

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

Über den Einfluß von Dinitrophenol und Thyroxin auf die Ultrastruktur des Herzmuskels bei der Ratte

Von

REINHARD POCHE

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Dezember 1961)

Das Dinitrophenol entfaltet bei in vitro-Versuchen eine ganz ähnliche Wirkung auf den Zellstoffwechsel wie das Thyroxin: Der Sauerstoffverbrauch steigt an (FUHRMAN und FIELD 1942, LARDY und PHILLIPS 1943, LOOMIS und LIPMAN 1948, TYLER 1950, SIMON 1953, BRADY 1955, PFLEGER, RUMMEL und JACOBY 1958), die Milchsäurebildung und der Glucoseverbrauch nehmen zu (LARDY und PHILLIPS 1943, HEIMBERG, PARK, ISAACS und PITT-RIVERS 1955, PFLEGER, RUMMEL und JACOBY 1958) und die Atmungskettenphosphorylierung wird entkoppelt (LOOMIS und LIPMAN 1948, MELROSE und TERNER 1951, MARTIUS und HESS 1951, 1952, SIMON 1953, BRADY 1955).

Die Steigerung von O_2 -Verbrauch und Lactatproduktion durch Dinitrophenol und Thyroxin ist auch bei in vivo-Versuchen nachgewiesen worden (HALL, FIELD, SAHYUN, CUTTING und TAINTER 1933, PAKRER 1956, PFLEGER, RUMMEL, SEIFEN und TIMP 1959). Die mit dieser Stoffwechselwirkung einhergehenden Veränderungen der submikroskopischen Zellstruktur sind in vivo bisher für das Schilddrüsenhormon an der Leber und am Herzmuskel untersucht worden. In den Leberzellen kommt es nach Überdosierung von Thyroxin zu einer hochgradigen Schwellung der Mitochondrien und des Ergastoplasmas (SCHULZ, LÖW, ERNSTER und SÖSTRAND 1957). Die Herzmuskelzellen zeigen nach Überdosierung von l-Trijodthyronin eine Aufhellung des Grundsarkoplasmas, eine sehr ausgeprägte Schwellung des Sarkoplasmareticulums mit Schwellung der sog. Triaden und eine knapp mittelgradige Schwellung der Mitochondrien (POCHE 1957). Dinitrophenol führt am isolierten Kaninchenherzen in der Langendorff-Apparatur zu einer Erweiterung des transversalen Tubulussystems, zur Vergrößerung von Mitochondrien mit Matrixverlust und Schwellung der Innenmembranen (LINDNER und WELLENSIEK 1958). Über eigene Untersuchungen zur Ultrastruktur und zum Stoffwechsel des Herzmuskels vom Hund bei akuter Dinitrophenolvergiftung wird an anderer Stelle berichtet.

In der vorliegenden Arbeit soll über die Ergebnisse biochemischer, lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen an Ratten nach Vorbehandlung mit Dinitrophenol und Thyroxin berichtet werden.

Material und Methode¹

Es wurden drei Gruppen von weißen Ratten untersucht: Gruppe 1 (28 Tiere) diente zur Kontrolle. Gruppe 2 (23 Tiere) wurde 14 Tage lang mit Thyroxin vorbehandelt (Dosis: 1 mg/kg Körpergewicht/Tag subcutan). Gruppe 3 (14 Tiere) bekam jeweils 30 min vor Versuchsbeginn 20 mg/kg Körpergewicht Dinitrophenol subcutan. Bei allen Tieren wurden

¹ Herrn Prof. Dr. W. RUMMEL, Direktor des Pharmakologischen Institutes der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, und Herrn Oberarzt Priv.-Doz. Dr. K. PFLEGER sei auch an dieser Stelle für die liebenswürdige Überlassung des Untersuchungsmaterials und für wertvolle Diskussion herzlich gedankt.

der Sauerstoffverbrauch und die Lactatkonzentration des Blutes bestimmt, und zwar sowohl im Wachzustand als auch in Vollnarkose (200 mg/kg Körpergewicht Luminal-Natrium intraperitoneal). Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Bei fünf Tieren jeder Gruppe wurde sofort nach der Dekapitation das Herz entnommen, und kleine Herzmuskelstückchen wurden in der üblichen Weise in einer 1%igen, gepufferten, isotonischen Osmiumsäurelösung fixiert, entwässert und in Methacrylat eingebettet. Die Dünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom nach PORTER und BLUM angefertigt und in dem RCA-Elektronenmikroskop EMU 3 C untersucht. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden Herzmuskel, Leber und Niere in kaltem Formalin fixiert, an Gefrier- oder Paraffinblöcken geschnitten und mit Hämalaun-Eosin, Elastica-Hämatoxylin-van Gieson, Hämalaun-Sudan, Bestschem Carmin gefärbt; außerdem wurde die Turnbullblau-Reaktion durchgeführt.

Untersuchungsbefunde

1. Biochemische Untersuchungen

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen sind schon von PFLEGER, RUMMEL, SEIFEN und TIMP (1959) ausführlich mitgeteilt worden, so daß wir uns an dieser Stelle auf eine ganz kurze Wiedergabe der Ergebnisse beschränken können. Am wachen Tier betrugen die Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches bzw. der Milchsäurekonzentration des Blutes bei der Kontrollgruppe 348 ml/kg/Std bzw. 8,8 mg-%, bei der Dinitrophenol-Gruppe 740 ml/kg/Std bzw. 22,6 mg-%, bei der Thyroxin-Gruppe 562 ml/kg/Std bzw. 16,1 mg-%. Die entsprechenden Werte in Narkose lauten: Kontrollgruppe 161 ml/kg/Std bzw. 6,4 mg-%, Dinitrophenol-Gruppe 580 ml/kg/Std bzw. 21,3 mg-%, Thyroxin-Gruppe 373 ml/kg/Std bzw. 9,5 mg-%. Dies bedeutet, daß bei den wachen Tieren nach Dinitrophenolgaben der Sauerstoffverbrauch um 113% und die Lactatkonzentration des Blutes um 157% erhöht war, während nach Vorbehandlung mit Thyroxin die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches 62% und die der Lactatkonzentration des Blutes 83% betrug. Bei den narkotisierten Tieren, bei denen der Einfluß einer erhöhten Muskelaktivität während der Versuche mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, waren nach Vorbehandlung mit Dinitrophenol der Sauerstoffverbrauch um 260% und die Lactatkonzentration des Blutes um 233% und nach Vorbehandlung mit Thyroxin um 132% bzw. um 48% gesteigert.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Im *Herzmuskel* schien sowohl bei den Dinitrophenol-Tieren als auch bei den Thyroxin-Tieren die Blutfüllung der Gefäße etwas stärker zu sein als bei den Kontrolltieren. Besonders bei den Thyroxin-Ratten waren zahlreiche Blutcapillaren dicht mit geldrollenartig angeordneten Erythrocyten angefüllt. Bei den mit Thyroxin behandelten Tieren erschienen außerdem die interstitiellen Zellen etwas vermehrt, insbesondere fielen immer wieder einzelne Leukocyten zwischen den Herzmuskelzellen auf. Bei beiden Versuchsgruppen war in den Herzmuskelzellen lichtmikroskopisch weder Fett noch Glykogen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu zeigten bei den Kontrolltieren einige Herzmuskelzellen eine leicht positive Carminfärbung. Bei beiden Versuchsgruppen, besonders bei den Dinitrophenol-Tieren, fanden sich einige homogenisierte und stärker eosinophile Herzmuskelzellen, die gewöhnlich auch kernlos erschienen.

Die *Leberzellen* waren bei den Kontrolltieren in fleckförmiger Anordnung leicht feintropfig verfettet, vorwiegend in der Läppchenperipherie. Bei den Versuchstieren beider Gruppen ließ sich dagegen kein Fett in den Leberzellen nachweisen. Glykogen oder eisenhaltiges Pigment waren weder bei den Versuchstieren noch bei den Kontrolltieren in der Leber nachweisbar.

Die *Nieren* waren bei den Versuchstieren und bei den Kontrolltieren lichtmikroskopisch frei von Fett und Glykogen. Die Dinitrophenol-Ratten zeigten

eine geringe fleckförmige Hyperämie der intertubulären Blutcapillaren im Bereich der Rinden-Mark-Grenze. Eine Dinitrophenol-Ratte wies einige verkalkte Harnkanälchen auf.

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Herzmuskels

a) Kontrollgruppe. Bei den Kontrolltieren ergaben die Untersuchungen das Bild eines normalen Ratten-Herzmuskels, wie wir es an anderer Stelle ausführlich beschrieben haben (POCHÉ 1958b). In den Myofibrillen betrug der Abstand der Z-Streifen entsprechend dem jeweiligen Kontraktionszustand $0,7\text{--}1,5\mu$.

b) Der Herzmuskel nach Vergiftung mit Dinitrophenol. Elektronenmikroskopisch bietet der Herzmuskel kein einheitliches Bild. Einzelne Herzmuskelzellen erscheinen ganz normal; die meisten von ihnen lassen aber bei Übersichtsvergrößerungen zwischen 1200:1 und 3000:1 eine mehr oder weniger deutliche feine Vacuolisierung erkennen. Bei stärkeren Vergrößerungen zeigt sich, daß in solchen Herzmuskelzellen das Grundsarkoplasma verschieden stark aufgelockert ist (Abb. 1 u. 2). Die etwa 150 Å messenden kleinen Cytogranula sind vermindert oder ganz verschwunden. Die Mitochondrien können unverändert sein und scheinen dann in einem wasserklaren Sarkoplasma zu schwimmen (Abb. 2). Zahlreiche Mitochondrien lassen aber auch eine verschieden stark ausgeprägte Fragmentation ihrer Innenmembranen und manchmal auch kleinfleckige Aufhellungen der Matrix erkennen. Bei einem kleinen Teil der Innenmembranen oder Cristae mitochondriales sieht man umschriebene Erweiterungen des Spatiums (des sog. osmiophoben Intervalls) von etwa 50 Å auf $100\text{--}150\text{ Å}$. Diese umschriebenen Auftreibungen des Spatiums liegen manchmal sehr dicht nebeneinander, so daß ein perlschnur- oder rosenkranzartiges Bild entsteht. Andere Mitochondrien konfluieren, so daß lange, korkzieherartige geschlängelte Mitochondrien entstehen, die sich über die Länge mehrerer Muskelfächer erstrecken können (Abb. 2). Nur in einzelnen Herzmuskelzellen sind die Mitochondrien stärker geschwollen. Mitochondriengranula sind im allgemeinen nicht nachzuweisen. Das endoplasmatische Reticulum (longitudinales System des Sarkoplasmareticulums) ist meistens geschwollen und kann sehr große Vacuolen bilden (Abb. 1 und 2). Dagegen ist das transversale Tubulussystem (transversales System des Sarkoplasmareticulums), das die Herzmuskelzellen in Höhe der Z-Streifen durchquert, nicht oder nur wenig erweitert (Abb. 1). Die Fetttropfen sind gegenüber den Kontrollen leicht vermehrt. Ihre Verteilung im Herzmuskel ist aber ziemlich unregelmäßig, so daß manche Herzmuskelzellen verhältnismäßig viel, andere dagegen nur wenig Fett enthalten. Einzelne Fetttropfen sind eng an Mitochondrien angeschmiegt, die meisten lassen aber keinen engen räumlichen Kontakt zu den Mitochondrien erkennen, entsprechen also mehr der Anbauform des Herzmuskelfettes. Die Myofibrillen bestehen aus dicken und dünnen Myofilamenten. Die Abstände der Z-Streifen liegen in nicht oder nur gering veränderten Herzmuskelzellen zwischen 1 und $1,4\mu$. Manche Herzmuskelzellen lassen jedoch eine Kontraktur mit ungleichmäßigen Z-Abständen von $0,8\mu$ bis herunter zu $0,4\mu$ erkennen. In diesen Zellen sind die Z-Streifen verbreitert und erscheinen eigentümlich verwaschen und verschmiert (sog. Kontrakturstreifen) und die Myofilamente der Myofibrillen sind häufig etwas aufgesplittert (Abb. 3). In Herzmuskelzellen mit Kontrakturstreifen

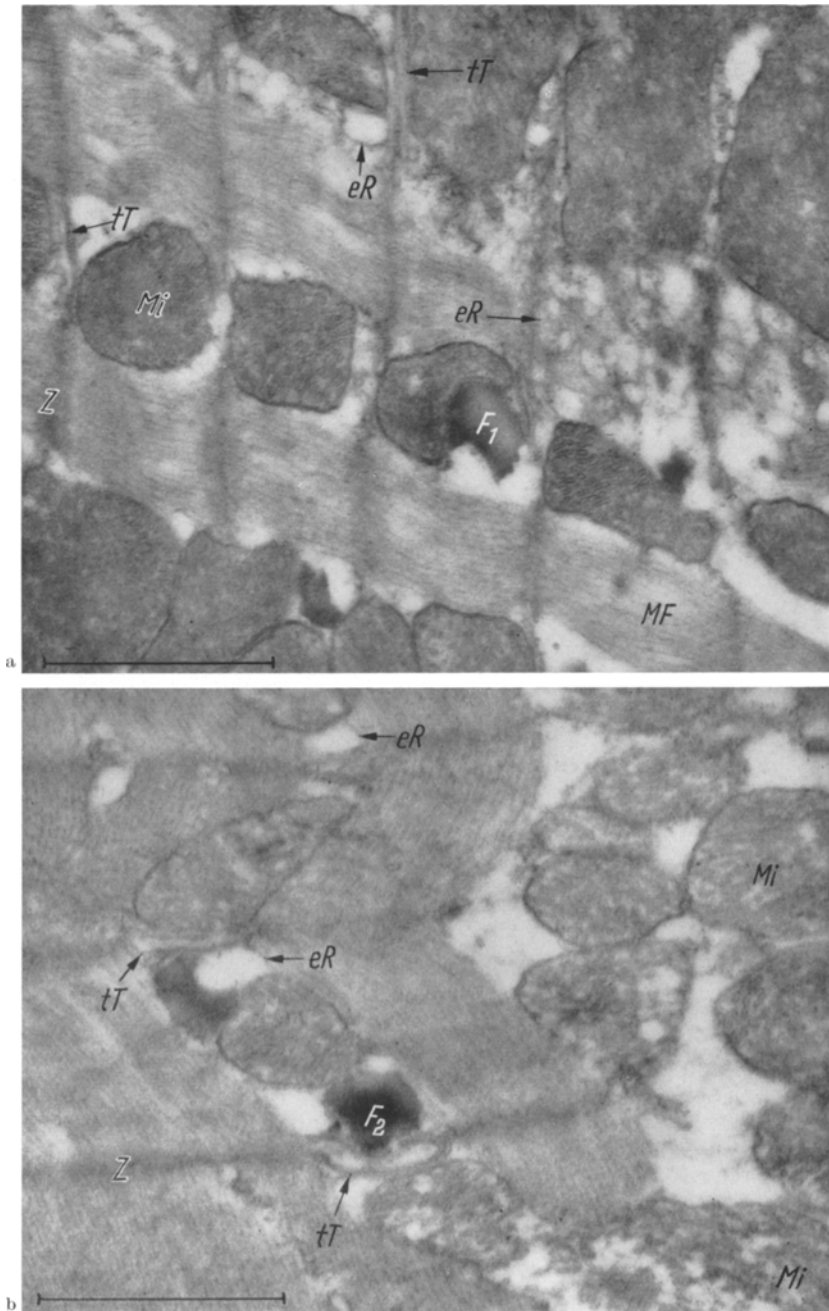


Abb. 1a u. b. Herzmuskel der Ratte nach Vergiftung mit Dinitrophenol. Das Grundsarkoplasma ist aufgehellte und leicht geschwollen, die kleinen Cyto granula sind vermindert. Die Mitochondrien (*Mi*) sind noch kaum verändert oder nur leicht fleckig aufgehellte. Das endoplasmatische Reticulum ist schon deutlich geschwollen (*eR*). Die transversalen Tubuli (*tT*) sind nicht wesentlich erweitert. Die Fetttropfen liegen neben den transversalen Tubuli, und zwar manchmal in der Abbauf orm (*F₁*), häufiger aber in der Anbauform (*F₂*). Die Myofibrillen (*MF*) sind weitgehend kontrahiert. Z-Streifen der Myofibrillen (*Z*). a Arch.-Nr. 1847 A/60, elektronenoptisch 8100:1, Endvergrößerung 30 000:1. b Arch.-Nr. 1561 D/60, elektronenoptisch 8100:1, Endvergrößerung 32 000:1

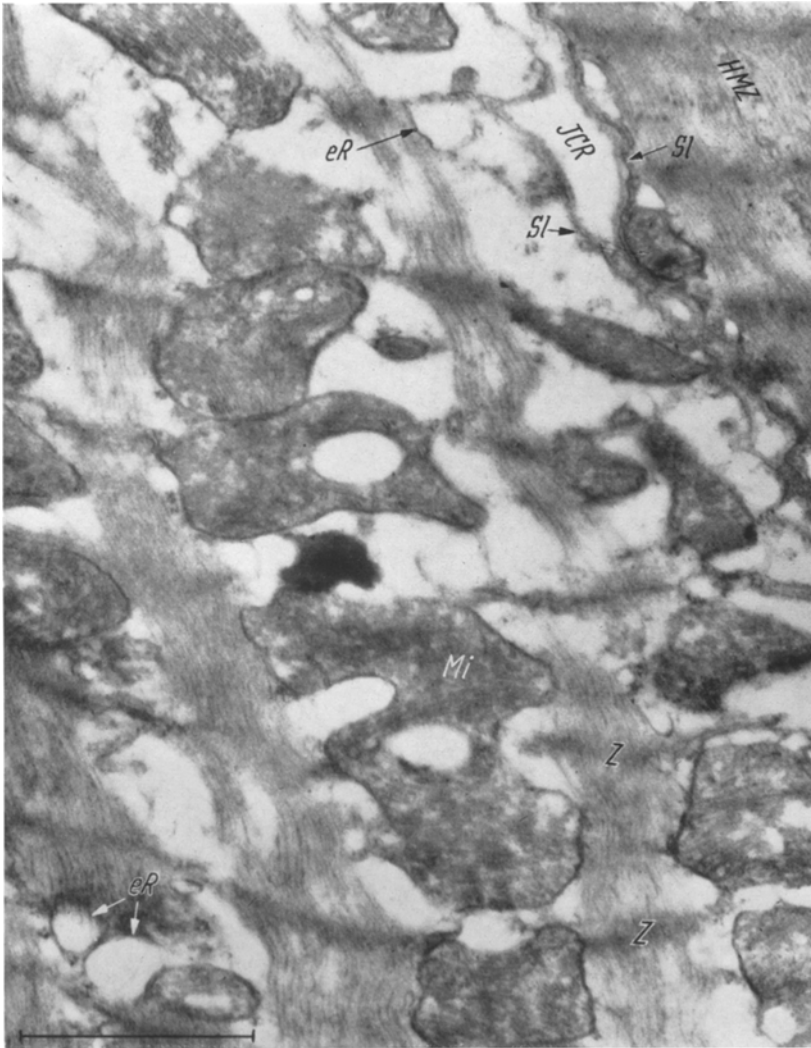


Abb. 2. Herzmuskel der Ratte nach Vergiftung mit Dinitrophenol. Teil einer Herzmuskelzelle mit stärkerer Schwellung und Aufhellung des Grundsarkoplasmas (sog. Zellödem) mit weitgehendem Verlust der kleinen Cyto granula (Glykogen). Die Mitochondrien (*Mi*) sind teilweise konfluiert und können zu längeren korkzieherartigen Gebilden umgewandelt werden. Viele Mitochondrien sind leicht- bis mittelgradig geschwollen und zeigen kleinleckige Aufhellungen der Matrix. Das endoplasmatische Reticulum (*eR*) ist stark geschwollen. Die Myofibrillen sind kontrahiert, die Myofilamente sind teilweise etwas aufgelockert. Z-Streifen der Myofibrillen (*Z*). Sarkolemm (*Sl*). Der Interzellularraum zwischen zwei Herzmuskelzellen ist wasserhell (*ICR*). Rechts oben im Bild Teil einer nur gering veränderten Herzmuskelzelle (*HMZ*). Arch.-Nr. 1848 A/60, elektronenoptisch 8100:1, Endvergrößerung 30 000:1

sind die Aufhellung des Grundsarkoplasmas und die Schwellung des endoplasmatischen Reticulums sowie auch die Mitochondrienschwellungen oft ziemlich stark ausgeprägt; man findet aber andererseits auch auffallend wenig veränderte Herzmuskelzellen mit den Zeichen der Kontraktur, bei denen insbesondere die Mitochondrien fast unverändert erscheinen. Die Zellkerne sind in den meisten Herzmuskelzellen normal oder etwas aufgelockert und im allgemeinen nicht wesentlich

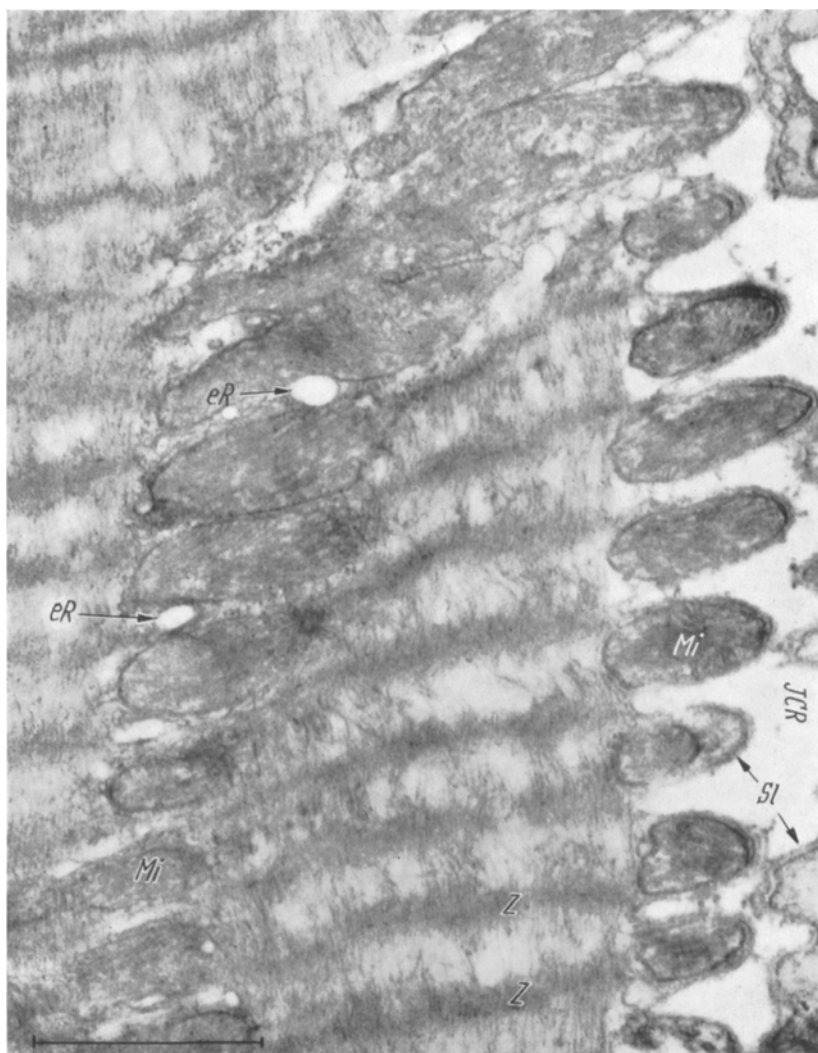


Abb. 3. Herzmuskel der Ratte nach Vergiftung mit Dinitrophenol. Die Herzmuskelzelle befindet sich in Kontraktur. Die Z-Streifen (Z) sind verbreitert und verschmiert (sog. Kontrakturstreifen); ihre Abstände liegen bei etwa $0,4 \mu$. Die Myofilamente der Myofibrillen sind etwas aufgelockert und aufgesplittet. Das endoplasmatische Reticulum (eR) ist mäßig geschwollen. Die Mitochondrien (Mi) sind nicht geschwollen. Sarkolemm (SI). Der Intercellularraum (ICR) ist wasserhell. Arch.-Nr. 1847 D/60, elektronenoptisch 8100:1, Endvergrößerung 30 000:1

geschwollen. Auch der perinucleäre Raum zwischen primärer und sekundärer Kernmembran ist nicht oder nicht wesentlich verbreitert. Die Protomembranen der Herzmuskelzellen lassen keine Vermehrung der Membranvesiculationen erkennen. Glanzstreifendehiszenzen sind nicht zu beobachten. Manche Blutcapillaren sind etwas weit. Ihre Endothelzellen besitzen meistens ein ziemlich helles Cytoplasma, sind aber im allgemeinen nicht wesentlich geschwollen. Auch die Zellmembranen der Endothelzellen zeigen keine Vermehrung der Membranvesiculationen.

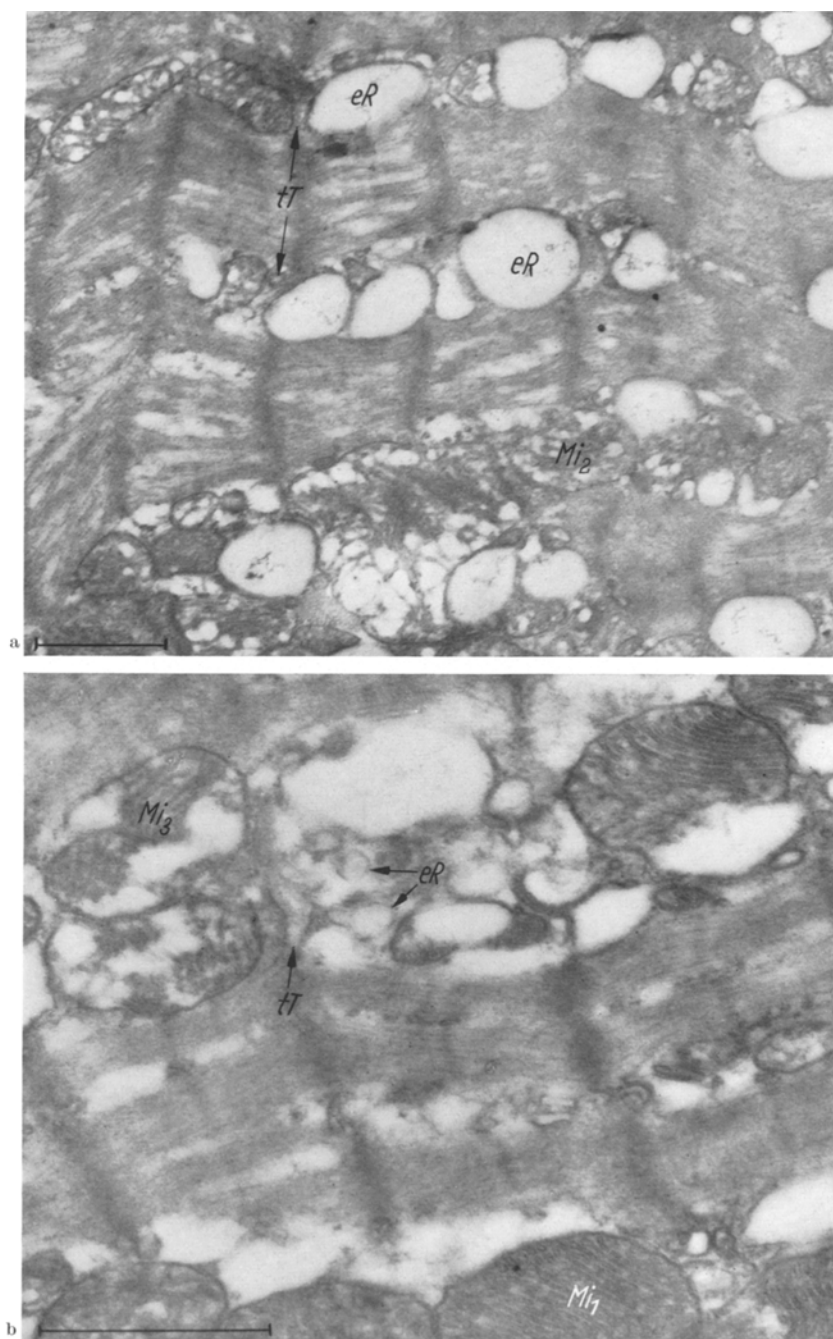


Abb. 4a u. b. Herzmuskel der Ratte nach Überdosierung von Thyroxin. Das Grundsarkoplasma ist aufgehellert und — besonders im unteren Bildteil — leicht geschwollen. Das endoplasmatische Reticulum (*eR*) ist stark geschwollen. Die transversalen Tubuli (*tT*) sind nicht erweitert. Die Mitochondrien sind teilweise unverändert (*Mi₁*), größtenteils aber leicht bis mittelgradig geschwollen (*Mi₂*), zum Teil mit grobfleckigen Aufhellungen der Matrix und partiellem Verlust von Innenmembranen (*Mi₃*). Die Innenmembranen fragmentiert. Die Myofibrillen sind kontrahiert, die Myofilamente sind teilweise aufgesplittert. a Arch.-Nr. 1584 C/60, elektronenoptisch 4400:1, Endvergrößerung 16800:1. b Arch.-Nr. 1694 E/60, elektronenoptisch 8100:1, Endvergrößerung 30000:1

c) **Der Herzmuskel nach Überdosierung von Thyroxin.** Im Elektronenmikroskop hat man bei Übersichtsvergrößerungen von 1200:1 bis 3000:1 den Eindruck, daß der Herzmuskel bei den mit Thyroxin vorbehandelten Ratten stärker ver-



Abb. 5. Herzmuskel der Ratte nach Überdosierung von Thyroxin. Das endoplasmatische Retikulum (*eR*) ist hochgradig geschwollen. Die transversalen Tubuli (*tT*) sind nicht geschwollen. Die Mitochondrien (*Mi*) zeigen fragmentierte Innenmembranen mit perlschnurartigen Auftreibungen des hellen Spatiums. Z-Streifen der Myofibrillen (Z). Arch.-Nr. 1696 D/60, elektronenoptisch 14800:1, Endvergrößerung 56000:1

ändert ist als bei den Dinitrophenol-Tieren. Man findet jedoch auch hier noch Zellen mit normaler Ultrastruktur zwischen den verschieden stark veränderten Herzmuskelzellen. Bei den meisten Herzmuskelzellen ist das Grundsarkoplasma

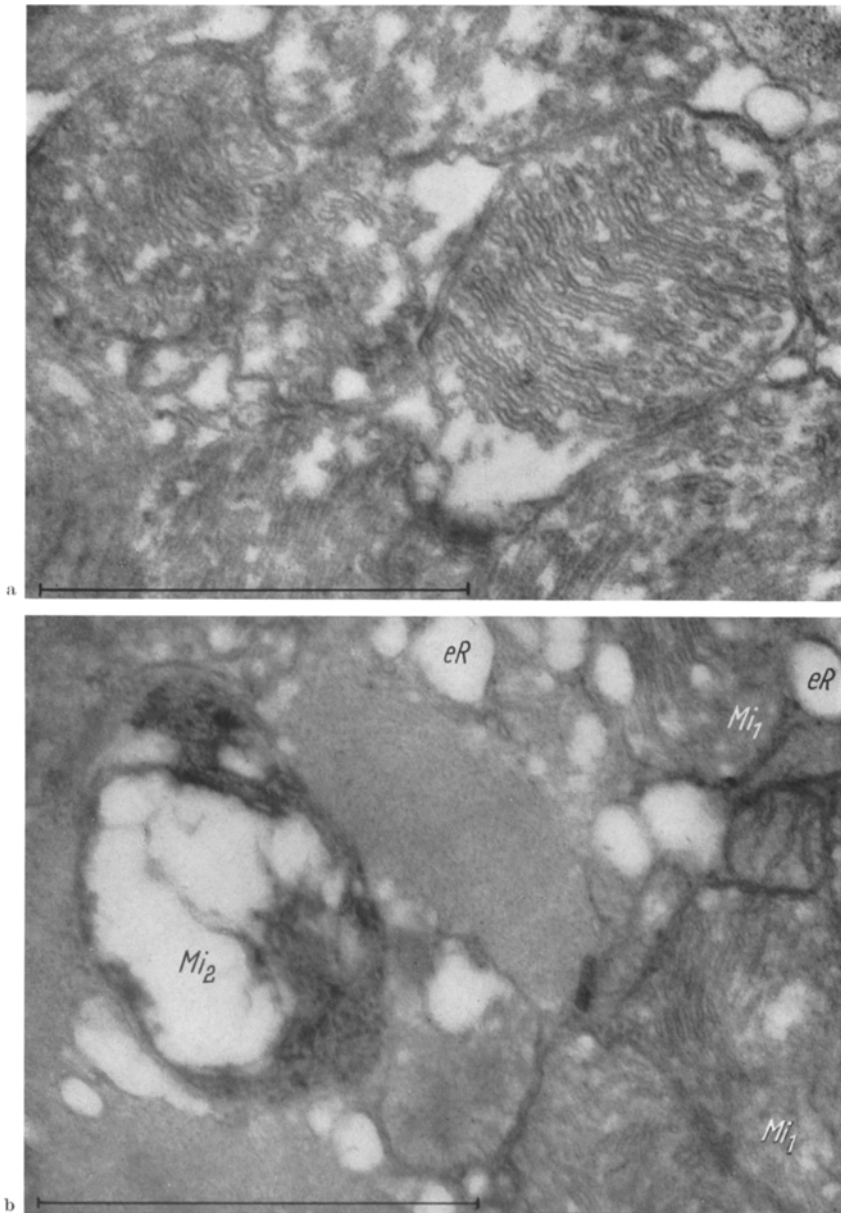


Abb. 6a u. b. Herzmuskel der Ratte nach Überdosierung von Thyroxin. a Mitochondrien mit Schlangelung, perlschnurartiger Auftreibung und Fragmentierung der Innenmembranen. Arch.-Nr. 1654 B/60, elektronenoptisch 14 800:1, Endvergrößerung 56 000:1. b Schwellung des endoplasmatischen Reticulums (*eR*). Mitochondrien mit kleinleckiger Schwellung (*Mi₁*). Degeneriertes Mitochondrion (*Mi₂*) mit angelagerter granulärer Substanz (Lipofuscinbildung). Arch.-Nr. 1851 B/60, elektronenoptisch 14 800:1, Endvergrößerung 58 000:1

aufgehellt, und die etwa 150 Å messenden kleinen Cytogranula sind entweder vermindert oder ganz verschwunden. Das endoplasmatische Reticulum (longitudinales System des Sarkoplasmareticulums) ist verschieden stark geschwollen

(Abb. 4). Diese Schwellung kann so schwer sein, daß man in manchen Herzmuskelzellen zwischen den Myofibrillen und Mitochondrien fast nur noch große, optisch leere Vacuolen erkennt (Abb. 5). Die in Höhe der Z-Streifen verlaufenden transversalen Tubuli sind dagegen nicht oder nur verhältnismäßig wenig erweitert. Wie die Schwellung des endoplasmatischen Reticulums, so ist auch die Schwellung der Mitochondrien nach Thyroxin stärker als nach Dinitrophenol. Manche Mitochondrien zeigen großfleckige Aufhellungen mit partiellem Innenmembranverlust und Matrixschwund (Abb. 4). Darüber hinaus lassen bei den Thyroxin-Tieren die meisten Mitochondrien charakteristische Veränderungen ihrer Innenstrukturen erkennen, wie wir sie — allerdings in viel geringerer Ausprägung — schon bei den Dinitrophenol-Tieren gesehen haben: Das Spatium (sog. osmiophobes Intervall) der Innenmembran oder Cristae mitochondriales zeigt sehr dichtstehende, umschriebene Erweiterungen von etwa 50 Å auf 100—150 Å, so daß ein perlschnur- oder rosenkranzartiges Bild entsteht (Abb. 6a). Außerdem sind die Innenmembranen — auch bei noch nicht sehr geschwollenen Mitochondrien — stark fragmentiert. Die einzelnen Fragmente sind meistens ziemlich klein und an den Enden kolbig erweitert, aber meistens durch eine Membran verschlossen. Offenbar erfolgt die Fragmentation besonders leicht zwischen den umschriebenen Erweiterungen des Spatiums. Mitochondriengranula sind im allgemeinen nicht vorhanden. Ganz vereinzelt findet man degenerierte Mitochondrien mit beginnender Lipofuscinbildung (Abb. 6b); diese Bilder entsprechen ganz denen, die wir — allerdings viel häufiger — im Herzmuskel der Ratte bei Hungeratrophie gesehen haben. Das Fett in den Herzmuskelzellen ist gegenüber den Kontrollen etwas vermehrt. Die Fetttropfen sind recht unregelmäßig auf die einzelnen Herzmuskelzellen verteilt. Manche Fetttropfen liegen dicht an Mitochondrien angeschmiegt, die meisten aber lassen keinen engen räumlichen Kontakt zu Mitochondrien erkennen, d. h. die Fetttropfen liegen teilweise in der Abbauf orm, größtenteils jedoch in der Anbauform des Herzmuskelfettes vor. Die Myofibrillen bestehen aus dünnen und dicken Myofilamenten. Sie befinden sich meistens in einem leichten bis mittleren Kontraktionszustand mit Z-Abständen von 1,0—1,3 μ . Das Muster der Myofilamente ist in zahlreichen Myofibrillen etwas aufgesplittert oder weist kleine Lücken auf. Ganz vereinzelt findet man auch Herzmuskelzellen mit ungleichmäßig kontrahierten Myofibrillen oder mit sog. Kontrakturstreifen, deren Abstände bei etwa 0,8 μ liegen. Glanzstreifendehiszenzen sind nicht nachzuweisen. Die Zellkerne der meisten Herzmuskelzellen erscheinen normal oder leicht aufgelockert, aber nicht wesentlich geschwollen. Der perinucleäre Raum zwischen primärer und sekundärer Kernmembran ist nicht oder nur geringgradig erweitert. Weder die Protomembranen der Herzmuskelzellen noch die Zellmembranen der Endothelzellen der Blutcapillaren lassen eine Vermehrung der Membranvesiculationen erkennen.

Erörterung der Ergebnisse

Die biochemischen Untersuchungen haben erwiesen, daß bei unseren Versuchstieren zum Zeitpunkt der Entnahme des Herzens die für eine Vergiftung mit Dinitrophenol und Thyroxin charakteristischen Veränderungen des Stoffwechsels vorgelegen haben: Sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die

Milchsäurekonzentration des Blutes waren erheblich gesteigert, und zwar bei den Dinitrophenol-Tieren stärker als bei den Thyroxin-Tieren.

Lichtmikroskopisch weisen die beiden Versuchsgruppen untereinander und auch im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur geringe Unterschiede auf. So findet man im Herzmuskel der Versuchstiere einzelne Herzmuskelzellen, die keine Querstreifung erkennen lassen, homogenisiert und stärker eosinophil erscheinen und meistens auch keinen Kern mehr aufweisen. Diese Veränderungen, die als beginnende Nekrose der betreffenden Herzmuskelzellen aufgefaßt werden, sind nach Dinitrophenol häufiger zu beobachten als nach Thyroxin. Eine Parallele hierzu ergibt sich aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei denen Kontrakturen von Herzmuskelzellen nach Dinitrophenol öfter gefunden werden als nach Thyroxin. Die Leber und die Nieren enthalten bei den Versuchstieren beider Gruppen weder Glykogen noch Fett, während bei den Kontrolltieren immer etwas Fett in der Leber nachzuweisen ist.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen interessiert besonders die Frage, ob die Veränderungen der Ultrastruktur des Herzmuskels nach Vorbehandlung mit Dinitrophenol und Thyroxin übereinstimmen, und ob die submikroskopischen Veränderungen des Herzmuskels nach Thyroxin den früher von uns nach Einwirkung von 1-Trijodthyronin beschriebenen Veränderungen entsprechen. Wir haben deshalb die früheren 1-Trijodthyronin-Versuche — gewissermaßen als dritte Versuchsgruppe — mit in die Erörterungen einbezogen. Beim Vergleich dieser drei Gruppen ergeben sich folgende übereinstimmenden Befunde:

Bei allen drei Versuchsgruppen sind im Herzmuskel neben fast unveränderten Herzmuskelzellen alle Stadien der beschriebenen Veränderungen nebeneinander zu finden. Die initiale Veränderung der Herzmuskelzelle besteht offenbar in einer Aufhellung und Schwellung des Grundsarkoplasmas (sog. Zellödem) mit zunehmender Verminderung der kleinen, etwa 150 Å messenden Cytogranula (Paladesche Granula). Dies steht in Einklang mit der schon früher geäußerten Anschauung, daß diese Cytogranula nicht in jedem Falle Ribonucleinsäure darstellen müssen, sondern daß sie in der Herzmuskelzelle beispielsweise auch das Glykogen repräsentieren können (POCHÉ 1959). Diese Anschauung ist inzwischen durch die Untersuchungen von THEMANN (1960) sowie von REVEL, NAPOLITANO und FAWCETT (1960) bestätigt worden.

Die Mitochondrien der Herzmuskelzellen sind bei allen drei Versuchsgruppen nur leicht bis mittelgradig geschwollen. In keinem Falle enthalten die Mitochondrien der Versuchstiere Granula; dieser Befund ist deshalb bemerkenswert, weil wir in den Herzmuskelzellen hungernder Ratten und lethargischer Siebenschläfer eine Vermehrung der Mitochondriengranula gefunden haben. Die Bedeutung der Mitochondriengranula ist damals von uns eingehend besprochen worden: Danach könnten sie Elektrolyte (Kationen), Vitamine oder aber auch kleinste Substratpartikelchen darstellen. Das völlige Fehlen der Granula nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit entkoppelnden Substanzen einerseits und ihre Vermehrung bei Hunger und im Winterschlaf unter gleichzeitiger Vermehrung der dichten Körper im Sarkoplasma andererseits läßt auch daran denken, daß es sich bei ihnen um das morphologische Äquivalent von Catecholaminen in den Mitochondrien handeln könnte; nach den Untersuchungen von DENGLE (1961)

sinkt nach Vorbehandlung mit Thyroxin der Catecholamingehalt des Herzmuskels, und auch die Catecholaminaufnahme der Herzmuskelzellen nimmt deutlich ab.

Eine Vermehrung der Membranvesiculationen ist bei keiner der drei Versuchsgruppen festzustellen, und zwar weder an den Protomembranen der Herzmuskelzellen noch an den Zellmembranen der Capillarendothelzellen. Dieser Befund ist nicht leicht zu deuten: Er könnte einmal darauf hinweisen, daß der Stofftransport auf dem Wege der Membranvesiculation trotz erhöhten Stoffwechsels nicht zugenommen hat. Wir wissen aber aus unseren Untersuchungen an lethargischen Siebenschläfern, daß man bei der Beurteilung der Membranvesiculationen einen Zeitfaktor berücksichtigen muß. Aus diesem Grunde halten wir es für wahrscheinlich, daß die Geschwindigkeit des Stofftransportes durch Membranvesiculationen im selben Verhältnis wie die Stoffwechselintensität zugenommen hat, so daß wir im Augenblicksbild des morphologischen Präparates die Zahl der Invaginationen und Bläschen an den Membranen nicht vermehrt finden. Bei allen Versuchstieren sind die Fetttropfen im Herzmuskelfewebe leicht vermehrt; allerdings liegt diese Fettvermehrung weit unterhalb der lichtmikroskopischen Darstellbarkeit. Die Fetttropfen liegen im Sarkoplasma in unmittelbarer Nähe der transversalen Tubuli; nach ihren räumlichen Beziehungen zu den Mitochondrien liegen sie meistens in der Anbauform, manchmal aber auch in der Abbauform des Herzmuskelfettes vor.

Abgesehen von den bisher angeführten übereinstimmenden Befunden trifft man beim Vergleich der mit Dinitrophenol, Thyroxin und 1-Trijodthyronin behandelten Tiere aber auch auf Unterschiede in der Ultrastruktur des Herzmuskels. So zeigen die Mitochondrien nach Überdosierung von Thyroxin ganz charakteristische Veränderungen ihrer Innenmembranen oder Cristae mitochondriales: Das osmiophobe Spatium dieser Innenmembranen, das normalerweise etwa 50 Å breit ist, zeigt dicht nebeneinanderliegende, umschriebene Erweiterungen bzw. kugelige Auftreibungen auf etwa 100—150 Å Breite, so daß ein perlschnur- oder rosenkranzartiges Bild entsteht. Darüberhinaus sind die Innenmembranen meistens in sehr kleine Fragmente zerfallen. Die Fragmente enden meist in einer Auftreibung, und das Spatium ist an den Enden durch die osmiophile Membran verschlossen. Man kann also annehmen, daß die Fragmentation der Cristae durch Abschnürungen jeweils zwischen zwei kugeligen Auftreibungen zustande kommt. Diese Veränderung der Mitochondrienmembranen ist zwar auch beim Dinitrophenol und beim 1-Trijodthyronin festzustellen; sie ist hier aber wesentlich geringer ausgeprägt als beim Thyroxin. Augenfälligere Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen läßt das Sarkoplasmareticulum erkennen. Das endoplasmatische Reticulum (longitudinales System des Sarkoplasmareticulums) ist bei allen drei Versuchsgruppen deutlich erweitert oder geschwollen und kann teilweise sehr große Vacuolen bilden, am stärksten beim Thyroxin. Das transversale Tubulussystem ist nur beim 1-Trijodthyronin stärker erweitert. Man findet hier in Höhe der Z-Streifen stark erweiterte sog. Triaden; dagegen ist beim Thyroxin und beim Dinitrophenol nur eine sehr geringe oder gar keine Erweiterung des transversalen Tubulussystems festzustellen. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigen sich auch an den Myofibrillen. Während wir beim 1-Trijodthyronin so gut wie gar keine Kontrakturstreifen beobachten konnten, findet man beim Thyroxin vereinzelt und beim Dinitrophenol

häufig Herzmuskelzellen, die sich in Kontraktur befinden. Die Z-Abstände liegen bei der Ratte normalerweise je nach dem Kontraktionszustand zwischen 0,7 und 1,5 μ . Bei der Kontraktur nach Thyroxin betragen die Abstände der Kontrakturstreifen meistens 0,8 μ , bei der Kontraktur nach Dinitrophenol dagegen 0,4—0,8 μ . Besonders bei den Dinitrophenol-Ratten fällt weiterhin auf, daß die in Kontraktur befindlichen Herzmuskelzellen einerseits sehr starke Veränderungen — wie Aufhellung des Grundsarkoplasmas, Schwellung des endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien — aufweisen können, andererseits aber auch nur auffallend gering verändert sein können. Der Eintritt der Kontraktur hängt also nicht von dem Schweregrad der Veränderungen anderer Zellorganellen ab.

Dinitrophenol, Thyroxin und 1-Trijodthyronin zeigen auch in ihrem biochemischen Verhalten Unterschiede. So ist z. B. die Wirkungsdauer des Dinitrophenols bedeutend kürzer als die der Schilddrüsenhormone. Nach MARTIUS und HESS (1952) ist die entkoppelnde Wirkung des Schilddrüsenhormons von seiner Konzentration abhängig: Eine Entkoppelung tritt nur bei ausreichend hohen Konzentrationen ein; bei Konzentrationen von 10^{-6} mol und darunter kann Thyroxin die Atmungskettenphosphorylierung sogar steigern. Dinitrophenol dagegen wirkt bei jeder Konzentration ausschließlich entkoppelnd. BEYER, LÖW und ERNSTER (1956) sprechen deshalb beim Thyroxin nicht von einer Entkoppelung, sondern nur von einer Labilisierung der Oxydations-Phosphorylierungs-Multienzymsysteme. Ein weiterer Unterschied zwischen Thyroxin und Dinitrophenol besteht darin, daß sich eine durch Thyroxin bedingte Entkopplung durch Zusatz von Magnesium wieder aufheben läßt, eine durch Dinitrophenol bedingte Entkopplung aber nicht (TAPLEY und COOPER 1956). Thyroxin bringt im Gegensatz zu Dinitrophenol isolierte Mitochondrien zum Anschwellen, und auch dieser Effekt läßt sich durch Magnesiumzusatz unterbinden (TAPLEY, COOPER und LEHNINGER 1955). Schließlich sind auch Unterschiede zwischen der Wirkung von Thyroxin und der von 1-Trijodthyronin bekannt. Die Stoffwechselwirkung von 1-Trijodthyronin ist nach zahlreichen Forschern (GROSS und PITT-RIVERS 1953 u. a.) 3—5mal stärker als die des Thyroxins. Die entkoppelnde Wirkung ist aber wiederum beim Thyroxin etwas stärker als beim 1-Trijodthyronin (KLEMPERER 1955).

Vergleicht man die Ergebnisse der morphologischen und der biochemischen Untersuchungen, so stellt man übereinstimmend fest, daß Dinitrophenol, Thyroxin und 1-Trijodthyronin eine prinzipiell ähnliche Wirkung entfalten, sich aber nicht in allen Einzelheiten gleichen. Es wäre vielleicht etwas verfrüht, aus unseren elektronenmikroskopischen Befunden für alle die angeführten biochemischen Abweichungen ein morphologisches Substrat ablesen zu wollen. Trotzdem ist es reizvoll, zumindest einige Gegenüberstellungen von biochemischen Daten und morphologischen Befunden vorzunehmen. So sind beispielsweise die morphologischen Veränderungen beim Dinitrophenol im ganzen gesehen quantitativ am geringsten ausgebildet, andererseits treten hier aber Kontrakturen viel früher und häufiger auf als bei den Schilddrüsenhormonen. Dem entspricht, daß unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen die Stoffwechselwirkung des Dinitrophenols wohl stärker war als die des Thyroxins, daß die Einwirkungs-dauer des Thyroxins aber 14 Tage betrug gegenüber nur 30 min beim Dinitro-

phenol. Die größere Häufigkeit von Kontrakturen beim Dinitrophenol trifft mit der hier höheren Lactatkonzentration des Blutes zusammen. Nach TAPLEY und COOPER (1956) nehmen isolierte Mitochondrien unter Thyroxin Wasser auf; durch Dinitrophenol kann diese Wasseraufnahme verhindert werden. Nach den vorliegenden Untersuchungen waren die Mitochondrien unter Dinitrophenol weniger stark geschwollen als unter Thyroxin.

Bei unseren früheren Versuchen mit 1-Trijodthyronin betrug die Versuchsdauer 6—10 Tage. Im Gegensatz zum Dinitrophenol entsprach die Manifestationszeit also in etwa der beim Thyroxin. Um so bemerkenswerter ist es, daß sich auch hier gewisse Parallelen zwischen Biochemie und Morphologie aufzeigen lassen. Den oben erwähnten Angaben der Biochemiker, daß 1-Trijodthyronin den Stoffwechsel stärker steigere, Thyroxin aber stärker entkopple, stehen unsere Befunde gegenüber, nach denen beim 1-Trijodthyronin eine stärkere Schwellung des Sarkoplasmareticulums — besonders des transversalen Tubulussystems — eintritt, beim Thyroxin dagegen die perlschnurartige Membranschwellung und die Fragmentierung der Innenmembranen der Mitochondrien stärker ausgebildet ist.

Zusammenfassung

Bei erwachsenen weißen Ratten, die 14 Tage lang täglich eine subcutane Injektion von 1 mg/kg Thyroxin, und solchen, die 30 min vor Versuchsbeginn eine subcutane Injektion von 20 mg/kg Dinitrophenol erhalten hatten, waren der O_2 -Verbrauch und die Milchsäurekonzentration des Blutes stark erhöht. Lichtmikroskopisch zeigte der Herzmuskel bei beiden Versuchsgruppen Glykogenverlust und eine Homogenisierung einzelner Herzmuskelzellen. Elektronenmikroskopisch fanden sich — ebenso wie bei früheren Untersuchungen des Herzmuskels nach Überdosierung von 1-Trijodthyronin — anfänglich eine Aufhellung des Grundsarkoplasmas mit einer fortschreitenden Abnahme der etwa 150 Å messenden Cyto granula (Glykogen), dann eine leichte bis mittelgradige Schwellung der Mitochondrien, eine starke Schwellung des endoplasmatischen Reticulums (longitudinales System des Sarkoplasmareticulums) mit Vacuolenbildung und eine Vermehrung der Fetttropfen. Außerdem waren nach Dinitrophenol häufig stark kontrahierte Herzmuskelzellen mit Abständen der Kontrakturstreifen von 0,8—0,4 μ festzustellen, nach Thyroxin dagegen nur vereinzelt (Abstände durchschnittlich 0,8 μ). Nach Thyroxin zeigten die Mitochondrien charakteristische perlschnurartige Schwellungen der Innenmembranen mit umschriebenen Erweiterungen des osmiophoben Spatiums von 50 Å auf 100—150 Å und eine starke Fragmentation der Innenmembranen. Diese Veränderung war nach Dinitrophenol weniger deutlich und nach 1-Trijodthyronin wesentlich geringer ausgebildet. Nur nach 1-Trijodthyronin waren auch die transversalen Tubuli des Sarkoplasmareticulums (transversales Tubulussystem) erweitert.

Summary

These studies were carried out on two groups of adult albino rats. The animals of the first group received daily subcutaneous injections of 1 mg/kg of thyroxine for two weeks; those of the second were given a subcutaneous injection of 20 mg/kg dinitrophenol 30 minutes before the experiments were started. In

both groups the O_2 consumption and the concentration of the lactic acid of the blood were increased. Light microscopic studies in both groups showed a loss of glycogen in the cardiac muscle and a homogenization of few individual myocardial cells. Electron-microscopically, some changes resembled those described earlier following an overdosage of 1-tri-iodothyronine: initially there was a clearing of the ground sarcoplasm with a progressive decrease of the cytogranules (glycogen), which measured about 150 \AA ; a moderate swelling of the mitochondria; a severe swelling of the endoplasmic reticulum (longitudinal system of the sarcoplasmic reticulum) with the formation of vacuoles; and an increase in fat droplets. Furthermore following dinitrophenol, contracted myocardial cells were frequently found. The intervals between the Z-lines of these contracted cells were from 0.8 to 0.4μ . In contrast, after thyroxine the contracted muscle cells were rare and the intervals between their Z-lines measured on the average 0.8μ . The mitochondria after thyroxin characteristically showed bead-like swellings of their membranes with distinct widening of the osmiphobic spaces of the inner membranes from their normal 50 \AA to $100\text{--}150 \text{ \AA}$, and a severe fragmentation of their inner membranes. These changes after dinitrophenol were less obvious, and after 1-tri-iodothyronine considerably less developed. Enlargement of the transverse tubuli of the sarcoplasmic reticulum (transverse tubular system) occurred only after 1-tri-iodothyronine.

Literatur

- BEYER, R. E., H. LÖW and L. ERNSTER: The effect of thyroxine on mitochondrial stability. *Proc. Norwegian Biochem. Soc., Oslo* **1956**, 2—3.
- BRADY, T. M.: The uncoupling of oxidative phosphorylation as a mechanism of drug action. *Pharmacol. Rev.* **7**, 335—363 (1955).
- DENGLER, H. J.: Die Wirkung des Thyroxins auf die Aufnahme und den Stoffwechsel der Katecholamine des Herzens. *Verh. dtsh. Ges. Kreisl.-Forsch.* **27**, 252—256 (1961).
- FUHRMAN, F. A., and J. FIELD: Effect of 2,4-dinitrophenol on rat brain respiration at 25 and 37.5°C . *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **49**, 504—507 (1942).
- GROSS, J., and R. PITT-RIVERS: 3,5,3'-Triiodothyronine. I. Isolation from thyroid gland and synthesis. *Biochem. J.* **53**, 645—650 (1953).
- — 3,5,3'-Triiodothyronine. II. Physiological activity. *Biochem. J.* **53**, 652—657 (1953).
- HALL, V. E., J. FIELD, M. SAHYUN, W. C. CUTTING and M. L. TAINTER: Carbohydrate metabolism, respiration and circulation in animals with basal metabolism heightened by dinitrophenol. *Amer. J. Physiol.* **106**, 432—440 (1933).
- HEIMBERG, M., J. H. PARK, A. ISAACS and R. PITT-RIVERS: The effects of the acetic acid analogs of thyroxine and triiodothyronine in glycolysis in ascites tumor cells in vitro. *Endocrinology* **57**, 756—758 (1955).
- KLEMPERER, H. G.: The uncoupling of oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria by thyroxine, triiodothyronine and related substances. *Biochem. J.* **60**, 122—128 (1955).
- LARDY, H. A., and P. H. PHILLIPS: The effect of thyroxine and dinitrophenol on sperm metabolism. *J. biol. Chem.* **149**, 177—182 (1943).
- LINDNER, E., u. H.-J. WELLENSTEK: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Langendorff-Herzen unter normalen und abnormen Bedingungen. *Verh. IV. Internat. Kongr. Elektronenmikroskopie*, II, S. 326—327, Berlin 1958.
- LOCHNER, W., u. M. NASSERI: Untersuchungen über den Herzstoffwechsel und die Coronardurchblutung, insbesondere bei Dinitrophenolvergiftung. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 405—419 (1960).
- LOOMIS, W. F., and F. LIPMAN: Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J. biol. Chem.* **173**, 807—808 (1948).

- MARTIUS, C.: Thyroxin und oxydative Phosphorylierung. *Conférences et Rapports, 3. Congr. internat. de Biochimie, Bruxelles, 1.—6. Août 1955, S. 1—9, Liège 1956.*
- Die oxydative Phosphorylierung und ihre hormonale Steuerung. *Klin. Wschr.* **1957**, 223—225.
- , and B. HESS: The mode of action of thyroxine. *Arch. Biochem.* **33**, 486—487 (1951).
- — Über den Wirkungsmechanismus des Schilddrüsenhormons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **216**, 45—46 (1952).
- MELROSE, D. R., and C. TERNER: The influence of 2:4-dinitrophenol on the Pasteur-effect in bull spermatozoa. *Biochem. J.* **49**, I—II (1951).
- PARKER, V. H.: In vivo inhibition of oxidative phosphorylation of rat-liver mitochondria by 2,4-dinitrophenol. *Nature (Lond.)* **178**, 261 (1956).
- PFELEGER, K., W. RUMMEL u. H. JACOBY: Phosphatdurchtritt am isolierten Darm unter Dinitrophenol und Thyroxin. *Biochem. Z.* **330**, 303—309 (1958).
- — E. SEIFEN u. U. TIMP: Der Einfluß von Thyroxin und Dinitrophenol auf die Laktatkonzentration des Blutes. *Med. exp.* **1**, 160—165 (1959).
- POCHE, R.: Das submikroskopische Bild der Herzmuskelveränderungen nach Überdosierung von Schilddrüsenhormon. *Beitr. path. Anat.* **118**, 407—420 (1957).
- Submikroskopischer Beitrag zur Pathologie des Herzmuskels. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **41**, 351—355 (1958a).
- Submikroskopische Beiträge zur Pathologie der Herzmuskelzelle bei Phosphorvergiftung, Hypertrophie, Atrophie und Kaliummangel. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 165—248 (1958b).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Herzmuskels vom Siebenschläfer während des aktiven und des lethargischen Zustandes. *Z. Zellforsch.* **50**, 332—360 (1959).
- Zur submikroskopischen Morphologie der Herzmuskelverfettung. *Klin. Wschr.* **1960**, 246—247.
- , u. W. LOCHNER: Stoffwechsel und Ultrastruktur des Herzmuskels vom Hund bei akuter Dinitrophenolvergiftung. (Im Druck.)
- SCHULZ, H., H. LÖW, L. ERNSTER u. F. S. SJSÖSTRAND: Elektronenmikroskopische Studien an Leberschnitten von Thyroxin-behandelten Ratten. *Electron-Microscopy. Proc. Stockholm Conf. 1956, S. 134—137.* Stockholm: Almqvist & Wiksell 1957.
- SIMON, E. W.: Mechanisms of dinitrophenol toxicity. *Biol. Rev.* **28**, 453—479 (1953).
- TAPLEY, D. F., and C. COOPER: Effect of thyroxine on the swelling of mitochondria isolated from various tissues of the rat. *Nature (Lond.)* **178**, 1119 (1956).
- — and A. L. LEHNINGER: The action of thyroxine on mitochondria and oxidative phosphorylation. *Biochim. biophys. Acta* **18**, 597—598 (1955).
- TYLER, D. B.: Some factors affecting the action of dinitrophenol on the oxygen uptake of excised rat brain. *J. biol. Chem.* **184**, 711—718 (1950).

Priv.-Doz. Dr. med. REINHARD POCHE,
Oberarzt des Pathologischen Institutes der Medizinischen Akademie,
Düsseldorf, Moorenstr. 5