$  4,5 auf. In der Randzone des Infarktes sind die Kerne oft nur noch als Schatten zu erkennen. In der unmittelbar an das Lumen angrenzenden Schicht der subendokardialen Muskelfasern sind, streng auf das Infarktgebiet begrenzt, feinste Fetttröpfchen zu sehen.

Nach *acht Stunden* haben die Farbunterschiede einen Grad erreicht, der sich in den nächsten 12 Std nicht mehr weiter steigert (Abb. 4). In den peripheren Anteilen des Infarktes sind bei AO  $p_H$  7,0 erstmalig orangerot leuchtende Muskelfaserkerne zu beobachten. Während in der Randzone die Verfettung nur langsam auch auf die unmittelbar anliegenden Muskelfasern des Infarktes übergreift, sind im Zentrum, besonders in der Umgebung von Blutgefäßen, Inseln von verfetteten, sonst aber auffällig gut erhaltenen Muskelfasern zu erkennen. Die Wandungen dieser Gefäße enthalten ebenfalls Fetttröpfchen.

Nach *zehn Stunden* hat die Verfettung der dem Endokard unmittelbar anliegenden Muskelfasergruppe auch die tieferen, noch erhaltenen Schichten ergriffen.

Nach *zwanzig Stunden* ist die subendokardiale Zone des Infarktes gleichmäßig feintropfig verfettet, bei allen anderen Färbungen aber unverändert dargestellt, so daß sie sich gegenüber dem Infarkt scharf abhebt. Während die peripheren Infarktanteile weiterhin grün leuchten, hat das Zentrum eine mehr gelbliche bis gelb-bräunliche Farbe angenommen. Bei CO  $p_H$  7,0 sind im Infarkt kaum noch Granula nachzuweisen, ihre Zahl ist deutlich vermindert und die Fluoreszenz geht mehr ins Gelbe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich der Infarkt im fluoreszenzmikroskopischen Bild durch deutliche Farbunterschiede von seiner gesunden Umgebung abhebt. Insbesondere bei CO  $p_H$  7,0 zeichnet er sich durch eine kräftige Grünfluoreszenz der Muskelfasern, die später im Infarktzentrum mehr in eine gelb-grüne Farbe übergeht, aus. Dabei finden sich die stärksten Veränderungen im Infarkttrandgebiet, was dem aus anderen Untersuchungen bekannten besonderen Verhalten dieser Zone entspricht (LETTERER 1959). Typisch ist weiterhin eine deutliche Verminderung der Granula. Bei Astraphosphin stellt sich eine deutliche Verfettung der Infarkttrandzone sowie der subendokardialen Muskelfasern dar, wobei die subendokardiale Zone ebenso wie bei den histochemischen Reak-

tionen auch bei den verwendeten Fluorochromen, bis auf die Verfettung, stets das Bild der normalen Muskulatur zeigt.

Die ersten fluoreszenzmikroskopischen Veränderungen treten nach einer Stunde auf; nach 3 Std ist der Infarkt sicher zu erfassen.

2. *Fixierte Schnitte.* Zum Unterschied zu den unfixierten Schnitten heben sich die Infarkte bei Formolfixierung erst nach 5 Std durch eine unterschiedliche Fluoreszenz ab. Sie ist bei CO  $p_H$  4,0 und AO  $p_H$  5,0 besser ausgebildet als bei

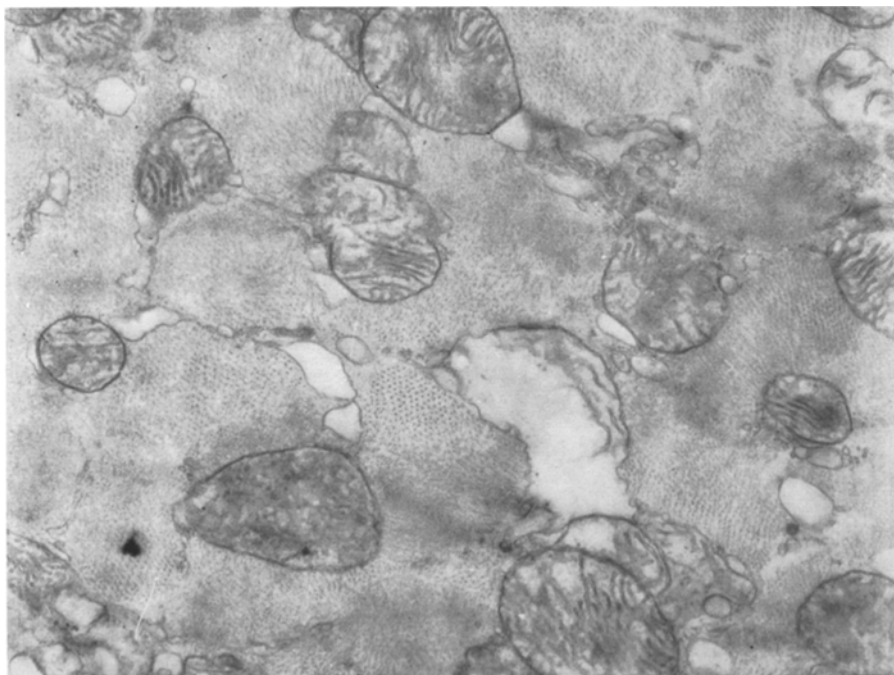


Abb. 5. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktbereich 15 min nach Anlage der Unterbindung. Durch ödematöse Auseinanderdrängung der Myofilamente gut sichtbare Quer- und Längsschnitte. Vacuolisiertes Sarkoplasmareticulum. Neben regelrecht gebildeten Mitochondrien solche mit Zerfall der Cristae (links unten). In Bildmitte vacuolisiertes Mitochondrion mit Ruptur der Außenmembran. Aufnahme-Nr. D 2419. Ges.-Vergr. 13500:1

Verwendung neutraler Farblösungen. Es erfolgt ein Farbumschlag nach dunkelgrün bei CO und nach grasgrün bei AO (das fluoreszenzmikroskopische Bild der normalen Herzmuskulatur nach Formolfixierung siehe bei KORB und HECHT). Bei länger bestehendem Infarkt sind die Befunde deutlicher ausgeprägt. Nach 8 Std beginnt sich das Infarktzentrum schwächer anzufärben.

**III. Elektronenmikroskopische Ergebnisse.** Unsere Untersuchungen beginnen 15 min nach Anlage der Ligatur. Zu diesem Zeitpunkt sind schon deutliche Veränderungen innerhalb der Herzmuskelfasern zu beobachten. Die Myofilamente sind im Längs- und Querschnitt gut erkennbar und durch Einlagerung von Flüssigkeit in die Fasern auseinandergedrängt. Das Sarkoplasmareticulum ist zu großen Vacuolen umgewandelt, die in ihrem Inneren optisch leer erscheinen oder amorphe Massen enthalten. Besonders reichlich sind die vacuolären Bildungen unter dem Sarkolemm zu finden. Während sich noch viele Mitochondrien

mit regelrechten Innenstrukturen aufzeigen lassen, ist an einigen Stellen schon ein Zerfall derselben zu erkennen. Es kommt zu einer partiellen Auflösung, Vacuolisierung und Aufhellung und in einzelnen Fällen auch zu einem Zerreißen der Außenmembran mit einem Austritt des Inhaltes (Abb. 5). Fetttropfen sind nur äußerst selten zu beobachten.

20 min nach Unterbindung der Coronararterie sind die Veränderungen wesentlich ausgeprägter. Unterhalb des Sarkolemm lassen sich weit bis in die Fasern reichende, mit amorphen Niederschlägen gefüllte Vacuolen finden (Abb. 6). Sie

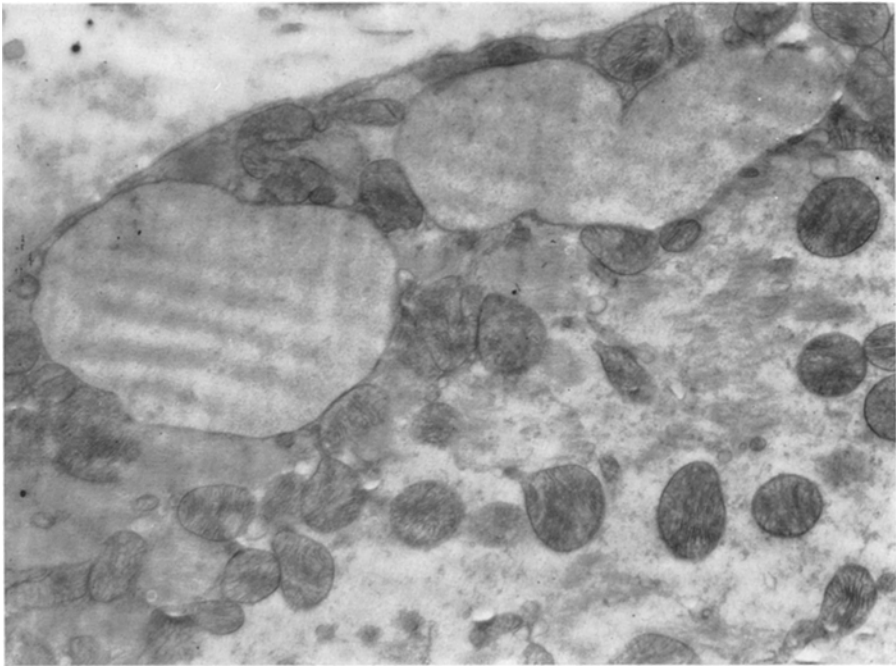


Abb. 6. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktgebiet 20 min nach Anlage der Unterbindung. Unter dem Sarkolemm große Vacuolen. Auseinanderdrängung der Myofilamente. Keine wesentlichen Mitochondrienveränderungen. Aufnahme-Nr. D 2530. Ges.-Vergr. 8000:1

sind von einer doppelt konturierten Membran umgeben. Es handelt sich wahrscheinlich um Einstülpungen des Sarkolemm. Zum Teil sind sie aber auch vom Sarkoplasmareticulum abzuleiten. Vereinzelt sind Mitochondrien in ihnen eingeschlossen. Infolge des Aufreißen des Sarkolemm sind öfters auch Mitochondrien extracellulär zu beobachten. Die ödematöse Auseinanderdrängung der Myofilamente nimmt starke Ausmaße an. In mehreren Fasern erfolgt ein granulärer Zerfall der Myofilamente (Abb. 7). Dazwischen bleiben immer einzelne Gruppen bestehen. Auch die Mitochondrien zeigen eine beginnende Zerstörung der Außenmembranen und eine Homogenisierung der Matrix mit einem Zerfall der Cristae. Die Z-Streifen sind in vielen Bereichen nicht mehr zu erkennen.

Auch in den übrigen Fasern sind Mitochondrienveränderungen in Form von Aufhellungen und Vacuolisierungen zu finden. Dazu ist oft eine konzentrische Anordnung der Innenmembranen oder ein zentrales Ödem mit Verdrängung der Cristae an die Pole zu erkennen. Oft zeigt sich außerdem ein perinucleäres Ödem.



An der Innenseite der Kernwand wird osmiophiles Material angelagert, während im Zentrum Verschiebungen und Verklumpungen der osmiophilen Granula auftreten. Vereinzelt sind jetzt in Mitochondriennähe kleine Fetttropfchen zu sehen.

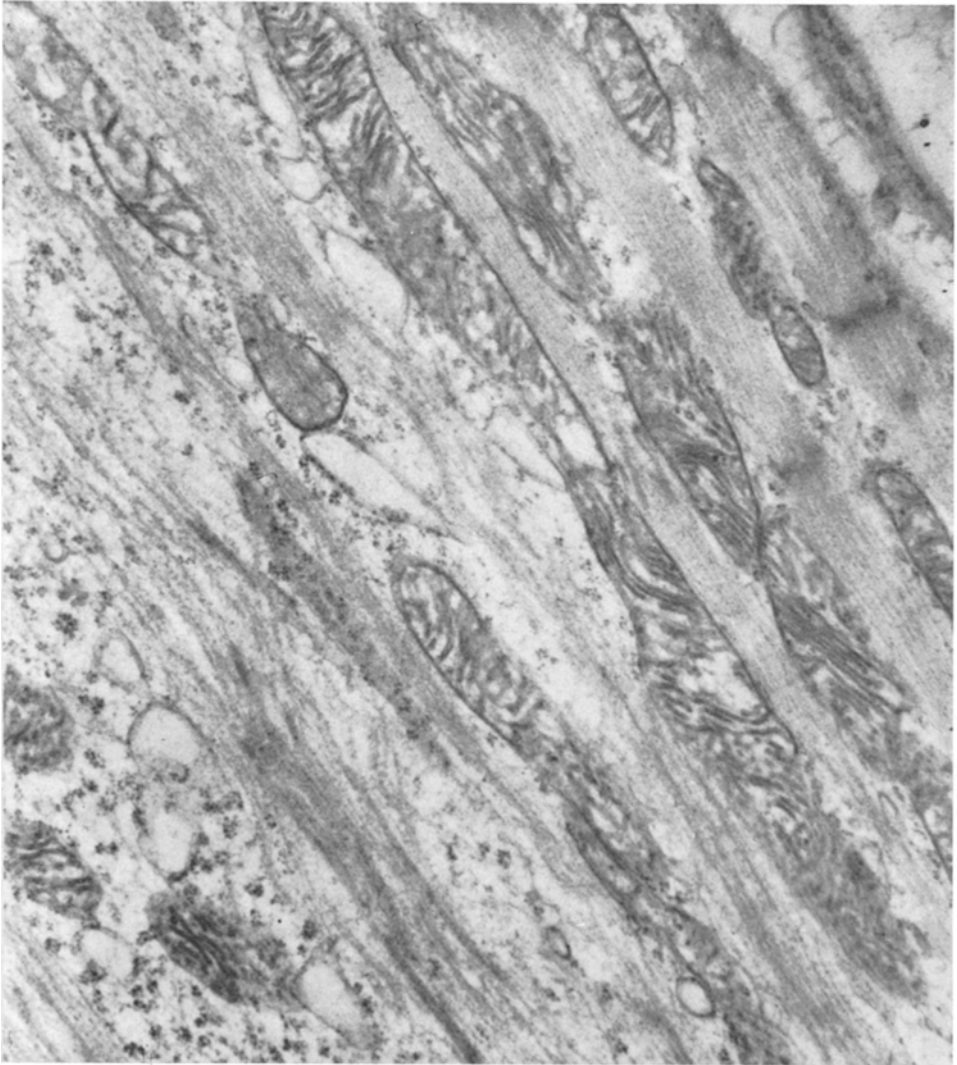


Abb. 7. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktgebiet 20 min nach Anlage der Unterbindung. Im rechten Bildteil noch erhaltene Myofilamente mit Z-Streifen. Im linken Teil Verfilzung der Filamente und granulärer Zerfall. Keine Z-Streifen mehr erkennbar. Lang ausgezogene, zum Teil vacuolisierte Mitochondrien. Vacuolisiertes Sarkoplasmareticulum. Aufnahme-Nr. D1558.  
Ges.-Vergr. 25 600:1

*Zwei Stunden* nach der Unterbindung sind noch keine wesentlichen Verstärkungen der Erscheinungen gegenüber den Bildern nach 20 min zu erkennen. Vermehrt sind kleine Fetttropfen in solchen Fasern zu beobachten, die nicht weitgehend irreversibel durch einen Zerfall der Myofilamente geschädigt sind. Außerdem liegen auch in den Fasern nach Zerreißen des Sarkolemmes Erythrocyten vor.

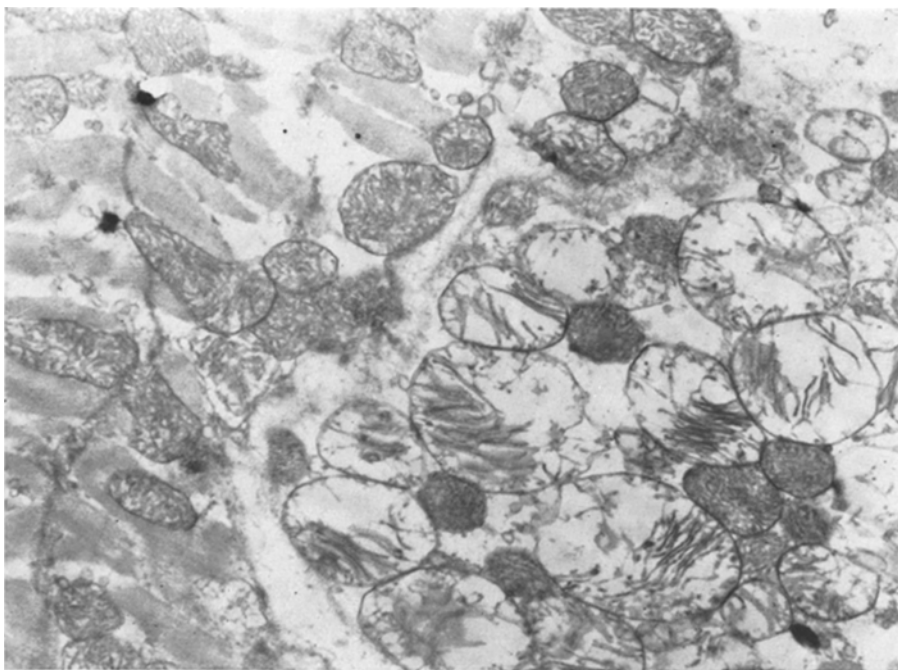


Abb. 8. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktgebiet 4 Std nach Anlage der Unterbindung. Mitochondriengruppe mit vergrößerten und vacuolisierten Mitochondrien sowie einzelnen geschrumpften mit homogener Matrix. In der anliegenden Muskelfaser nur wenig veränderte Mitochondrien. Aufnahme-Nr. D 2607. Ges.-Vergr. 8000:1

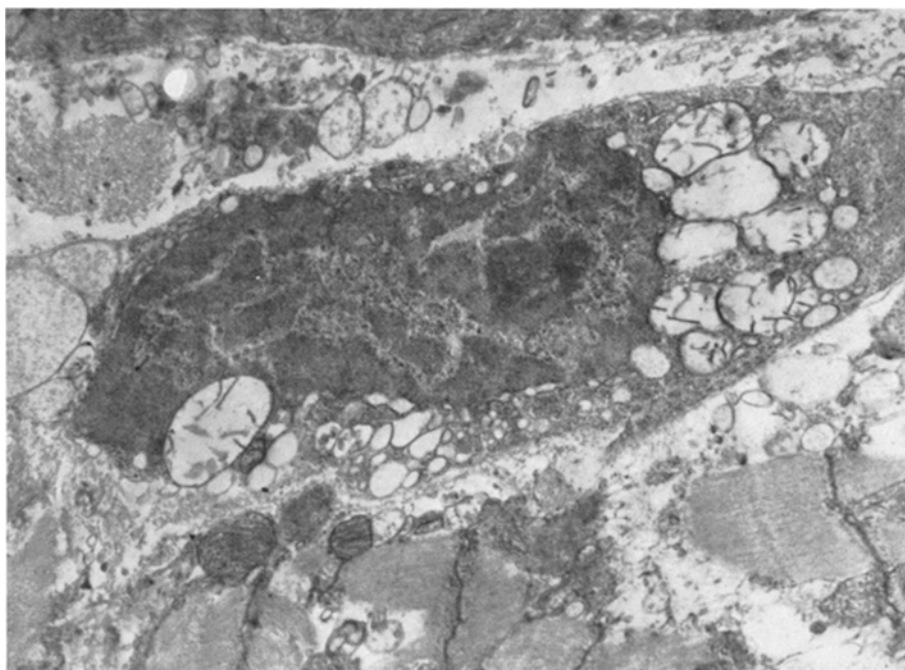


Abb. 9. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktgebiet 6 Std nach Anlage der Unterbindung. Schollenförmiger Zerfall eines Kernes, noch von Teilstücken der Kernmembran umgeben. In der Umgebung vacuolisierte leere Mitochondrien. Aufnahme-Nr. D 2101. Ges.-Vergr. 8000:1

*Vier Stunden* nach Setzen des Infarktes nimmt das Faserödem höchste Grade an. Die Mitochondrien zeigen entweder eine fast vollständige Herauslösung der Matrixsubstanzen und eine erhebliche Anschwellung oder einen Zusammenfall mit Zunahme der Osmiophilie mit homogener Innensubstanz (Abb. 8). In den angrenzenden Fasern können wesentlich weniger veränderte Mitochondrien vorliegen. In der Umgebung der Mitochondrien sind große Fetttropfen zu finden. Einzelne Kerne zerfallen. Gleichzeitig treten auch in den Capillarendothelien Vacuolisierungen auf.

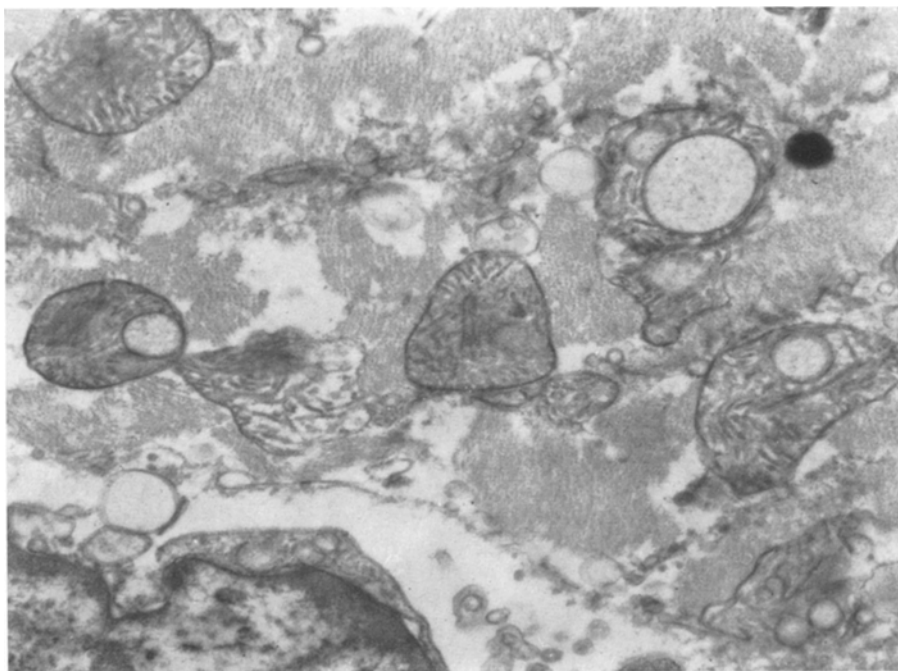


Abb. 10. Herzmuskulatur der Ratte aus dem Infarktgebiet 6 Std nach Anlage der Unterbindung. Ausbildung begrenzter Vacuolen in verschiedenen Mitochondrien. Aufnahme-Nr. D 2085. Ges.-Vergr. 13 500:1

Nach *sechs Stunden* Infaktdauer kommt es zu vacuolären Abhebungen der äußeren Lamelle der Kernmembran und zu erheblichen Pigmentablagerungen in Kernnähe. Die degenerierten Kerne bestehen nur noch aus schollenförmigen, osmiophilen Massen, die von Teilstücken der Kernmembran umgeben sind. Die in der Nähe liegenden Mitochondrien sind zu leeren Vacuolen umgewandelt (Abb. 9). Besonders auffällig ist das Auftreten echter, von einer Doppelmembran umgebener Vacuolen innerhalb der Mitochondrien (Abb. 10). Es ist nicht sicher zu entscheiden, ob es sich dabei um Bildungen aus einzelnen Cristae oder um Einstülpungen des Sarkoplasmareticulums handelt. Während in vielen Fasern die Myofilamente nicht mehr identifizierbar sind und miteinander verklumpen, lassen sich dazwischen immer wieder Fasern finden, die außer einem Ödem keine weiteren Befunde zeigen.

### Diskussion

Die elektronenmikroskopische Methode erweist sich von den angewandten als die diffizilste. Sie ist in der Lage, schon nach wenigen Minuten die ersten

Veränderungen aufzuzeigen. Nach TAKAKI u. Mitarb. (1956) werden Schwellungszustände von Fasern, Mitochondrien und Kernen schon nach 5 min erkennbar, während die Degeneration der Myofilamente und eine Verdichtung derselben erst nach 1 Std zu beobachten sind. Ein Auftreten von Vacuolen im Sarkoplasmareticulum ist auch von CAULFIELD und KLIONSKY (1959) schon nach 5 min gefunden worden; Mitochondrienvergrößerungen werden erst nach 20–35 min sichtbar. BRYANT u. a. (1958) berichten über erste Befunde am Rattenherzen nach einer Stunde.

Wir haben die ersten Erscheinungen nach 15 min erkannt und sichere Befunde nach 20 min erheben können. Übersichtsmäßig sind der Glykogenverlust und die Vacuolisierung des Sarkoplasmareticulum als früheste Veränderungen anzusehen. Sie sind als Ausdruck des akuten Sauerstoffmangels aufzufassen (BÜCHNER u. Mitarb. 1959). Es kommt weiterhin als Folge der Membranstörungen zu Flüssigkeitsansammlungen in die Fasern und somit zu einem Faserödem mit einer Auseinanderdrängung der Myofilamente. Außerdem sind Anschwellungen und Vacuolisierungen der Mitochondrien zu bemerken, was dem Bild der trüben Schwellung entsprechen würde. Als Zeichen einer irreversiblen Schädigung ist der granuläre Zerfall der Myofilamente und ihre später folgende vollständige Zerstörung mit Verklumpung anzusehen.

Im Gegensatz dazu gelingt es mit den gewöhnlichen Färbemethoden wie der HE- und HS-Färbung bei der Ratte erst nach etwa 5–6 Std, einen Infarkt sicher zur Darstellung zu bringen. Erst nach dieser Zeit kommt es zu den bekannten Veränderungen an Kernen und Muskelfasern. Allerdings zeichnet sich der Infarkt bei der HE-Färbung schon nach 2 Std durch eine deutliche Dissoziaton der Muskelfasern ab, was auch im fluoreszenzmikroskopischen Bild sicher zu beobachten ist. Auf Grund der oben geschilderten elektronenmikroskopischen Befunde ist mit Sicherheit anzunehmen, daß es sich hierbei um das Auftreten eines inter- und intracellulären Ödems handelt. Bei unseren Versuchen ist zwar nicht sicher zu entscheiden, ob es sich vielleicht um die Folgen einer venösen Stauung handelt, da bei der Kleinheit des Objektes eine isolierte Unterbindung des Herzkranzgefäßes nicht möglich ist. Aber auch HERRMANN und DECHERD (1934/35), LOWRY u. Mitarb. (1942) sowie JENNINGS und WARTMAN (1957) haben beim experimentellen Herzinfarkt des Hundes dieses Ödem beschrieben. Wahrscheinlich ist es auf die erhöhte NaCl-Konzentration im Infarkt zurückzuführen (JENNINGS und WARTMAN 1957).

Histochemische Untersuchungen beim experimentellen Herzinfarkt sind bisher nur in verhältnismäßig geringer Zahl veröffentlicht worden. Lange bekannt ist eine deutliche, rasch einsetzende Abnahme des Glykogengehaltes (GRAYZEL u. Mitarb. 1933/34, HIMWICH u. Mitarb. 1934, HERRMANN und DECHERD 1934/35, MERRICK 1954, MERRICK und MEYER 1954, YOKOYAMA u. Mitarb. 1955, NEORAL u. Mitarb. 1959, WITTELS u. Mitarb. 1959). Der Glykogenverlust soll bereits nach 2 (WITTELS u. Mitarb. 1959) bzw. nach 5 min (KLIONSKY 1960) einsetzen. Das gilt sowohl für die labile, als auch die stabile Form des Glykogens (MERRICK 1957). WITTELS und REINER (1960) geben an, daß der Abnahme eine Zunahme in der Randzone des Infarktes gegenübersteht. Für die Praxis sind diese Befunde allerdings nicht zu verwerten, da bereits postmortal ein rascher Glykogenschwund einsetzt, so daß schon nach 4–5 Std Glykogennachweise negativ verlaufen (YOKOYAMA 1955, KENT 1957).

Bei der Prüfung der *Succinodehydrogenase* konnten wir nach 3 Std eine Aktivitätsminderung feststellen. KAUFMANN u. Mitarb. (1959) geben für die Ratte

4 Std, CAIN und ASSMANN (1958) für den Hund 3 Std, JENNINGS u. Mitarb. (1957) 4—5 Std und NEORAL u. Mitarb. (1959) ebenfalls 5 Std an. Nach WACHSTEIN und MEISEL (1954, 1955) soll beim Menschen schon nach 2 Std eine Aktivitätsverminderung im Infarkt festzustellen sein. Unwahrscheinlich erscheint dagegen eine Mitteilung von KENT und DISEKER (1955), die erst nach 15 Std eine erkennbare Aktivitätsminderung feststellten. Die verstärkte SDH-Aktivität in der Infarkttrandzone führen wir auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität in diesem Gebiet zurück.

Für das Verhalten der alkalischen *Phosphatase* fanden wir nur bei KENT und DISEKER (1955) entsprechende Hinweise. Wie bei der SDH konnten wir auch bei der alkalischen Phosphatase nach 3 Std eine beginnende Aktivitätsminderung feststellen; sie verlief dann allerdings wesentlich schneller. Der Beginn deckt sich etwa mit den Befunden, wie sie beim experimentellen Niereninfarkt erhoben wurden (GÖBEL und PUCHTLER 1954, RUDOLPH und SCHOLL 1958, EDER und WAGENMANN 1959). Auch hier sind die Angaben von KENT und DISEKER (1955) wenig glaubhaft, da auf Grund ihrer Untersuchungen die alkalische Phosphatase beim Herzinfarkt während der ersten 48 Std keine Veränderungen zeigen soll.

Überrascht hat uns das Verhalten der *Cytochromoxydase*. In unseren Untersuchungen kam es erst nach 15—20 Std zu einer beginnenden Aktivitätsverminderung dieses Enzyms, während vorher ein deutlich stärkerer Verlauf der Reaktion als im normalen Herzmuskel zu verzeichnen war. KAUFMANN u. Mitarb. (1959) stellten eine Aktivitätsverminderung nach 12 Std fest, und einen völligen Fermentverlust nach 72 Std. BURSTONE und MILLER (1961) stellten entsprechende Untersuchungen beim menschlichen Herzinfarkt an. Zwar handelte es sich durchweg um Infarkte, die älter sind als 1 Tag, doch zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Während im Infarktzentrum ein fast völliger Verlust der Cytochromoxydase nachzuweisen war, stellten die Autoren in den Randpartien besonders im Bereich der perinucleären Sarkosomen eine starke Bildung von Granula fest. Es wird von BURSTONE und MILLER (1961) allerdings offen gelassen, ob es sich hierbei um eine Aktivitätssteigerung handelt, oder eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Infarktgeschehen vorliegt.

Der Beginn unserer Enzymveränderungen fällt, was die SDH und die alkalische Phosphatase betrifft, etwa mit dem Höhepunkt der elektronenmikroskopisch festgestellten Mitochondrienveränderungen zusammen.

*Fluoreszenzmikroskopisch* konnten morphologische Veränderungen, wie Vergrößerung und Auflösung der Fibrillenstruktur sowie eine schollige Umwandlung des Cytoplasmas, in den Randgebieten schon nach 3 Std nachgewiesen werden. Daneben fällt auf, daß die im normalen Herzmuskel sich nicht darstellende Querstreifung beim Infarkt deutlich hervortritt. Die hellere Fluoreszenz, die nach Färbung mit Astraphosphin das Infarktgebiet schon nach 2 Std von der Umgebung unterscheiden läßt, dürfte mit einer Verdichtung der Muskelfasern zusammenhängen. Außerdem können wir, wie aus unseren Befunden eindeutig hervorgeht, die Angaben von BOERNER (1952), LENNERT (1956) und DE LERMA (1958) bestätigen, nach denen sich das Phosphin 3 R (identisch mit dem von uns verwendeten Astraphosphin) hervorragend zur Darstellung feinsten Verfettungen eignet und lichtmikroskopischen Methoden überlegen ist.

Einer unserer wichtigsten Befunde ist die *Farbverschiebung* nach Grün im Infarktbereich bei Verwendung neutraler Farblösungen. Damit unterscheiden sich unsere Ergebnisse wesentlich von den beim experimentellen Niereninfarkt erhobenen Befunden, die in einem, wenn auch vorübergehenden, Farbumschlag nach Rot bestanden (MOLZ 1956). Die Erklärung für dieses abweichende Verhalten ist wohl unter anderem darin zu suchen, daß die Herzmuskelfasern kaum cytoplasmatische Ribonucleoproteide enthalten. Beim Herzen stehen daher in erster Linie nur amphotere Eiweißstoffe für eine Anlagerung der Farbstoffteilchen zur Verfügung. Wie bekannt ist, kommt es im Infarkt zu einer Ansäuerung des Gewebes. Das Ausmaß und die Dauer dieser  $p_H$ -Verschiebung ist bei den einzelnen Organen unterschiedlich. Für amphotere Eiweißkörper hat das zur Folge, daß negative Valenzen frei werden. Diese sind zwar für eine Färbung mit sauren Farbstoffen bedeutsam, bei der AO-Färbung dagegen führt das zumindest indirekt zu einer verminderten Farbstoffaufnahme, die ihren Ausdruck in einer Änderung der Fluoreszenz nach Grün findet. Dieser Zustand scheint relativ lange erhalten zu bleiben, da für das Auge erst nach 20 Std, im Infarktzentrum beginnend, ein Farbumschlag nach Gelb bis Gelb-braun erfolgt. Vielleicht verdienen in diesem Zusammenhang Autolyseversuche am Herzen Beachtung, die zeigen, daß der Herzmuskel gegenüber solchen Veränderungen verhältnismäßig widerstandsfähig ist (MANSTEIN 1935, PETER 1936, SCHEIBE und EDER 1956, SCHMIDT u. Mitarb. 1959). Die Kernveränderungen sehen wir mit SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (1959) als Ausdruck einer Depolymerisation der DNS an.

Zum Verhalten der mit Coriphosphin bei  $p_H$  7,0 darstellbaren Granula ist an dieser Stelle wenig auszusagen, da wir ihre Natur noch nicht endgültig klären konnten. Doch fanden wir berechtigte Hinweise dafür, daß es sich um Mitochondrien handeln könnte (KORB und HECHT).

Auf das besondere Verhalten der *subendokardialen Muskelfaserschichten* wollen wir in diesem Zusammenhang nicht näher eingehen. Wir möchten nur unterstreichen, daß die von LINZBACH (1947), HORT (1955) sowie HECHT (1958) betonte Sonderstellung dieser Schichten auch bei unserer Untersuchung ihren Ausdruck gefunden hat. Bis auf eine Verfettung dieser Abschnitte konnten wir an ihnen keinerlei Anzeichen einer Schädigung feststellen. Dies festigt die Annahme, daß unter krankhaften Bedingungen ihre Blutversorgung vom Herzlumen her gewährleistet ist. Ein ähnliches Verhalten zeigten teilweise auch die subepikardialen Schichten, was für eine Versorgung von epikardialen Gefäßen spricht. Ebenso war interessant festzustellen, daß die Muskelfasern um erhaltene größere Gefäße bis auf eine Verfettung keine Veränderungen erkennen ließen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit angewandten Methoden, so zeigt sich zwar die eindeutige Überlegenheit der Elektronenmikroskopie, was die am frühesten erkennbaren Veränderungen betrifft. Gleichzeitig zeigen sie aber auch eindrucksvoll, welche Möglichkeiten die Fluoreszenzmikroskopie bietet. Mit ihrer Hilfe können beim experimentellen Herzinfarkt Frühveränderungen zu einem Zeitpunkt sicher erfaßt werden, zu dem die ersten feststellbaren Abweichungen im Fermentsystem auftreten und im Lichtmikroskop noch keine charakteristischen Veränderungen beobachtet werden können. Mit Hilfe der Fluorochromierung ist es weiterhin nicht nur möglich, morphologische Besonderheiten zu erfassen, sondern auch physikalisch-chemische Phänomene. Dabei muß berücksichtigt

werden, daß besonders letztere einer eindeutigen Klärung noch nicht zugeführt werden konnten. Ziel weiterer Untersuchungen wird es sein, den Einfluß post-mortaler Autolyse auf unsere Befunde zu prüfen. Diese Ergebnisse werden darüber entscheiden, ob sich unsere Hoffnung, einen neuen und erfolgreichen Weg zur Erkennung des Frühinfarktes zu finden, erfüllen wird.

### Zusammenfassung

In vergleichenden histochemischen, fluoreszenzmikroskopischen und elektronenoptischen Untersuchungen am experimentellen Herzinfarkt der Ratte wurden folgende Befunde erhoben: Entsprechend den Angaben der Literatur waren *elektronenmikroskopisch* die frühesten Veränderungen schon nach 15 min zu erfassen (Faserödem, vacuolige Umwandlung des Sarkoplasmareticulums und beginnender Zerfall der Struktur einzelner Mitochondrien). *Histochemisch* kommt es in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur zu einer von der Zeitdauer des Infarktes abhängigen Aktivitätsminderung der Succinodehydrogenase und alkalischen Phosphatase, dagegen zeigt die Cytochromoxydase eine Zunahme der Aktivität. Bei *Fluorochromierung* mit Acridinorange und Coriphosphin zeichnet sich der Infarkt durch einen schon nach 3 Std sicher erfaßbaren Farbumschlag aus. Außerdem finden sich Veränderungen der Kernfluoreszenz. Beim experimentellen Herzinfarkt gelingt es also, auch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie morphologische Veränderungen früher als mit lichtmikroskopischen Methoden zu erfassen. Das besondere Verhalten der subendokardialen Muskelschichten ergibt sich daraus, daß dieses Gebiet neben der capillären Gefäßversorgung zusätzlich durch Diffusion vom Herzlumen her ernährt wird.

### Summary

Comparative histochemical, fluorescence microscopic, and electron microscopic studies of experimental infarcts of the hearts of rats revealed the following: In agreement with statements in the literature, the earliest changes were detectable electron microscopically after 15 minutes (edema of the fibers, vacuolar change in the reticulum of the sarcoplasm, and a beginning degeneration in the structure of individual mitochondria). Histochemically, in agreement with reports in the literature, the activity of the succinic dehydrogenase and alkaline phosphatase decreased, depending on the duration of the infarct. In contrast, the activity of the cytochrome oxidase increased. With fluorochromation with acridine orange and coriphosphine the infarct was characterized by a color change detectable after three hours. In addition, changes in the fluorescence of the nuclei were evident. With experimental cardiac infarcts it was possible, therefore, to detect morphologic changes with the fluorescent microscope earlier than with the light microscope. It may be assumed from the special behavior of the subendocardial muscle, that the tissues here receive their nourishment not only by way of the capillaries but also by diffusion from the cardiac chamber.

### Literatur

- BING, R. J., A. CASTELLANOS, E. GRADEL, C. LUPTON and A. SIEGEL: Experimental myocardial infarction: Circulatory, biochemical and pathologic changes. *Amer. J. med. Sci.* **232**, 533—554 (1956).

- BLUMGART, H. L., D. R. GILLIGAN and M. J. SCHLESINGER: Experimental studies on the effect of temporary occlusion of coronary arteries. *Amer. Heart J.* **22**, 374—389 (1941).
- BOERNER, D.: Fluorezcenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Protoplasma* **41**, 168—177 (1952).
- 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 Aerobiose. *Ärztl. Forsch.* **13**, I 307—314 (1959).
- E. MÖLBERT u. L. THALE: Das submikroskopische Bild der Herzmuskelzelle nach toxischer Hemmung der Aerobiose. *Beitr. path. Anat.* **121**, 145—169 (1959).
- BURSTONE, M. S., and F. N. MILLER: Histochemical demonstration of changes in cytochrome oxidase activity in human myocardial infarctions. *Amer. J. clin. Path.* **35**, 118—121 (1961).
- CAIN, H., u. W. ASSMANN: Fermentgeschehen bei koronariellen Durchblutungsstörungen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **43**, 196—198 (1958).
- — Bedeutung und Problematik enzymatischer Gewebs- und Serumbefunde beim frischen Myokardinfarkt. *Klin. Wschr.* **38**, 433—439 (1960).
- CAULFIELD, J., and B. KLIONSKY: Myocardial ischemia and early infarction: An electron microscopic study. *Amer. J. Path.* **35**, 489—523 (1959).
- DOTZAUER, G.: Das akute-Phase-Protein und der akute Herztod. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 461—466 (1959).
- EDER, M., u. U. WAGENMANN: Die Bedeutung und Problematik histochemischer Befunde am Niereninfarkt. *Beitr. path. Anat.* **121**, 39—49 (1959).
- GOEBEL, A., u. H. PUCHTLER: Über das Verhalten der histochemisch nachweisbaren alkalischen Phosphatase und 5-Nucleotidase im Sauerstoffmangel und im Niereninfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 119—134 (1954).
- GRAYZEL, D. M., R. TENNANT, S. W. STRINGER and F. A. SUTTERLAND: Observations on coronary occlusion. III. Chemical and histologic changes. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **31**, 837—838 (1933/34).
- HECHT, A.: Zur capillären Gefäßversorgung der subendokardialen Muskelschichten im menschlichen Herzen. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 26—35 (1958).
- HEIMBURGER, R. F.: Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery in the rat. *Arch. Surg. (Chicago)* **52**, 677—689 (1946).
- HERRMANN, G., and G. DECHERD: Creatine and glycogen content of normal and infarcted heart muscle of the dog. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **32**, 1304—1305 (1934/35).
- HICKS, J. D., and E. MATTHAEI: Fluorescence in histology. *J. Path. Bact.* **70**, 1—12 (1955).
- HIMWICH, H. E., W. GOLDFABER and L. H. NAHUM: Changes of the carbohydrate metabolism of the heart following coronary occlusion. *Amer. J. Physiol.* **109**, 403—408 (1934).
- HORT, W.: Quantitative Untersuchungen über die Capillarisation des Herzmuskels im Erwachsenen- und Greisenalter, bei Hypertrophie und Hyperplasie. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 560—576 (1955).
- JENNINGS, R. B., J. KALTENBACH and G. W. SMETTERS: Enzymatic changes in acute myocardial ischemic injury. *Arch. Path. (Chicago)* **64**, 10—16 (1957).
- , and W. B. WARTMAN: (1) Production of an area of homogeneous myocardial infarction in the dog. *Arch. Path. (Chicago)* **63**, 580—585 (1957).
- — (2) Reactions of myocardium to obstruction of the coronary arteries. *Med. Clin. N. Amer.* **41**, 3—15 (1957).
- JESTÄDT, R., u. W. SANDRITTER: Erfahrungen mit TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid-) Reaktion bei der pathologisch-anatomischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Z. Kreisl.-Forsch.* **48**, 802—809 (1959).
- JOHNS, T. N., and B. J. OLSON: Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* **140**, 675—682 (1954).
- KAUFMANN, N., T. L. GAVAN and R. W. HILL: Experimental myocardial infarction in the rat. *Arch. Path. (Chicago)* **67**, 482—488 (1959).
- KENT, S. P.: Effect of postmortem autolysis on certain histochemical reactions. *Arch. Path. (Chicago)* **64**, 17—22 (1957).
- , and M. DISEKER: Early myocardial ischemia. Study of histochemical changes in dog. *Lab. Invest.* **4**, 398—405 (1955).



- KLIONSKY, B.: Myocardial ischemia and early infarction. A histochemical study. *Amer. J. Path.* **36**, 575—585 (1960).
- KNOLLE, A., u. H. TIMMEL: Fluoreszenzoptische Untersuchungen des frisch hypoxisch geschädigten Herzmuskels. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 371—373 (1958).
- KOLIN, A., L. NEORAL u. R. KODOUSEK: Die enzymatische Makroreaktion zur pathologisch-anatomischen Diagnostik der Frühstadien des Myokardinfarktes unter Anwendung der Dehydrogenasereaktion. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 233—238 (1959).
- KORB, G., u. A. HECHT: Fluoreszenzmikroskopische Befunde am normalen Herzmuskel. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* (im Druck).
- KRIEG, A.: Fluoreszenzanalyse und Fluorochromie in Biologie und Medizin. *Klin. Wschr.* **31**, 350—356 (1953).
- LENNERT, K.: Die Histochemie der Fette und Lipide. *Z. wiss. Mikr.* **62**, 368—393 (1956).
- LERMA, B. DE: Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histologie. In GRAUMANN und NEUMANN, *Handbuch der Histochemie*, Bd. I, S. 78—159. Stuttgart: Fischer 1958.
- LETTERER, E.: *Allgemeine Pathologie*, S. 158. Leipzig: VEB Georg Thieme 1959.
- LINZBACH, A. J.: Das ökonomische Prinzip in der Sauerstoffversorgung der Nieren, des Herzens und der Stützgewebe. *Z. ges. inn. Med.* **2**, 144—151 (1947).
- LOWRY, O. H., D. R. GILLIGAN and A. B. HASTINGS: Histochemical changes in the myocardium of dogs following experimental temporary coronary arterial occlusion. *Amer. Heart J.* **136**, 474—485 (1942).
- MANSTEIN, B.: Über die Einwirkung von sauren und alkalischen Lösungen auf Organschnitte und ihre Beziehungen zur Kariolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **294**, 120—130 (1935).
- MERRICK, A. W.: Cardiac glycogen following fulminating anoxia. *Amer. J. Physiol.* **176**, 83—85 (1954).
- Experimental coronary occlusion in dogs and its effect upon the cardiac glycogen fractions. *Circulat. Res.* **5**, 435—438 (1957).
- , and D. K. MEYER: Glycogen fractions of cardiac muscle in the normal and anoxic heart. *Amer. J. Physiol.* **17**, 441—443 (1954).
- MÖLBERT, E.: Die Herzmuskelzelle nach akuter Oxydationshemmung im elektronenmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **118**, 421—435 (1957).
- , u. S. IJIMA: Beitrag zur experimentellen Hypertrophie und Insuffizienz des Herzmuskels im elektronenmikroskopischen Bild. *Naturwissenschaften* **45**, 322—323 (1958).
- — Beitrag zur experimentellen Hypertrophie und Insuffizienz des Herzmuskels im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. dtsh. Ges. Path.* 1958, 349—350 (1959).
- MOLZ, G.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen experimenteller hypoxämischer Nierenschädigungen. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 111—120 (1956).
- NEORAL, L., A. KOLIN, R. KODOUSEK u. J. KVASNICKA: Beitrag zur Kenntnis der Frühstadien der experimentellen Myokardischämie. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 239—244 (1959).
- PETER, H.: Zur Frage der anoxämischen Nekrosen des Herzmuskels. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **29**, 245—250 (1936).
- RUDOLPH, G., u. E. SCHOLL: Histochemische Untersuchungen zum Fermenthaushalt des experimentellen Niereninfarktes. (Zugleich ein Beitrag zur Morphologie und zum Wasserhaushalt des Niereninfarktes.) *Beitr. path. Anat.* **119**, 13—44 (1958).
- RYTER, A., and E. KELLENBERGER: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. *J. ultrastruct. Res.* **2**, 200—214 (1958).
- SANDRITTER, W., u. R. JESTÄDT: Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Reduktionsindicator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **41**, 165—170 (1957).
- SAPHIR, O.: *Spezielle Pathologie für die klinische und pathologische Praxis*. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- SCHIEBE, G., u. M. EDER: Lichtelektrische Emissionsmessungen acridinorangefluorochromierter Gewebsschnitte. *Acta histochem. (Jena)* **3**, 6—18 (1956/57).
- SCHLIEF, H., u. P. KAMM: Die Spezifität der Serumveränderungen nach Herzinfarkt und Herzoperationen. *Z. Kreisl.-Forsch.* **47**, 821—830 (1958).
- SCHMIDT, O., D. LORKE u. B. FORSTER: Studie über postmortale Abbauvorgänge. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **49**, 206—212 (1959).

- SCHÜMMELFEDER, N.: Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasma mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 119—154 (1950).
- R. E. KROGH u. K. J. EBSCHNER: Färbungsanalysen zur Acridinorangefluorochromierung. Vergleichende histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Kleinhirn der Maus mit Acridinorange und Gallocyanin-Chromalaunfärbungen. *Z. Zellforsch., Abt. Histochem.* **1**, 1—28 (1958).
- SIEGEL, A., and R. J. BING: Plasma enzyme activity in myocardial infarction in dog and man. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **91**, 604—607 (1956).
- SOLBACH, A.: Über die frühesten morphologischen Veränderungen am Herzmuskel infolge von akuter Coronarinsuffizienz; Untersuchungen am Kaninchenherzen. *Frankfurt. Z. Path.* **55**, 159—167 (1941).
- TAKAKI, F., T. SUZUKI, H. YASUDA, H. YAMAGUCHI and Y. ONODERA: Electronmicroscopic observations on experimentally produced coronary infarction of dog hearts. *Acta path. jap.* **6**, 397 (1956).
- WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Inactivation of histochemically demonstrable succinic dehydrogenase activity in myocardial infarction. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 473—474 (1954).
- — Succinic dehydrogenase activity in myocardial infarction and in induced myocardial necrosis. *Amer. J. Path.* **81**, 353—365 (1955).
- WARTMAN, W. B., R. B. JENNINGS, H. O. YOKOYAMA and G. F. CLABAUGH: Fatty change of the myocardium in early experimental infarction. *Arch. Path. (Chicago)* **62**, 318—323 (1956).
- WITTELS, B. J., and L. REINER: Histochemical observations on glycogen in the human myocardium. *Amer. J. Path.* **36**, 55—70 (1960).
- — and H. A. FRANK: Influence of anoxia and muscular contraction upon myocardial glycogen in the rat. *Arch. Path. (Chicago)* **68**, 501—507 (1959).
- YOKOYAMA, H. O., R. B. JENNINGS, G. F. CLABAUGH and W. B. WARTMAN: Histochemical studies of early experimental myocardial infarction. *Arch. Path. (Chicago)* **59**, 347—354 (1955).

Dr. ARNO HECHT, Dr. GERHARD KORB und Doz. Dr. med. habil. HEINZ DAVID  
 Pathologisches Institut der Humboldt-Universität Berlin  
 Berlin N. 4, Schumannstr. 20/21