

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. MEESSEN)

## **Quantitative morphologische Untersuchungen über das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen in den Herzmuskelzellen bei Hungeratrophie und im Winterschlaf**

Von

**REINHARD POCHE und DIETER MÖNKEMEIER**

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 27. Dezember 1961)*

Die mechanischen Eigenschaften von quergestreiften Muskelfasern sind nicht bei allen Muskeln gleich. Es gibt Muskeln, die sich — ohne wesentliche Ermüdungserscheinungen zu zeigen — über längere Zeit mit hoher Frequenz kontrahieren können, wie die Flügelmuskeln der höheren Insekten und die Flugmuskeln der Vögel. Andere Muskeln, wie die Sprungmuskeln der Heuschrecken oder die Beinmuskeln von Vögeln, können sich einige Male mit sehr großer Energie kontrahieren, ermüden aber rasch. Bei den Vögeln unterscheiden sich beide Typen von Muskeln schon makroskopisch: Die Flugmuskeln bestehen vorwiegend aus sog. roten Muskelfasern, während die Beinmuskeln weiß erscheinen. Untersucht man diese Muskeln mit dem Elektronenmikroskop, so findet man in den weißen Muskelfasern der Sprung- bzw. Beinmuskeln dicht gepackt liegende Myofibrillen und nur wenige Mitochondrien. Die roten Muskelfasern der Flugmuskeln dagegen enthalten große Mengen von Mitochondrien. Die funktionelle Masse der Mitochondrien ist in diesen Muskelfasern fast so groß wie die funktionelle Masse der kontraktilen Substanz (EDWARDS, RUSKA, DE SOUZA SANTOS und VALLEJO-FREIRE 1956). Noch höher als in den roten Skelettmuskelfasern ist der Bestand an Mitochondrien in den Herzmuskelzellen, die während des ganzen Lebens pausenlos arbeiten müssen (BULLARD 1912, LINDNER 1954, KISCH 1957). Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß die Masse der Mitochondrien in den Herzmuskelzellen verschiedener Tierarten nicht immer gleich ist; das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen kann vielmehr entsprechend der Körpergröße und der Lebensgewohnheiten der einzelnen Tierarten durchaus verschieden sein (KISCH 1956). Diese Beispiele zeigen, daß das Verhältnis von Mitochondrien und Myofibrillen in Muskelzellen von ausschlaggebender Bedeutung für die Funktion ist. In der vorliegenden Arbeit soll auf Anregung von Herrn Professor MEESSEN untersucht werden, ob auch bei der selben Tierart in den Herzmuskelzellen Unterschiede des Gehaltes an Mitochondrien in Abhängigkeit von der Funktion des Herzens auftreten.

Im Hungerzustand nimmt die allgemeine Bewegungsaktivität ab (DAVID und TONAK 1959). Wenn man Ratten längere Zeit einer qualitativ vollwertigen, aber quantitativ unzureichenden Ernährung unterwirft, kommt es zu einer unkomplizierten allgemeinen Atrophie, von der auch der Herzmuskel mitbetroffen wird. Untersucht man den Herzmuskel solcher Tiere mit dem Elektronenmikroskop und betrachtet die gewonnenen Bilder vergleichend mit entsprechenden

Bildern von normal ernährten Kontrolltieren, so lassen sich wesentliche quantitative Unterschiede im Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen nicht ohne weiteres erkennen (POCHÉ 1958). Auch der Vergleich von elektronenmikroskopischen Bildern des Herzmuskels von Siebenschläfern während der Aktivitätsperiode und zu verschiedenen Zeiten des Winterschlafes läßt keine wesentliche Veränderung des Verhältnisses Mitochondrien:Myofibrillen deutlich werden (POCHÉ 1959). Wenn derartige Veränderungen aber doch vorkommen sollten, so müßten sie so fein sein, daß sie nur mit einer statistisch auswertbaren Untersuchungsmethode zu erfassen wären. Wir haben uns deshalb bemüht, eine quantitative morphologische Methode zu finden, die es erlaubt, auf elektronenmikroskopischen Platten von Flächenanschnitten auf die Volumina von Zellbestandteilen zu schließen. Dabei mußten wir von den in der Lichtmikroskopie gebräuchlichen Methoden ausgehen.

### Untersuchungstechnik

#### *Methoden der Bestimmung des Volumens von Gewebsbestandteilen an Schnittpräparaten in der Lichtmikroskopie*

Aus Schnittpräparaten lassen sich die Volumenverhältnisse der einzelnen Gewebsbestandteile nach dem Prinzip von DELESSE berechnen. Danach gilt unter der Voraussetzung eines sehr großen Untersuchungsmaterials, daß sich Flächenanteile von Gewebsbestandteilen zueinander wie ihre Volumina verhalten (HENNIG 1957, 1958). Die Flächenanteile lassen sich unter Zuhilfenahme eines Abbéschen Zeichenapparates sehr exakt mit einem Planimeter bestimmen. Nach dieser Methode gingen z. B. HOWE u. Mitarb. (1956) vor; sie untersuchten das Cytoplasma von Zellen mit dem Planimeter und zählten die Mitochondrien aus. Auch die Methode der Papiergewichtsbestimmung liefert verwertbare Ergebnisse. LINZBACH (1947) benutzte ein Meßquadrat von  $155\mu$  Kantenlänge, das er in dem Okular seines Mikroskopes befestigte; bei der Untersuchung von Querschnitten des Herzmuskels zählte er die auf ein Quadrat entfallenden Herzmuskelfasern und konnte dann bei bekanntem Herzgewicht auf die Volumina der einzelnen Fasern schließen. SCHOENMACKERS (1958) modifizierte diese Methode, indem er nicht am Mikroskop selbst sondern an photographischen Aufnahmen arbeitete.

Die genannten Methoden gehen von Flächenbestimmungen aus. Da das Prinzip von DELESSE aber sehr viele Messungen voraussetzt, sind diese Verfahren zeitraubend. Es lassen sich jedoch in kürzerer Zeit mehr Messungen ausführen, wenn man die Dimension der Meßeinheit verringert. ROSIVAL definiert eine Fläche als die Summe der in ihr verlaufenden Scharen von Geraden. Wenn man einige dieser Geraden herausgreift und auf ihnen die Strecken bestimmt, die auf die einzelnen von ihnen geschnittenen Gewebsbestandteile entfallen, so kann man auch diese Strecken zueinander in Beziehung setzen. Das Ergebnis solcher Streckenmessungen ist im Einzelfall nicht so genau wie das von Flächenmessungen; da es aber möglich ist, in relativ kurzer Zeit sehr viele Schnitte mit dem Verfahren der Streckenmessung zu untersuchen, kann das Endergebnis wegen der größeren Zahl von Messungen genauer werden als bei Flächenbestimmungen. Auf diesem Prinzip beruhen die Meßverfahren, die mit Integrationstischen arbeiten. Aber auch diese Methoden lassen sich noch vereinfachen, wenn man die Dimension der Meßeinheit weiter verringert. In einem gemischten Körper sind die Volumenwerte der einzelnen Bestandteile des Körpers durch die Zahl der Treffer definiert, die von einem beliebig angeordneten System von Raumpunkten in diesen einzelnen Bestandteilen des Körpers erzielt werden. Bei Schnittpräparaten liegen diese Raumpunkte zwangsläufig in einer Ebene. Da die Anordnung der Raumpunkte aber beliebig sein kann, ist ein Rückschluß auf die Volumenverhältnisse in der Zusammensetzung des Gesamtkörpers erlaubt. Solche Überlegungen, die schon GAUSS anstellte, bildeten die Grundlage für die Entwicklung von Punktzählgeräten durch GLAGOLEFF (1933), CHALKLEY (1943) und HAUG (1955). Die Verfahren dieser Autoren haben aber den Nachteil, daß sie entweder mit zu vielen oder aber mit zu wenigen Punkten arbeiten. Das Punktsystem muß der Art des zu untersuchenden Körpers und seiner einzelnen Bestandteile angepaßt sein. Wenn die Meßpunkte das Verhältnis der

einzelnen Gewebsbestandteile richtig wiedergeben sollen, dürfen sie nicht zu weit auseinanderliegen. Andererseits dürfen die Meßpunkte aber auch nicht zu dicht zusammengedrängt werden, weil das Punktsystem dann zu unübersichtlich wird und den Beobachter leicht verwirrt. HENNIG (1957) hat deshalb gefordert, daß der Abstand der einzelnen Meßpunkte den mittleren Durchmesser der kleinsten der zu bestimmenden Gewebsanteile nicht wesentlich über- oder unterschreiten soll. Er entwickelte ein Integrationsokular, bei dem 25 Meßpunkte in gleichmäßigen Abständen auf eine Kreisfläche verteilt sind.

#### *Modifikation des Punktzählverfahrens nach HENNIG für die Elektronenmikroskopie*

Für die Anwendung in der Elektronenmikroskopie erschien uns ein Punktzählverfahren ähnlich der Methode von HENNIG (1957) am geeignetsten. Dem histologischen Schnitt in der Lichtmikroskopie entspricht in der Elektronenmikroskopie die photographische Platte. Wir haben das System von Meßpunkten auf eine durchsichtige Glasschablone aufgetragen und diese Glasschablone dann auf Negativplatten von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gelegt. Wenn man nun beide im durchfallenden Licht mit bloßem Auge oder mit Hilfe einer Lupe betrachtet, kann man auszählen, wieviele Meßpunkte auf die einzelnen Gewebsbestandteile oder Zellorganellen der zu untersuchenden Objekte entfallen. Es ist dabei natürlich notwendig, daß die elektronenoptische Vergrößerung und damit die Größe der zu untersuchenden Zellorganellen und der Abstand der Meßpunkte der Glasschablone entsprechend den Forderungen von HENNIG richtig aufeinander abgestimmt sind. Die elektronenoptische Vergrößerung muß so sein, daß die Zellorganellen einwandfrei zu erkennen und voneinander abzugrenzen sind; sie darf aber nicht zu hoch sein, weil sonst die überschaubaren Zellareale zu klein werden würden. Wie HENNIG haben wir die Zahl von 25 Meßpunkten gewählt und diese als Mittelpunkte von gleichgroßen Kreisen in stets gleichgroßem Abstand über eine Kreisfläche verteilt (Abb. 1). Eine derartige Anordnung der Punkte ist übersichtlich und hat außerdem den Vorteil, unsymmetrisch zu sein, so daß man denselben Schnitt in beliebigen Stellungen der Schablone mehrfach ausmessen kann, ohne dabei eine Einstellung zu wiederholen. Da bei dem von uns benutzten RCA-Elektronenmikroskop die Negative quadratisch sind und eine Kantenlänge von etwa 5 cm besitzen, haben wir einen Meßkreis von etwa 3,7 cm Durchmesser und einen Abstand der einzelnen Meßpunkte von etwa 0,7 cm gewählt.

Für unsere Fragestellung erwies sich nach orientierenden Vorversuchen eine elektronenoptische Vergrößerung von 5700:1 als gut geeignet. Bei dieser Vergrößerung bewegen sich die mittleren Durchmesser der Mitochondrien in Herzmuskelzellen etwa zwischen 0,5 und 1,0  $\mu$ m. Die Zahl der Meßpunkte, die ein Mitochondrion oder eine Myofibrille getroffen hatten, wurde getrennt addiert. Die Punkte, die auf andere Zellorganellen, Blutcapillaren oder sehr kleine Interzellularräume entfielen, haben wir unter dem Sammelbegriff „Andere Gewebsbestandteile“ zusammengefaßt. Für die Auswertung der Meßergebnisse wurden nur Aufnahmen herangezogen, die Längsschnitte von Herzmuskelzellen zeigten, weil nur den interfibrillären Mitochondrien eine wesentliche funktionelle Bedeutung für die Muskelkontraktion zugeschrieben wird (HARMAN und FEIGELSON 1952); die perinucleär gelegenen Anhäufungen von Mitochondrien haben wir also nicht mitberücksichtigt. Schließlich haben wir auch alle Platten ausgeschieden, die größere Kernareale oder aber größere Anteile des Interstitiums enthielten.

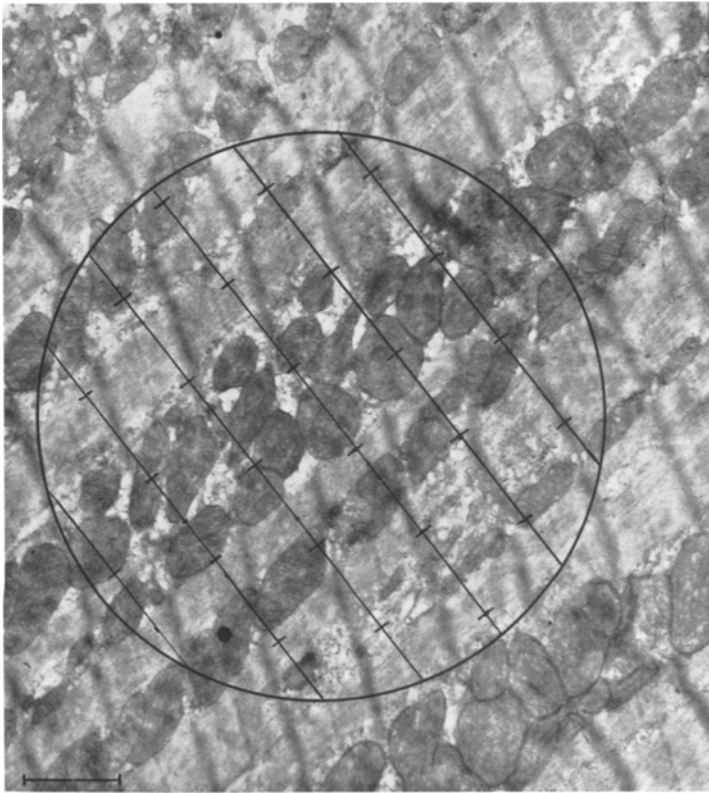


Abb. 1. Ausschnitt aus einer Herzmuskelzelle einer normal ernährten Ratte. Elektronenoptische Vergrößerung 5700:1. Die Glasschablone mit den 25 in einem Kreis eingeschlossenen Meßpunkten ist auf die Negativplatte aufgelegt. Platte und Schablone sind etwa auf das Doppelte vergrößert. Vergrößerung der Abbildung 12400:1. (Ratte 80, Arch.-Nr. 1758 A/60.)

### *Untersuchungsmaterial*

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir in Methacrylat eingebettete Gewebsblöcke des Herzmuskels von fünf Ratten und von sechs Siebenschläfern aus früheren Untersuchungen (POCHE 1958, 1959).

Bei den fünf Ratten handelte es sich um drei normal ernährte Tiere (Ratte 80, 272 und 419) und um zwei unterernährte Tiere, die über längere Zeit eine qualitativ vollwertige Kost in unzureichender Menge erhalten und dabei innerhalb von 27 Tagen (Ratte 27) oder von 52 Tagen (Ratte 3) etwa 50% ihres Gewichtes verloren hatten. Diese Tiere zeigten eine allgemeine Atrophie der Muskulatur, der parenchymatösen Organe und auch des Herzens, aber keine Hungerödeme.

Von den sechs Siebenschläfern befanden sich zwei im Wachzustand (Siebenschläfer III und IV). Die übrigen Tiere waren nach verschieden langer Dauer des Winterschlafes getötet worden, und zwar:

Siebenschläfer I nach  $1\frac{1}{2}$  Monaten, Siebenschläfer V nach  $3\frac{1}{2}$  Monaten, Siebenschläfer VII nach 8 Monaten.

Siebenschläfer VI war nach einem Winterschlaf von 5 Wochen geweckt und anschließend 4 Tage lang ohne Futter und ohne Wasser gehalten worden.

### *Untersuchungsergebnisse*

Die Ergebnisse der Messungen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Den darin wiedergegebenen Prozentzahlen liegt die Auszählung von 1500 Meß-

punkten bei den Siebenschläfern und von 750 Meßpunkten bei den Ratten zugrunde. Die Meßpunkte, die nicht auf interfibrilläre Mitochondrien oder Myofibrillen entfielen, sind unter der Rubrik „Andere Gewebsbestandteile“ zusammengefaßt. Das quantitative Verhältnis der funktionellen Masse von Mitochondrien und Myofibrillen ist in den Tabellen 1 und 2 durch den Quotienten Mitochon-

Tabelle 1. *Die relative Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in den Herzmuskelzellen von Siebenschläfern*

	Im Wachzustand		Nach einer Lethargie von			Im Wachzustand, nach vorzeitig unterbrochenem Winterschlaf und anschließendem Hunger und Durst
			1½ Mon.	3½ Mon.	8 Mon.	
	S III	S IV	S I	S V	S VIII	S VI
Mitochondrien . . . . .	44,4 %	46,5 %	38,5 %	45,9 %	38,3 %	50,6 %
Myofibrillen . . . . .	45,0 %	44,9 %	52,5 %	49,0 %	52,8 %	37,6 %
Mi/My-Quotient . . . . .	0,98	1,03	0,73	0,92	0,72	1,43
Andere Gewebsbestandteile .	9,6 %	8,6 %	9,0 %	4,2 %	8,9 %	11,8 %

drien: Myofibrillen ausgedrückt. Wenn man einen solchen Quotienten von Prozentzahlen bildet, muß man jedoch bedenken, daß sich dabei die statistischen Fehler dieser Prozentsätze addieren können. Zur Sicherung der Ergebnisse sind deshalb statistische Berechnungen notwendig.

Tabelle 2. *Die relative Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in den Herzmuskelzellen von Ratten*

	Bei normaler Ernährung			Im Hungerzustand mit einem Gewichtsverlust von 50 % innerhalb von	
				27 Tagen	52 Tagen
	R 80	R 272	R 419	R 27	R 3
Mitochondrien	35,3 %	40,6 %	40,2 %	29,9 %	27,9 %
Myofibrillen	47,5 %	43,4 %	47,8 %	45,7 %	54,4 %
Mi/My-Quotient	0,74	0,93	0,84	0,65	0,51
Andere Gewebsbestandteile	17,2 %	16,0 %	12,0 %	24,4 %	17,7 %

Für unsere Zwecke eignete sich am besten die  $\chi^2$ -Methode von K. PEARSON in ihrer Abwandlung nach BRAND und SNEDECOR<sup>1</sup>. Bei der Berechnung der Werte von  $\chi^2$  mußten wir von den absoluten Zahlen unserer Messungen ausgehen. Wir mußten deshalb auch die Rubrik „Andere Gewebsbestandteile“ mitberücksichtigen, die zwar den Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen nicht verändern

<sup>1</sup> Für die freundliche Beratung in mathematischen Dingen und für die liebenswürdige Berechnung der  $\chi^2$ -Werte sind wir Herrn Dipl.-Math. R. K. BAUER vom Verein Deutscher Eisenhüttenleute, Düsseldorf, zu großem Dank verpflichtet.

kann, die aber doch die absolute Zahl der auf Mitochondrien oder Myofibrillen entfallenden Meßpunkte beeinflußt. Wir hatten also jeweils zwei Häufigkeitsreihen mit drei Merkmalsklassen miteinander zu vergleichen, so daß für die Beurteilung des errechneten Wertes von  $\chi^2$  zwei Freiheitsgrade zur Verfügung standen. Die Wahrscheinlichkeit *P*, daß zwischen zwei Beobachtungsreihen ein statistisch wesentlicher Unterschied besteht, läßt sich danach folgendermaßen darstellen:

$\chi^2$	4,61	5,99	<b>9,21</b>	13,82
<i>P</i>	90 %	95 %	<b>99 %</b>	99,9 %

Wenn man eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % zuläßt, ist unter den vorliegenden Bedingungen ein Unterschied zwischen zwei Meßreihen statistisch gesichert, wenn der Wert von  $\chi^2$  9,21 oder mehr beträgt.

Tabelle 3. Werte von  $\chi^2$  beim Vergleich von Doppelmessungen über die absolute Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in den Herzmuskelzellen von Siebenschläfern

Meßreihe 2	Meßreihe 1		
	S I	S IV	S V
SI	0,36	1,58	1,44
SIV			
SV			

Um die Genauigkeit unserer Meßmethode zu prüfen, haben wir die elektronenmikroskopischen Platten von drei Siebenschläfern zweimal ausgezählt. Wie die  $\chi^2$ -Werte in Tabelle 3 zeigen, besteht zwischen diesen Doppelmessungen eine gute Übereinstimmung. Bei Siebenschläfer III haben wir die Messungen sogar dreimal durchgeführt und die drei Meßreihen miteinander verglichen. In diesem Falle mußte die Originalformel von K. PEARSON angewendet werden. Ein Unterschied zwischen den drei Meßreihen wäre hier als statistisch gesichert anzusehen, wenn der Wert

von  $\chi^2$  13,3 oder mehr betrüge; der errechnete Wert belief sich aber nur auf 3,63, so daß auch hier eine gute Übereinstimmung gegeben ist.

Tabelle 4. Werte von  $\chi^2$  beim Vergleich der absoluten Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in Herzmuskelzellen von Siebenschläfern

	Im Wachzustand		Nach einer Lethargie von			Im Wachzustand, nach vorzeitig unterbrochenem Winterschlaf und anschließendem Hunger und Durst
			1½ Mon.	3½ Mon.	8 Mon.	
	S III	S IV	S I	S V	S VII	S VI
SIII	3,32	3,32	15,1	58,4	11,9	9,81
SIV			13,6	25,6	11,2	9,41
SI	15,1	13,6	34,8	34,8	0,01	31,5
SV	58,4	25,6		27,2	27,6	57,2
SVII	11,9	11,2	0,01		27,5	27,5
SVI	9,81	9,4	31,5	57,2		

Bei den Siebenschläfern haben wir die wachen Tiere miteinander und die wachen Tiere mit den schlafenden verglichen. Die entsprechenden  $\chi^2$ -Werte sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, lassen sich bei den wachen Siebenschläfern III und IV keine Unterschiede im Verhältnis Mitochon-

drien:Myofibrillen nachweisen. Das gleiche gilt für die lethargischen Siebenschläfer I und VII, die 6 Wochen und 8 Monate geschlafen hatten. Der Abfall des Quotienten Mitochondrien:Myofibrillen von 1 bei den wachen Tieren auf 0,7 bei den schlafenden Siebenschläfern I und VII ist dagegen statistisch gesichert; die entsprechenden  $\chi^2$ -Werte liegen zwischen 11,2 und 15,1. Bei Siebenschläfer V,

der  $3\frac{1}{2}$  Monate geschlafen hatte, betrug der Quotient Mitochondrien: Myofibrillen 0,92 (Tabelle 1). Wie Tabelle 4 zeigt, ließ sich der Unterschied zwischen Siebenschläfer V und den wachen Siebenschläfern sowie auch zwischen Siebenschläfer V und den beiden anderen schlafenden Siebenschläfern I und VII statistisch sichern. Bei Siebenschläfer VI, der nach einem fünfwöchigen Winterschlaf geweckt wurde und anschließend 4 Tage gehungert und gedurstet hatte, war das Verhältnis Mitochondrien: Myofibrillen mit 1,43 auffallend hoch. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist der Unterschied zwischen diesem Tier und jedem anderen Siebenschläfer statistisch signifikant, erscheint aber beim Vergleich mit den wachen Tieren geringer als beim Vergleich mit den schlafenden Tieren.

Bei den drei normal ernährten Ratten betrugen die Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen 0,74, 0,84 und 0,93. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, wird der  $\chi^2$ -Wert von 9,21 lediglich beim Vergleich zwischen Ratte 80 und Ratte 419, bei denen die Quotienten 0,74 und 0,84 betragen, geringfügig überschritten. Dagegen ergeben sich keine sicheren Unterschiede, wenn man diese beiden Tiere mit dem dritten Tier (Ratte 272) vergleicht. Dieses ist deshalb bemerkenswert, weil sich damit für die am weitesten auseinanderliegenden Quotienten von 0,74 bei Ratte 80 und 0,93 bei Ratte 272 kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen läßt. Die geringe Überschreitung der Grenze des  $\chi^2$ -Wertes von 9,21 beim Vergleich der Ratten 80 und 419 läßt sich mathematisch mit den dort besonders großen Schwankungen in der Rubrik „Andere Gewebsbestandteile“ erklären. Außerdem sei erwähnt, daß wir bei den normal ernährten Ratten absichtlich Tiere verschiedener Stämme und verschiedenen Alters gewählt haben. Wenn man berücksichtigt, daß die Prozentzahlen der relativen Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen durch Addition des jeweiligen statistischen Fehlers stärker schwanken können, daß aber andererseits bei allen drei normal ernährten Ratten etwa die gleiche Zahl von Messungen durchgeführt wurde, so kann man mit großer Wahrscheinlichkeit den Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen in der Herzmuskelzelle einer normal ernährten Ratte mit rund 0,85 annehmen.

Vergleicht man das Verhältnis Mitochondrien: Myofibrillen der Herzmuskelzellen der normal ernährten Ratten mit dem der hungernden Ratten, so ergeben sich in allen Fällen deutliche Unterschiede, wie die in Tabelle 6 zusammengestellten  $\chi^2$ -Werte erkennen lassen. Bei Ratte 27, die innerhalb von 27 Tagen etwa die Hälfte eines Körpergewichtes verloren hatte, beträgt der Quotient Mitochondrien: Myofibrillen 0,65. Ratte 3, die den gleichen Gewichtsverlust erst innerhalb

Tabelle 5. Werte von  $\chi^2$  beim Vergleich der absoluten Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in den Herzmuskelzellen normal ernährter Ratten

	R 80	R 272	R 419
R 80		4,36	9,73
R 272	4,36		5,70
R 419	9,73	5,70	

Tabelle 6. Werte von  $\chi^2$  beim Vergleich der absoluten Häufigkeit von Mitochondrien und Myofibrillen in den Herzmuskelzellen von normal ernährten und hungernden Ratten

	Bei normaler Ernährung			Im Hungerzustand mit einer Gewichtsabnahme von 50 % innerhalb von	
				27 Tagen	52 Tagen
	R 80	R 272	R 419	R 27	R 3
R 27	11,3	20,9	37,2		13,3
R 3	12,4	30,8	32,1	13,3	

von 52 Tagen erreichte, weist dagegen einen Quotienten von 0,51 auf. Der Vergleich der Meßreihen bei beiden Tieren führt zu einem  $\chi^2$ -Wert von 13,31 (Tabelle 6); es besteht also auch hier ein gesicherter Unterschied.

Nach den vorstehend beschriebenen Messungen und Berechnungen ergeben sich für das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen in den Herzmuskelzellen von Siebenschläfern und Ratten unter verschiedenen Bedingungen die nachstehenden Anhaltswerte:

Siebenschläfer im Wachzustand . . . . .	1,0
Siebenschläfer nach einem Winterschlaf von:	
1½ Monaten . . . . .	0,7
3½ Monaten . . . . .	0,9
8 Monaten . . . . .	0,7
Siebenschläfer nach vorzeitig unterbrochenem Winterschlaf und 4 Tagen	
Hunger und Durst . . . . .	1,4
Normal ernährte Ratte . . . . .	0,85
Ratte im Hungerzustand:	
bei schneller Abmagerung . . . . .	0,65
bei langsamer Abmagerung . . . . .	0,50

### Erörterung der Ergebnisse

Die Untersuchungen an den Siebenschläfern haben ergeben, daß das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen bei wachen Tieren etwa 1 beträgt. Dieses Verhältnis sinkt während des Winterschlafes auf etwa 0,7 ab. Aus früheren Untersuchungen an den gleichen Versuchstieren wissen wir, daß während des Winterschlafes auch die Größe des einzelnen Mitochondrions abnimmt; so betrug bei den wachen Siebenschläfern III und IV die mittlere Größe eines Mitochondrions  $0,95:0,45 \mu$ , bei den schlafenden Tieren dagegen nur  $0,8:0,4 \mu$ . Wenn man hieraus die Flächenwerte berechnet und diese zueinander in Beziehung setzt, so ergibt sich eine Verkleinerung der Mitochondriengröße bei den schlafenden Tieren um 25% oder, anders ausgedrückt, von 1 auf 0,75. Dies bedeutet, daß die Verringerung des Quotienten Mitochondrien:Myofibrillen während des Winterschlafes im wesentlichen auf der Verkleinerung des einzelnen Mitochondrions beruht, daß aber keine wesentliche Verringerung der Zahl der Mitochondrien während des Winterschlafes eintritt. Unsere nach den früheren Untersuchungen an Siebenschläfern aufgestellte Theorie, daß in der Herzmuskelzelle die Zahl der Mitochondrien nur ein Maß für die Kapazität und nicht für die jeweilige Intensität des Stoffwechsels darstelle (POCHE 1959), kann somit auch als quantitativ-morphologisch gesichert gelten.

Einer besonderen Erörterung bedürfen noch die etwas aus dem Rahmen fallenden Mitochondrien:Myofibrillen-Quotienten von 1,43 bei Siebenschläfer VI und von 0,92 bei Siebenschläfer V. Siebenschläfer VI war nach fünfwöchigem Winterschlaf geweckt worden und bekam anschließend 4 Tage lang weder etwas zu fressen noch etwas zu trinken. Er befand sich während dieser 4 Tage bei voller motorischer Aktivität in einem Stoffwechselzustand, der sich von dem des Winterschlafes nur quantitativ unterschied, ihm qualitativ aber weitgehend entsprach. Als Betriebsstoff standen ihm lediglich seine eigenen Fettreserven zur Verfügung. Die früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Herzmuskel dieses Tieres hatten zwar ergeben, daß die Mitochondrien etwas größer sind als die der

lethargischen Tiere; ihre Größe lag jedoch immer noch um 5% unter der der Mitochondrien bei den anderen wachen Tieren. Der Anstieg des Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen auf 1,43 läßt sich also in diesem Falle nicht durch eine Veränderung der Größe der Mitochondrien erklären; dagegen ist es nicht ausgeschlossen, daß ihre Zahl zugenommen hat. Daß kurzfristiger Hunger sich auf die Zahl der Mitochondrien auswirken kann, zeigen Untersuchungen an Nichtwinterschläfern. So fanden ALLARD, MATHIEU, LAMIRANDE und DE CANTERO (1952) bei der Ratte nach 6 Tagen Hunger eine Vermehrung der Zahl der Mitochondrien in den Leberzellen, während DAVID und TONAK (1950) nach 3—4 Tagen Hunger im Skelettmuskel der Maus eine leichte Verminderung der Mitochondrien sahen. Über den Herzmuskel sind uns entsprechende Untersuchungen nicht bekannt. Wir möchten annehmen, daß im Falle von Siebenschläfer VI der Anstieg des Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen auf einer Vermehrung der Anzahl der Mitochondrien beruht, und daß diese wiederum mit der abnormen Stoffwechselsituation des Tieres zusammenhängt. Eine ähnliche Erklärung läßt sich auch für den hohen Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen bei Siebenschläfer V geben. Das Tier war nach einem Winterschlaf von  $3\frac{1}{2}$  Monaten Dauer getötet worden. Diese Zeit entspricht etwa der Dauer einer durchgehenden Schlafperiode, die für den Siebenschläfer von LYMAN und CHATFIELD (1955) mit maximal 114 Tagen angegeben wird. Aus den früheren Untersuchungen von Siebenschläfer V wissen wir, daß die Mitochondrien bei ihm genau so groß waren wie bei den anderen beiden lethargischen Tieren. Der Wert des Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen von 0,92 bei Siebenschläfer V hängt also nicht mit der Größe der einzelnen Mitochondrien zusammen. Wir möchten diesen Anstieg des Quotienten von 0,7 nach einem Winterschlaf von  $1\frac{1}{2}$  Monaten auf 0,92 nach einem Winterschlaf von  $3\frac{1}{2}$  Monaten deshalb lediglich auf eine Störung des Zustandes der Lethargie zurückführen. Diese Störung hat wahrscheinlich darin bestanden, daß das Tier einige Tage vor seiner Tötung gerade eine Schlafperiode beendet hatte und vorübergehend wach gewesen war.

Nach den vorstehenden Untersuchungen liegt der Quotient Mitochondrien: Myofibrillen, der bei wachen Siebenschläfern etwa 1,0 beträgt, bei normal ernährten Ratten um 0,85. Unter den Bedingungen der Hungeratrophie sinkt dieser Quotient deutlich ab, und zwar bei langsamer Abmagerung (Ratte 3) stärker als bei schneller Abmagerung (Ratte 27). Die Quotienten Mitochondrien: Myofibrillen betrugen bei Ratte 27, die innerhalb von 27 Tagen die Hälfte ihres Gewichtes verloren hatte, 0,65 und bei Ratte 3, die innerhalb von 52 Tagen die Hälfte ihres Körpergewichtes verloren hatte, 0,51. Zwischen beiden Tieren besteht ein statistisch signifikanter Unterschied. Bei der vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchung von Präparaten des Herzmuskels von beiden Tieren hatten wir immer wieder den Eindruck, daß die atrophischen Prozesse an den Mitochondrien und auch an den Myofibrillen bei der Ratte 3 ausgeprägter waren als bei der Ratte 27. Dies bedeutet, daß die Atrophie des Herzens bei langsamer Abmagerung stärker ist als bei schneller Abmagerung, und daß der Quotient Mitochondrien: Myofibrillen um so kleiner wird, je höher der Grad der Atrophie ist. Ein ähnliches Verhalten der Mitochondrien konnten DAVID und TONAK (1959) im Skelettmuskel der Maus nachweisen: Nach kurzfristigem Hunger, der nur zu einer ganz geringen Atrophie führen konnte, fanden sie auch nur eine ganz geringe Verminderung der Mitochondrien; demgegenüber führte eine durch Denervierung

bedingte stärkere Atrophie der Skelettmuskelfasern auch zu einer starken Verminderung der absoluten Zahl der Mitochondrien.

### Zusammenfassung

In Anlehnung an das in der Lichtmikroskopie gebräuchliche Punktzählverfahren von HENNIG wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, an Negativplatten von elektronenmikroskopischen Aufnahmen das quantitative Verhältnis der Volumina verschiedener Gewebs- oder Zellbestandteile zueinander zu bestimmen. Bei Ratten beträgt das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen in den Herzmuskelzellen normalerweise rund 0,85; bei Hungeratrophie sinkt es infolge Abnahme der Mitochondrien nach schneller Abmagerung auf etwa 0,65, nach langsamer Abmagerung auf 0,50. Bei Siebenschläfern beträgt der Quotient Mitochondrien:Myofibrillen während des Wachzustandes 1,0, während des Winterschlafes aber nur etwa 0,7, im wesentlichen infolge Abnahme der Größe der Mitochondrien um etwa 25%. Die Zahl der Mitochondrien ist während des Winterschlafes nicht wesentlich vermindert. Nach vorübergehender Unterbrechung oder nach Abbruch des Winterschlafes steigt das Verhältnis Mitochondrien:Myofibrillen wieder an und kann unter extremen Bedingungen Werte bis zu 1,43 erreichen, wahrscheinlich infolge einer vorübergehenden Vermehrung der Zahl der Mitochondrien.

### Summary

Using the principle of the Hennig point-counting method in light microscopy a new technic was developed for electron-microscopy. With this new method the quantitative relationships between the volumes of different parts of tissues or cells could be determined from the negative plates of micrographs. In well nourished rats the ratio of mitochondria:cardiac myofibrils was 0,85. In acute starvation the ratio was 0,65 due to a decrease in the number of mitochondria caused by the rapid atrophy. With prolonged starvation the ratio was 0.50. In the dormouse during active state the ratio of mitochondria to myofibrils was 1.0, whereas during hibernation it was only 0.7. The difference was due to a decrease in the size of the mitochondria of about 25%. Their number during hibernation, however, was not reduced. After a transitory interruption of hibernation or after its termination the ratio of mitochondria to myofibrils increased. Under extreme conditions values of 1.43 were obtained, no doubt the consequence of a temporary increase in the number of mitochondria.

### Literatur

- ALLARD, C., R. MATHIEU, G. LAMIRANDE and A. DE CANTERO: Description of a counting technic and preliminary results on a rat liver in different physiological and pathological conditions. *Cancer Res.* **12**, 407—412 (1952).
- BULLARD, H. H.: On the interstitial granules of striated muscle. *Amer. J. Anat.* **14**, 1—46 (1912).
- CHALKLEY, H. W.: Method for the quantitative morphologic analysis of tissue. *J. nat. Cancer Inst.* **4**, 47—53 (1943).
- DAVID, H., u. E. TONAK: Sarkosomenzahl und Faserquerschnitt der Skelettmuskulatur im Hunger und bei Denervationsatrophie. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 145—152 (1959).
- EDWARDS, G. A., H. RUSKA, P. DE SOUZA SANTOS and A. VALLEJO-FREIRE: Comparative cytophysiology of striated muscle with special reference to the role of the endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 143—156 (1956).

- GLAGOLEFF, A. A.: On the geometrical methods of quantitative mineralogic analysis of rocks. Trans. Inst. Econ. Min. Moskau 1933.
- HARMAN, J. W., and M. FEIGELSON: Studies on mitochondria II. The cytological localisation of mitochondria in heart muscle. Exp. Cell Res. **3**, 58—64 (1952).
- HAUG, H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **118**, 302—312 (1955).
- HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. Mikroskopie **12**, 174—202 (1957).
- Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie. Zeiss-Werk-Z. **6**, 78—86 (1958).
- HOWE, A., K. G. RICHARDSON and M. S. C. BIRBECK: Quantitative observations on the mitochondria from sections of guinea mammary gland. Exp. Cell Res. **10**, 194—213 (1956).
- KISCH, B.: An electron microscopic comparison of different striated muscles. Exp. Med. Surg. **14**, 273—285 (1956a).
- The sarkosomes of the heart. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 361—362 (1956b).
- Der ultramikroskopische Bau von Herz und Capillaren. Darmstadt: Steinkopf 1957.
- LINDNER, E.: Über die Sarkosomen der Herz- und Skelettmuskulatur. Beitr. path. Anat. **114**, 244—258 (1954).
- LINZBACH, A. J.: Mikrometrische und histologische Analyse hypertropher menschlicher Herzen. Virchows Arch. path. Anat. **314**, 534—594 (1947).
- LYMAN, C. P., and P. O. CHATFIELD: Physiology of hibernation in mammals. Physiol. Rev. **35**, 403—425 (1955).
- POCHE, R.: Submikroskopische Beiträge zur Pathologie der Herzmuskelzelle bei Phosphorvergiftung, Hypertrophie, Atrophie und Kaliummangel. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 165—248 (1958).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Herzmuskels von Siebenschläfern während des aktiven und des lethargischen Zustands. Z. Zellforsch. **50**, 332—360 (1959a).
- Über den Winterschlaf. Dtsch. med. Wschr. **45**, 2018—2025 (1959b).
- SCHOENMACKERS, J.: Vergleichende quantitative Untersuchungen über den Faserbestand des Herzens bei Herz- und Klappenfehlern sowie Hochdruck. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 3—22 (1958).

Oberarzt Priv.-Doz. Dr. med. REINHARD POCHE und Dr. med. DIETER MÖNKEMEIER,  
Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5