

Aus dem Pathologischen Institut am Städtischen Humboldt-Krankenhaus, Berlin-Reinickendorf (Dirig. Arzt: Dr. med. G. KNORR)

Vergleichende licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen frischer Herzmuskelschäden beim Menschen

Von

G. KORB und G. KNORR

(Eingegangen am 23. Dezember 1961)

Nach ausgedehnten fluoreszenzmikroskopischen Voruntersuchungen am normalen Herzmuskel (KORB und HECHT, KORB, BUSCHMANN und BAUSDORF, KORB und DAVID) über Frühveränderungen beim experimentellen Herzinfarkt (HECHT, KORB und DAVID), über die Auswirkung der Autolyse auf die dabei erzielten Befunde (KORB und HECHT) und Beobachtungen am Herzmuskel nach einer akuten, tödlichen Leuchtgasvergiftung (KORB, KORB und DAVID) soll in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, welche Möglichkeiten die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie bei der Beurteilung menschlicher Herzmuskelveränderungen im Routinebetrieb eines Pathologischen Institutes bietet.

Wie wir zeigen konnten, heben sich im unfixierten Schnitt nach einer Färbung mit Acridinorange geschädigte Herzmuskelfasern in einem sehr frühen Stadium der Nekrobiose durch einen Umschlag der Sekundärfluoreszenz nach GRÜN deutlich von der erhaltenen Muskulatur ab. Dies geschieht im Experiment bereits 2—3 Std nach Beginn eines schweren Sauerstoffmangels, also zu einem Zeitpunkt, bei dem lichtmikroskopisch noch keine sicheren Strukturveränderungen zu erkennen sind. Die Tatsache, daß bei Vorliegen postmortaler Veränderungen vielfach erst Entzündungszellinfiltrate auf einen Herzmuskelschaden hinweisen, bringt es mit sich, daß bei einer Reihe klinisch eindeutiger, akuter Herztodesfälle eine pathologisch-anatomische Bestätigung nicht sicher erfolgen kann. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, diesem Mangel abzuhelpen (Literatur bei HECHT, KORB und DAVID), wobei zweifellos histochemische Methoden die meiste Aussicht auf Erfolg haben. Es handelt sich dabei allerdings um Untersuchungen, die zur Zeit nur an größeren Instituten durchführbar sind. Demgegenüber ist die Fluoreszenzmikroskopie leicht zu handhaben und führt bei der Diagnose früher Herzmuskelschäden zu gleich guten Ergebnissen wie histochemische Fermentnachweise.

Methodik

Die Ergebnisse stammen von 32 Fällen, bei denen klinisch oder pathologisch-anatomisch der Verdacht auf einen Herzinfarkt vorlag. Zur Untersuchung kamen Randpartien makroskopisch verdächtiger Herzmuskelbezirke. Fehlten sie, berücksichtigten wir EKG-Befunde. In den restlichen Fällen stellten wir jeweils Schnitte aus der linken Vorder- und Hinterwand, sowie aus dem Septum ventriculorum her. Vom gleichen Gewebstück wurde ein Teil unfixiert nach der Messertiefkühlmethode, der andere nach Fixation mit 4%iger Formalinlösung geschnitten. Unfixierte Präparate färbten wir mit Acridinorange, Coriphosphin, Phosphin E, Hämalaun-Eosin und nach VAN GIESON, fixierte mit Hämalaun-Eosin und nach VAN GIESON, außerdem wurden Eisenablagerungen mit der Turnbull-Reaktion nachgewiesen. Von den Fluoreszenzfarbstoffen dient Phosphin E zum Nachweis von Verfettungen, Acridinorange zur Beurteilung frischer Muskelfaserveränderungen und Coriphosphin zur Darstellung

der Mitochondrien. Phosphin E wird in wäßriger Lösung einer Konzentration von 1:1000 angewendet. Die Schnitte werden 5—10 min gefärbt, anschließend mit Leitungswasser gespült und eingedeckt sowie mit Paraffin umrandet. Acridinorange und Coriphosphin werden mit Michaelis-Puffer gelöst (Konzentration 1:10000) und auf p_H -Werte um p_H 6,5 eingestellt. Bei diesen Färbemethoden werden die Schnitte zunächst kurze Zeit in farbstofffreie Pufferlösung gestellt, anschließend 10 min gefärbt, danach mit farbstofffreier Pufferlösung gespült, eingedeckt und wiederum mit Paraffin umrandet.

Wird das Material sofort bearbeitet, können die gefärbten Schnitte bereits am Ende der Sektion zur Verfügung stehen, so daß die fluoreszenzmikroskopischen Befunde bei der Besprechung mit dem Kliniker berücksichtigt werden können.

Für die vorliegende Arbeit wurden die fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Schnitte von verschiedenen Untersuchern unabhängig voneinander befundet.

Die Fluoreszenzeinrichtung bestand aus einer mit einem HBO-200 Quecksilberhöchst-druckbrenner ausgerüsteten Mikroskopierleuchte (Zeiss, Oberkochen), aus BG 12 — und OG 1 — Filtern, sowie einem Mikroskop vom Typ Standard Junior (Zeiss, Oberkochen).

Es ist ratsam, auf fluoreszenzmikroskopische Dauerpräparate zu verzichten und stattdessen Diapositive anzufertigen. Hier bewährt sich eine Spiegelreflexkamera (z. B. EXA, Ihagee-Werke, Dresden). Sie kann ohne Einstelleinrichtung direkt auf einen geraden Tubus aufgesetzt werden. Bei Agfa-Color-Tageslichtumkehrfilmen (CT 18) liegen dann die Belichtungszeiten bei 1 sec.

Ergebnisse

1. Licht- und fluoreszenzmikroskopisch erkennbare, frische Muskelfaseruntergänge (neun Herzen)

Soweit konkret verwertbar, lag bei diesen Fällen klinisch zwischen dem Beginn des Herzgeschehens und dem Tode ein Intervall von 24 Std bis zu 10 Tagen. Alle Herzen zeigten bereits makroskopisch Veränderungen im Sinne frischer Untergänge. Meist handelte es sich um mehr oder weniger scharf begrenzte blaßgelbe bis lehmfarbene Bezirke, die mehrfach von kleinen, eingesunkenen, rötlichen Herden durchsetzt waren. Nur einmal fanden wir einen völligen thrombotischen Verschuß eines Coronararterienastes, sonst lag regelmäßig eine hochgradig einengende Coronarsklerose vor.

Lichtmikroskopisch. In allen Fällen waren teils flächenhafte, teils herdförmige Muskelfasernekrosen und Entzündungszellinfiltrate zu erkennen.

Fluoreszenzmikroskopisch. Nur in den Schnitten von drei Herzen fanden sich verfettete Muskelfasern. Nach einer Färbung mit Acridinorange stellten sich in Übereinstimmung zu den lichtmikroskopischen Befunden Muskelpartien dar, die sich durch einen Umschlag der Sekundärfluoreszenz von Gelb bis Gelbbraunlich nach Grün deutlich von den erhaltenen Muskelteilen abhoben. Das Plasma der geschädigten Fasern war entweder homogen oder schollig umgewandelt. In keinem Fall waren nach einer Coriphosphinfärbung in veränderten Muskelfasern Mitochondrien zu sehen, in den umgebenden, erhaltenen Muskelarealen schienen sie dagegen vergrößert zu sein.

2. Lichtmikroskopisch nur Entzündungszellinfiltrate, fluoreszenzmikroskopisch außerdem Zeichen für Muskelfaserschädigungen (zwölf Herzen)

In dieser Gruppe unterscheiden sich bereits die klinischen Angaben wesentlich von denen der ersten Gruppe. Nur in vier Fällen wurde der Verdacht auf einen Herzinfarkt ausgesprochen. Während in einem Fall der klinische Verlauf auf einen 8 Std alten Infarkt hinwies, handelte es sich bei den übrigen Fällen um einen

plötzlichen, unerwarteten Tod (Sekundenherztod). Makroskopisch war in keinem Herz ein abgrenzbarer Herd vorhanden, dagegen fand sich stets eine fleckige Zeichnung bestimmter Herzmuskelteile. Sie war meist durch eine unterschiedliche rotbraune Farbe des Muskels, vereinzelt durch kleine hellgelbliche Herde und Streifen hervorgerufen. Bei zwei Herzen waren die Schnittflächen der Muskulatur völlig unauffällig.

Lichtmikroskopisch. In allen Fällen waren kleinherdige oder diffuse, interstitielle entzündliche Infiltrate unterschiedlicher Dichte und Ausdehnung zu erkennen. Da die Muskelfasern keine sicheren Zeichen einer Nekrobiose aufwiesen, war es mehrfach nicht möglich, eine Myokarditis auszuschließen.

Fluoreszenzmikroskopisch. In sieben Fällen stellten sich verfettete Muskelfasern dar, davon zweimal in der für einen Infarkttrand typischen Weise. Nach einer Acridinorangefärbung waren ohne Schwierigkeiten sechsmal herdförmige Muskelfaseruntergänge und sechsmal Teile eines frischen Infarktes zu erkennen. Auch hier war die Diagnose durch einen Umschlag der Sekundärfluoreszenz möglich, dabei zeigten die betroffenen Muskelfasern oft noch eine gute Feinstruktur und unveränderte Kerne. Die Mitochondrien waren meistens deutlich vermindert.

3. Lichtmikroskopisch kein Hinweis für frische Muskelfaseruntergänge bei positivem fluoreszenzmikroskopischem Ergebnis (drei Herzen)

Klinisch lag bei allen Herzen ein Sekundenherztod unbekannter Ursache vor. Makroskopisch fand sich zweimal eine Fleckung bestimmter Herzmuskelpartien, wie sie bei Gruppe 2 beschrieben wurde, ein Herz erschien völlig unverändert.

Fluoreszenzmikroskopisch. Keine Muskelfaserverfettungen. Bei der Acridinorangefärbung stellten sich einmal ein sehr frischer Infarkt, zweimal diffus angeordnete, kleine, herdförmige Untergänge dar. Auch hier konnte die Diagnose auf Grund des Farbumschlages sicher gestellt werden, ohne daß die Muskelfasern eindeutige morphologische Veränderungen aufwiesen.

4. Fluoreszenzmikroskopisch kein Hinweis für frische Muskelfaseruntergänge bei positivem lichtmikroskopischem Ergebnis (drei Herzen)

Alle Fälle befanden sich längere Zeit wegen Herzbeschwerden in ärztlicher Behandlung, der Tod trat trotzdem plötzlich und unerwartet ein. Makroskopisch waren wiederum fleckige und streifige Zeichnungen in bestimmten Muskelabschnitten zu erkennen.

Lichtmikroskopisch. In allen Herzen fand sich eine mehr oder weniger ausgedehnte, interstitielle Entzündung. Sichere Muskelfaserveränderungen waren nicht zu sehen.

Fluoreszenzmikroskopisch. In einem Fall stellten sich ausgedehnte feintropfige Muskelfaserverfettungen dar. Farbveränderungen, wie sie für frisch geschädigte Muskelfasern charakteristisch sind, fehlten; dagegen lag zweimal eine erhebliche Autolyse vor. Diese Fälle wurden 45 bzw. 60 Std nach dem Tode seziert. Bei dem dritten Fall konnten lichtmikroskopisch Zellinfiltrate erst in Nachschnitten festgestellt werden, eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dieser Schnitte wurde nicht durchgeführt.

5. Licht- und fluoreszenzmikroskopisch keine Zeichen für frische Muskelfaseruntergänge (fünf Herzen)

Es handelt sich um Fälle, die plötzlich oder im unmittelbaren Zusammenhang mit einem Angina pectoris-Anfall verstorben waren. Makroskopisch fehlten Veränderungen. Licht- und fluoreszenzmikroskopisch fanden sich ebenfalls keine Hinweise für frische Herzmuskelschädigungen.

Diskussion

Die Befunde der ersten Gruppe zeigen, daß die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse beim experimentellen Herzinfarkt auch für entsprechende Veränderungen des menschlichen Herzens gelten. Hier heben sich ebenfalls, trotz eines oft erheblichen Intervalles zwischen Tod und Sektion, frische Muskelfaseruntergänge bei einer Acridinorangefärbung durch einen Umschlag der Sekundärfluoreszenz nach Grün deutlich von der erhaltenen Muskulatur ab.

Die zweite Gruppe demonstriert eindrucksvoll die Vorteile der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung. Es ist eine bekannte Eigenart der Herzmuskulatur, daß es nach einer Schädigung zwar schnell zu Stoffwechselveränderungen, aber erst nach einer verhältnismäßig langen Zeitspanne zu lichtmikroskopisch sicher erkennbaren Strukturveränderungen kommt. Ihre Beurteilung wird im frühen Stadium der Nekrobiose durch eine Autolyse erschwert, wenn nicht unmöglich gemacht. So ist es verständlich, daß gerade unter den Bedingungen, unter denen pathologische Routineuntersuchungen erfolgen, die Anwesenheit von Entzündungszellen lichtmikroskopisch oft das einzige Zeichen für ein pathologisches Geschehen ist. Sichere Aussagen über die Topographie der Muskelschädigung, die für die Feststellung der Todesursache von entscheidender Bedeutung sind, können meist nicht erfolgen. Selbst die Frage, ob eine Myokarditis vorliegt, kann manchmal erst durch zeitraubende Nachuntersuchungen beantwortet werden. Dagegen sichert eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung die Diagnose, zeigt die Ausdehnung der Muskelfaserschädigung an und erlaubt bei einiger Erfahrung oft eine Aussage über das tatsächliche Alter der Veränderungen.

Die dritte Gruppe zeigt erwartungsgemäß, daß unter Umständen die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung den einzigen Hinweis für frische Muskelfaseruntergänge liefert. Fehlen makroskopische Veränderungen, bleiben solche Fälle Glückstreffer, wenn man sich nicht entschließt, zahlreiche Muskelstückchen zu untersuchen. Bei ihrer Auswahl kann der Zustand der Coronararterien wichtige Hinweise liefern.

Zwei Fälle der vierten Gruppe deuten auf die Grenzen der fluoreszenzmikroskopischen Methode. Da der Umschlag der Sekundärfluoreszenz als Zeichen einer Nekrobiose sicherlich an bestimmte Veränderungen der Cytoplasmaweiße gebunden ist, kann eine erhebliche Autolyse nicht ohne Folgen bleiben. Wie wir im Experiment zeigen konnten, wirkt sich eine Autolyse auf bestimmte Fluoreszenzerscheinungen um so geringer aus, je tiefer die Temperatur ist, bei der die Autolyse stattfindet. Gleiche Verhältnisse zeichnen sich auch bei unseren jetzigen Untersuchungen ab, da mehrfach trotz einer mehr als 50stündigen Lagerung der Verstorbenen Untergänge sicher zu diagnostizieren waren, wenn sofort nach dem Tode eine Überführung in den Kühlraum vorgenommen wurde.

Die fünfte Gruppe ist von untergeordneter Bedeutung. Hier dürfte es sich einerseits um so frische Prozesse handeln, daß auch die Fluoreszenzmikroskopie versagen muß, andererseits besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß die geschädigten Partien im Schnitt nicht getroffen wurden.

Interessant ist die Tatsache, daß zwischen klinischen Angaben über die Dauer der Schädigung und dem pathologisch-anatomischen Befund oft erhebliche Unterschiede bestehen. Sie deuten darauf hin, daß bei einem großen Prozentsatz der Herzmuskelschaden stumm einsetzen muß. Nur so ist es zu erklären, daß wir vielfach bei einem „Sekundenherztod“ entzündliche Zellinfiltrate vorfanden, die auf Grund unserer experimentellen Untersuchungen für einen mindestens 5–6 Std alten Infarkt sprechen.

Der Farbumschlag eines Infarktes setzt herdförmig ein. Man findet im Fluoreszenzmikroskop nach 2–3 Std unscharf begrenzte, dicht liegende, grünlich leuchtende Areale, die oft ineinander übergehen und gut erhaltene Feinstrukturen aufweisen. Eine Unterscheidung zwischen Infarkt und frischen miliaren Untergängen ist in diesem Stadium schwierig. Für die zweite Möglichkeit spricht eine scharfe Begrenzung der Herde sowie das Vorhandensein kleiner Narben und Schwielen. Auf früher abgelaufene Prozesse sind wir im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen, doch sei erwähnt, daß eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung besser als andere Methoden gewisse Altersangaben zuläßt. So ist frisches Granulationsgewebe, abgesehen von unterschiedlichen Zellformen, durch einen mehr oder weniger homogenen hell- bis mattgrünen Untergrund gekennzeichnet. Älteres Granulations- und frisches Narbengewebe sind durch die Anwesenheit und die Zahl von Fibroblasten charakterisiert. Sie sind durch kupferrot leuchtendes Cytoplasma leicht zu erkennen und von Fibrocyten sicher zu unterscheiden. Ältere Narben besitzen eine bräunliche bis braunrote Fluoreszenz.

Schwierigkeiten bei der Beurteilung fluoreszenzmikroskopischer Schnitte können dann entstehen, wenn das Material aus dem Zentrum eines Infarktes stammt. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, immer mehrere Teile des Herzmuskels in einem Block zu schneiden. Damit schafft man innerhalb eines Schnittes exakte Vergleichsmöglichkeiten, die die Diagnose wesentlich erleichtern.

Zusammenfassung

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an menschlichen Herzen nach Acridinorangegefärbung ist es bei der Mehrzahl der Fälle möglich, Infarkte und herdförmige Muskelfaseruntergänge früher und sicherer als lichtmikroskopisch zu erfassen. Die geschädigten Muskelareale heben sich durch einen Umschlag der Sekundärfluoreszenz nach Grün deutlich von den erhaltenen Muskelfasern ab. Die Methode hat sich in der Praxis gut bewährt und kann ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden.

Summary

It is possible in the majority of cases to detect infarcts and focal degenerations of myocardial fibers of human hearts earlier and better by using fluorescence microscopy after staining with acridine orange than it is by using the light microscope. The damaged regions are clearly distinguished from the normal myocardial fibers by an alteration of the secondary fluorescence towards green. The method may be carried out without difficulty and has proven reliable.

Literatur

- 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. ges. gerichtl. Med.* (im Druck).
- R. BUSCHMANN u. B. BAUSDORF: Der Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Sekundärfluoreszenz des Herzmuskels bei Färbung mit Acridinorange und Coriphosphin. *Z. med. Labortechnik* **2**, 243—253 (1961).
- , u. H. DAVID: Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Mitochondrien im Herzmuskel. *Z. mikr.-anat. Forsch.* (im Druck).
- — Fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen am Herzmuskel der Ratte nach Leuchtgasvergiftung. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* (im Druck).
- u. A. HECHT: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am normalen Herzmuskel. *Z. mikr.-anat. Forsch.* (im Druck).
- — Der Einfluß der Autolyse auf das fluoreszenzmikroskopische Erscheinungsbild des experimentellen Herzinfarktes bei der Ratte. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **35**, 331—332 (1961).

Dr. G. KNORR, Pathologisches Institut am Städt. Humboldt-Krankenhaus,
Berlin-Reinickendorf, Teichstr. 65

Dr. G. KORB, Pathologisches Institut der Universität, Marburg/Lahn,
Robert Koch-Straße 5