

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

## Fermenthistochemische Frühveränderungen beim experimentellen Herzinfarkt

Von

ARNO HECHT

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Oktober 1963)

Früher von uns durchgeführte Untersuchungen zum Nachweis der Succinoxidase (SDH) beim experimentellen Herzinfarkt der Ratte (HECHT, KORB u. DAVID) haben uns veranlaßt, diese Versuche auch auf die Darstellung weiterer dehydrierender Enzyme auszudehnen. Weiterhin konnten wir nur vereinzelt Angaben über das Verhalten der Cytochromoxydase (KAUFMAN u. Mitarb., BURSTONE u. MILLER), der alkalischen Phosphatase (KENT u. DISEKER, YOKOYAMA u. Mitarb., KAUFMAN u. Mitarb.), der Adenosinmonophosphatase (CAIN u. ASSMANN) und der Adenosintriphosphatase finden. Es erschien uns daher lohnenswert, auch den Nachweis dieser Enzyme, insbesondere der Adenosintriphosphatase, zu berücksichtigen sowie das Verhalten weiterer spezifischer und unspezifischer Phosphatasen und der unspezifischen Esterasen unter den Bedingungen des Infarktes zu untersuchen.

### Methodik

Unsere Untersuchungen führten wir an der Ratte durch, wobei wir entsprechend unseren früheren Veröffentlichungen den Infarkt nach der Methode von HEMBURGER und JOHNS u. OLSON durch Unterbindung der linken Herzkranzarterie hervorriefen. Die Tiere wurden zwischen  $1\frac{1}{2}$  Std und 309 Tagen nach der Ligatur getötet. In der vorliegenden Veröffentlichung sollen insbesondere die Ergebnisse der ersten 6 Tage Berücksichtigung finden.

Die histochemischen Reaktionen führten wir an Schnitten von  $12,5\mu$  Dicke durch, die nach dem Messertiefkühlverfahren gewonnen wurden. Zur Darstellung gelangten die Succinoxidase (SDH), die beiden Diaphorasen (DPND und TPND), eine Reihe NAD- und NADP-abhängiger Dehydrogenasen, die Monoaminoxidase (MAO) sowie spezifische und unspezifische Phosphatasen und N-Esterasen. Außerdem erfolgte ein Nachweis der SH-Gruppen.

Beim Nachweis der Dehydrogenasen (Lactatdehydrogenase, NAD- und NADP-abhängige Isocitronensäuredehydrogenase sowie Glycerophosphatdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glutaminsäuredehydrogenase) folgten wir den Angaben von SCARPELLI u. Mitarb. sowie HESS u. Mitarb. Lediglich benutzten wir in allen Fällen NBT als Wasserstoff-acceptor in einer Endkonzentration (EK) von 0,25 mg/ml. Die Substrate kamen in einer EK von 0,1 m in den Ansatz. Die EK von NAD bzw. NADP war 0,00125 m. Die Inkubationszeiten betrugen 20—30 min. Zur Kontrolle erfolgte eine Inkubation von Schnitten mit NAD bzw. NADP ohne Substrat zwecks Erfassung der sog. „nothing dehydrogenase“ (ZIMMERMANN u. PEARSE, ZIMMERMANN, SCHREIBER u. SIMON).

Der Nachweis der SDH erfolgte nach der Methode von NACHLAS u. Mitarb. Mit Tetrazolpurpur (TP) als Indicator verfahren wir nach den Angaben von SELIGMAN u. RUTENBERG. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Die Kontrolle erfolgte durch Inkubation der Schnitte ohne Zugabe von Substrat.

Der Nachweis der MAO erfolgte nach GLENNER u. Mitarb. mit Tryptaminhydrochlorid in einer EK von 1,25 mg/ml.

Den Nachweis der Cytochromoxydase führten wir einmal mit der Nadi-Reaktion (GRÄFF) sowie nach BURSTONE mit N-phenyl-p-phenyldiamin und Naphthol-AS-L 3-G durch.

Beim Nachweis der Phosphatasen verfahren wir bei pH 9,4 nach PADYKULA u. HERMAN und bei pH 7,5 nach PEARSE u. REIS. Als Substrat fanden jeweils Adenosinmonophosphat, Adenosintriphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat Verwendung. Die Inkubationszeiten betrugen bei pH 9,4 15 und 120 min, bei pH 7,5 15 und 60 min. Bei der Durchführung dieser Reaktionen verwendeten wir neben unfixierten Schnitten solche, die 5 min in eiskaltem, neutralem 10%igem Formalin fixiert wurden mit anschließender Spülung von 2 $\frac{1}{2}$  min in fließendem Leitungswasser und gleich langer Behandlung in Puffer.

Der Nachweis der FDPase erfolgte bei pH 7,5 und der der unspezifischen alkalischen Phosphatase (APase) bei pH 9,4 nach GOMORI.

Die saure Phosphatase (SPase) wurde nach DEANE u. Mitarb. nachgewiesen, die saure Naphthol-Phosphatase (SNPase), alkalische Naphthol-Phosphatase (ANPase) und Naphthol-Esterasen (N-Esterasen) nach GÖSSNER.

Beim Nachweis der SH-Gruppen verfahren wir nach der Methode von BENNETT mit RSR-Reagens, wobei sich eine Gegenfärbung mit Toluidinblau als sehr günstig erwies.

### Ergebnisse

Den Ablauf der quantitativen enzymatischen Veränderungen haben wir in der Tabelle zusammengefaßt. Dabei repräsentieren die angegebenen Kreuzchen keine absoluten Werte, sondern sie sollen nur das relative Verhalten der Enzymaktivität charakterisieren. Ergänzend zu dieser Tabelle ist folgendes hervorzuheben:

Tabelle. Das Verhalten der relativen Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Infarktdauer

Enzyme	Infarktdauer							
	0	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h	72 h	6 Tage
Dehydrogenasen . . . . .	++++	++++	++++	+++	++	++	+	—
SDH-TP . . . . .	++	++++	+++	++	—	—	—	—
MAO . . . . .	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Cytochromoxydase (BURSTONE) . . . . .	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Cytochromoxydase (NADI) ATPase	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
pH 7,5 (mitochondrial) ATPase	+++	+++++	+++++	+++++	++	+	+	+
pH 9,4 (myofibrillär) .	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
FDPase fixiert . . . . .	+++	+	+	+	+	+	+	+
FDPase unfixiert . . . . .	+++	++++	++++	+++	+	+	+	+
AMPase . . . . .	+++	+	+	—	—	—	—	—
APase . . . . .	++++	++++	++	+	—	—	—	—
ANPase (Capillare) . . .	++	++	++	++	++	++	++	++
SPase . . . . .	+++	+++	++	+++	+	—	—	—
SNPase . . . . .	—	—	—	+	—	—	—	—
Esterasen . . . . .	+++	+++(+)	++++	++++	++++	++++	++++	++
SH-Gruppen . . . . .	++	++	++	+	+	+	+	+

**1. Oxydative Enzyme.** Die ersten, wenn auch geringfügigen Veränderungen ließen sich bei der SDH, DPND und TPND sowie den NAD- und NADP-abhängigen Dehydrogenasen bereits nach einstündiger Coronarligatur feststellen. Diese bestehen darin, daß es im Infarkttrandgebiet zur Ausbildung einer 3—4 muskelfaserbreiten Zone kommt, in der grobe, intensiv blau gefärbte Formazangranula

auftreten. Im Infarkt selber und auch in der übrigen Muskulatur zeigen die Formazangranula eine unverändert normale Beschaffenheit. Diese Zone der blauen Granula verbreitert sich mit zunehmender Infarktdauer und erreicht nach 12 Std ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt weist fast die gesamte übrige Muskulatur des linken Ventrikels, außer dem eigentlichen Infarktgebiet, ein derartig verändertes grobkörniges Reaktionsprodukt auf. Nach 20 Std erkennt man diese Granula nur noch in einem schmalen Saum der normalen Muskulatur im Randgebiet des Infarktes.

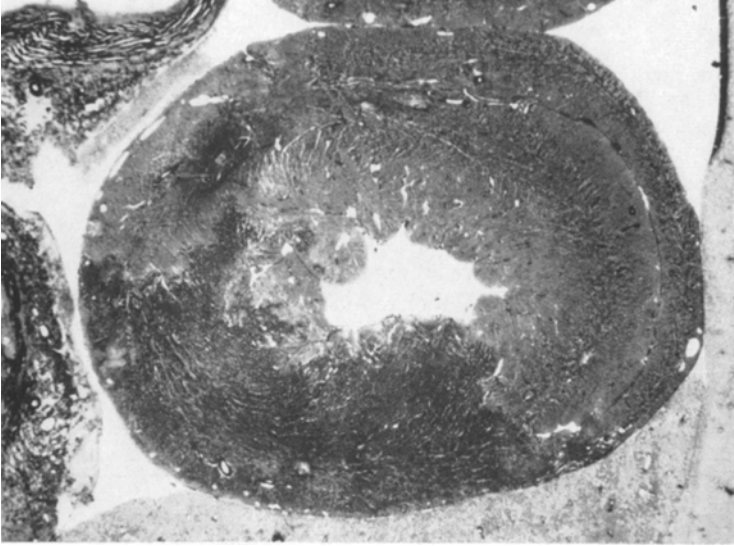


Abb. 1. Infarktdauer 1 Std, ATPase pH 7,5 fixiert. Deutlich erhöhte Fermentaktivität im Infarktgebiet. Vergr. 9:1

Die quantitativen Veränderungen sind im einzelnen der Tabelle zu entnehmen. Wir möchten nur zwei Tatsachen hervorheben. Die eine besteht darin, daß beim Nachweis der SDH mit TP eine veränderte Enzymaktivität früher zu beobachten ist als mit NBT. Außerdem ist die Feststellung von Interesse, daß bei der Verwendung von TP als Wasserstoffacceptor bereits nach 24 Std im Infarktgebiet keine Aktivität vorhanden ist. Bei der Anwendung von NBT ist jedoch erst nach 4—6 Tagen ein vollständiger Aktivitätsverlust zu beobachten.

Vielfach, jedoch nicht in allen Fällen, fällt neben der Zone der blauen Granula und dem eigentlichen Infarktgebiet ein Abschnitt auf, in dem die Muskelfasern eine herdförmig verstärkte Aktivität mit dazwischenliegenden Zonen einer zum Teil völlig geschwundenen Enzymaktivität aufweisen. Dieser Befund ist besonders ausgeprägt in den Fällen, in denen es infolge fehlerhafter Ligatur nur zur Ausbildung kleiner Nekrosen gekommen ist. Diese weisen insgesamt ein derartiges Bild auf und lassen einen viel rascheren Schwund der Enzymaktivität erkennen als der Infarkt.

Alle diese vorstehend beschriebenen Befunde gelten für die nachgewiesenen Dehydrogenasen in gleicher Weise, und es bestehen zwischen ihnen keine Unterschiede im quantitativen und qualitativen Verhalten.

Bezüglich der Verhaltensweise der Cytochromoxydase und der MAO verweisen wir auf die Tabelle.

**2. Spezifische und unspezifische Phosphatasen.** Wesentlich eindrucksvoller als die Befunde beim Nachweis der oxydativen Enzyme sind die Ergebnisse bei der Darstellung spezifischer Phosphatasen. Die Veränderungen zeichnen sich bereits nach  $\frac{1}{2}$  Std ab und sind nach 1 Std voll ausgeprägt. Hierbei ergibt sich ein unterschiedliches Verhalten zwischen fixierten und unfixierten Schnitten.

Die ATPase pH 7,5 weist an unfixierten Schnitten eine unveränderte bzw. leicht verminderte Aktivität auf. Dieser steht nach Fixierung eine erheblich ge-

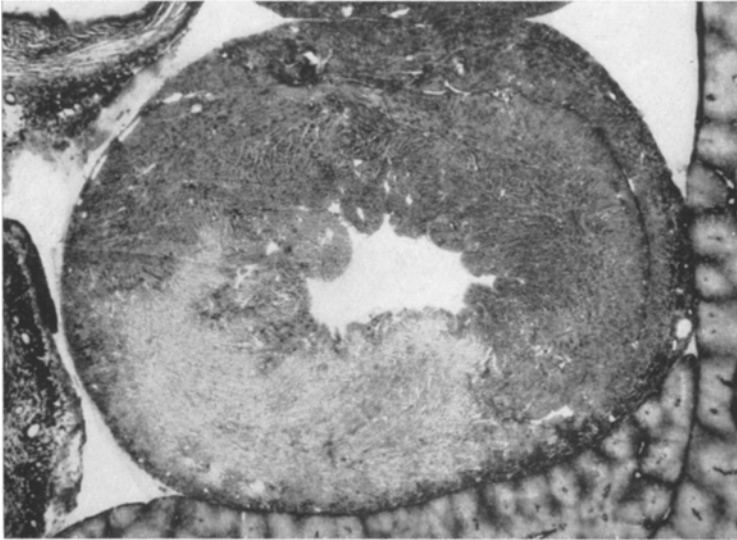


Abb. 2. Infarktdauer 1 Std, AMPase pH 7,5 unfixiert. Erheblich abgeschwächte Aktivität im Infarktbereich. Vergr. 9:1

steigerte Reaktion bei gleicher Infarktdauer gegenüber (Abb.1). Diese erhöhte Aktivität hält bis zu 6 Std unverändert an. Erst nach 12 Std ist bei pH 7,5 an den fixierten Schnitten eine Verminderung der ATPase Aktivität zu beobachten. Auch nach 6 Tagen ist noch eine geringe Aktivität sowohl an fixierten wie unfixierten Schnitten zu verzeichnen. Ein Nachweis gelingt in geringem Ausmaß so lange, wie noch nekrotische Muskelfasern vorhanden sind.

Die ATPase pH 9,4 zeigt an fixierten wie unfixierten Schnitten nur unwesentliche Befunde. Auffälligerweise bleibt die Aktivität der Infarktfasern gegenüber dem normalen Muskelgewebe im wesentlichen unverändert und schwindet erst mit dem völligen Abbau der Fasern.

Bei der AMPase pH 9,4 bestehen keine Unterschiede im Verhalten zur APase. Der Vergleich mit Glycerophosphat als Substrat unter sonst gleichen Bedingungen zeigt, daß das Reaktionsprodukt nicht das Ergebnis der Wirkungsweise einer spezifischen AMPase ist.

Bei einem pH von 7,5 dagegen läßt sich AMPase in den Herzmuskelfasern nachweisen. An fixierten wie auch unfixierten Schnitten ist bereits nach 1 Std eine erhebliche Aktivitätsabnahme zu erkennen (Abb. 2). Sie ist bereits nach 6 Std praktisch nicht mehr nachweisbar. Nur die Capillaren ergeben noch eine

positive Reaktion. Das entspricht den Befunden bei der ATPase. Auch sie stellt sich in der Media der arteriellen Gefäße im Infarkt unverändert dar.

Interessant sind weiterhin auch die Ergebnisse beim Nachweis der FDPase. Im Gegensatz zur ATPase pH 7,5 liegt hier nach Fixierung eine deutlich verminderte Enzymaktivität vor, während sie am unfixierten Schnitt gegenüber der normalen Muskulatur erhöht ist (Abb. 3). Diese erhöhte Aktivität hält in den ersten Stunden an, dann kommt es zu einem sehr raschen Enzymverlust, aber trotzdem ergeben die Fasern nach 6 Tagen immer noch eine leichte Schwärzung, allerdings nur an unfixierten Schnitten.

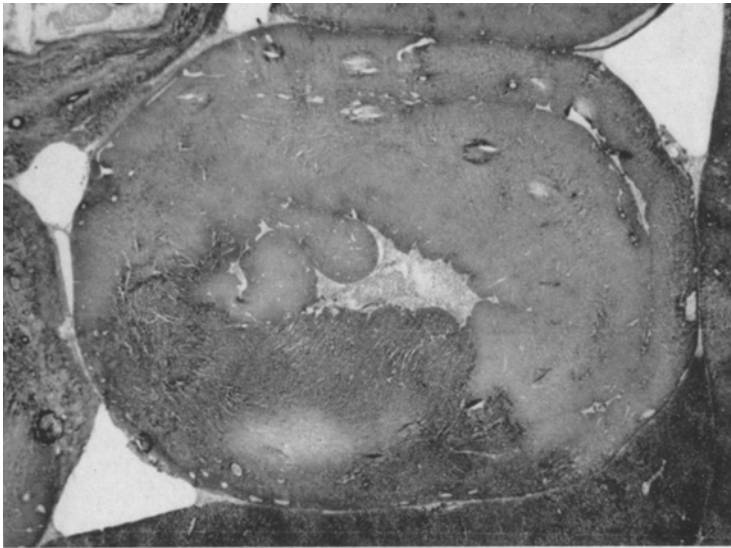


Abb. 3. Infarktdauer 1 Std, FDPase unfixiert. Steigerung der Fermentaktivität im Infarktgebiet. Vergr. 9:1

Die APase ist ebenfalls nach 3 Std schon deutlich vermindert und am unfixierten Schnitt nach 15 Std nicht mehr darstellbar. An fixierten Schnitten ist ein völliger Enzymverlust erst nach 24—36 Std zu beobachten.

Die SPase zeigt eine Abnahme der Aktivität nach 3 Std und ergibt nach 36 Std an den Infarktfasern keine positive Reaktion mehr. Die SNPase, die normalerweise im Herzmuskel nicht vorhanden ist, findet sich nach einer Infarktdauer von 6 Std in einem schmalen Saum der Muskulatur im Randgebiet. Die ANPase, die sich nur in den Capillaren nachweisen läßt, zeigt im gesamten Infarktverlauf keine Veränderungen.

**3. Esterasen.** Auffällig ist eine deutliche Aktivitätssteigerung in den geschädigten Fasern des Infarkttrandgebietes nach 1 Std und nach 2 Std im gesamten Infarktgebiet. Nach 8 Std hat sich eine Dreischichtung der Aktivität dergestalt herausgebildet, daß auf eine verstärkte Aktivität im Randgebiet eine Zone mit deutlich verminderter Aktivität folgt, während sich im eigentlichen Infarktgebiet eine erhöhte Aktivität nachweisen läßt. Diese bleibt zunächst erhalten. Erst nach 6 Tagen ist eine Abnahme der Esterasen zu bemerken, aber selbst nach 4 Wochen besteht in noch vorhandenen nekrotischen Fasern eine geringe Aktivität.

Die SH-Gruppen sind nach 6 Std vermindert. Im weiteren Verlauf nimmt die Abschwächung der Reaktion etwas zu. Der Nachweis der SH-Gruppen gelingt bis zum völligen Abbau der Muskelfasern im Infarktgebiet.

### Diskussion

Bei der Besprechung unserer Ergebnisse beschränken wir uns auf das Verhalten der dehydrierenden Enzyme und der spezifischen Phosphatasen, da die beim Nachweis der anderen Fermente festgestellten Veränderungen weitgehend bekannt sind und ihnen unsere Beobachtungen entsprechen.

Ein Vergleich unserer beim Nachweis dehydrierender Fermentsysteme gewonnenen Befunde mit den Angaben der Literatur (CAIN u. ASSMANN; GORNAK u. LUSHNIKOV; HECHT, KORB u. DAVID; KAUFMAN u. Mitarb.; KENT u. DISEKER; LUSHNIKOV; NACHLAS u. SHNITKA; WACHSTEIN u. MEISEL) zeigt übereinstimmend bei der Verwendung von NBT als Wasserstoffacceptor (GORNAK u. LUSHNIKOV; LUSHNIKOV, NACHLAS u. SHNITKA) eine Abnahme der Fermentaktivität im Infarkt nach 6—8 Std. Diese Feststellung ergab sich in gleicher Weise für alle von uns untersuchten Dehydrogenasen. Interessant ist, daß ein völliger Verlust der Dehydrogenasenaktivität erst nach 6 Tagen festzustellen ist. Dies würde etwa den Angaben von CAIN u. ASSMANN entsprechen. Dabei sind auch wir der Meinung, daß diese Aktivität nicht als Ausdruck eines geregelten Stoffwechselgeschehens zu bewerten ist, sondern als Zeichen der relativ großen Stabilität der Enzyme gegenüber äußeren Schädigungen. Das entspricht auch den Angaben von NACHLAS u. SHNITKA, die zeigten, daß die Aktivitätsabnahme in den ersten Stunden weniger auf eine Enzymschädigung als auf ein Fehlen der Substrate zurückzuführen ist. Erst später kommt es zu einer Aktivitätsminderung, die auf einer Veränderung der Enzyme selber beruht. Diese Tatsache einer noch vorhandenen Aktivität im Bereich der Infarktfasern wird auch durch die zusammen mit DAVID (DAVID u. HECHT) erhobenen elektronenmikroskopischen Befunde gestützt. Wir konnten zeigen, daß das Infarktgebiet nicht eine völlig strukturlose Masse darstellt, sondern daß man z.B. neben völlig zerstörten Mitochondrien auch solche sehen kann, die keine von der Norm abweichenden Befunde aufweisen.

Angaben über das Verhalten der ATPase, die nach Fixierung bei pH 7,5 einen deutlichen Aktivitätsanstieg im Infarkt aufweist, wie auch der SPase, SNPase und ANPase konnten wir in der Literatur nicht finden. Einzig WITTELS u. Mitarb. geben an, daß sich eine Verminderung der ATPase erst wesentlich später nachweisen läßt als der Glykogenschwund.

Neben diesen quantitativen Befunden sind vor allem auch die qualitativen von großem Interesse. Dazu gehören besonders die beim Dehydrogenasennachweis auftretenden großen blauen Formazangranula. Hierbei kann es sich nicht einfach um eine Lösung der Formazangranula in verfetteten Muskelfasern handeln, wie man auf den ersten Blick annehmen möchte. Zum Zeitpunkt des Auftretens der Granula ist überhaupt noch keine Verfettung nachweisbar. Zum anderen spricht dagegen auch das Auftreten in der übrigen Muskulatur, die ja zu keinem Zeitpunkt eine nachweisbare Verfettung erkennen läßt. Weiterhin ist von Bedeutung, daß diese qualitativ veränderten Granula zu keinem Zeitpunkt im Infarktgebiet selber nachweisbar sind. Bei der Deutung dieses Befundes

kommt neben der Löslichkeit in Fett eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran für das Tetrazoliumsalz in Frage (PEARSE). Weiterhin könnte es sich um rein funktionelle Veränderungen bezüglich der Enzymaktivität, entweder im Sinne einer Verminderung oder auch einer Steigerung, handeln. Den Faktor der Fettlöslichkeit glauben wir in diesem Falle vernachlässigen zu können. Auch eine alleinige Schädigung der Mitochondrienstruktur scheint uns für die Deutung nicht ausreichend. Diese weist ja zweifellos im Infarktgebiet die schwersten Veränderungen auf, und hier ist dieser Befund nie zu erheben. Zum anderen treten diese Befunde auch bei Enzymen auf, die nicht rein mitochondrialer Natur sind, wie z. B. bei der LDH. Wir nehmen vielmehr an, daß sowohl eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran als auch eine veränderte Funktion, wahrscheinlich im Sinne einer Aktivitätssteigerung, für dieses Phänomen verantwortlich zu machen sind. Auch LUSHNIKOV und GORNAK u. LUSHNIKOV deuten diese Granula im Sinne einer Aktivitätssteigerung. Zweifellos handelt es sich hierbei um den Ausdruck reversibler Störungen, wie unsere Befunde an älteren Infarkten zeigen, wo diese Granula wieder verschwunden sind. Die von den zuletzt genannten Autoren beobachtete Dreischichtung des Infarktes in Form eines Zentrums mit fehlender Aktivität, einer Zone mit verminderter Aktivität und daran anschließend einer solchen mit gesteigerter Aktivität konnten wir an unserem Material nicht bestätigen. Auch den von SHNITKA u. NACHLAS angegebenen Befund einer gesteigerten SDH-Aktivität im Infarktgebiet konnten wir nicht erheben. Diese Differenzen können auf die Wahl des Versuchstieres zurückzuführen sein. Die sowjetischen und amerikanischen Autoren haben mit Hunden gearbeitet, bei denen infolge stärkerer Kollateralentwicklung der Herzkranzgefäße die Möglichkeit einer stärkeren Einwirkung heterolytischer Faktoren eine Rolle spielt. Bei der Ratte, mit der wir arbeiteten, ist das nicht von so großer Bedeutung.

Die in vielen Fällen im Randgebiet zu beobachtenden Zonen mit abwechselnd herdförmig verstärkter und anschließend verminderter Aktivität der Muskelfasern entsprechen den Befunden von MARTIN u. HACKEL beim hämorrhagischen Schock. Man hat den Eindruck, als ob es sich hier um eine gesteigerte Aktivität in den zwischen den Glanzstreifen gelegenen Anteilen der Muskulatur handelt, während die unmittelbar an sie angrenzenden Abschnitte der Zelle eine verminderte Aktivität aufweisen.

Einer Diskussion bedürfen auch die Ergebnisse beim Nachweis der Phosphatasen, insbesondere der ATPase. Die an fixierten Schnitten schon nach 1 Std zu beobachtende Aktivitätssteigerung möchten wir als Folge der Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung auffassen. Diese tritt beim Sauerstoffmangel als eine der ersten schwerwiegenden Veränderungen im Zellstoffwechsel auf und ist bekanntermaßen mit einer Steigerung der mitochondrialen ATPase-Aktivität verknüpft. Dabei ergeben sich auch enge Wechselbeziehungen zwischen oxydativer Phosphorylierung, ATP-Bestand und Struktur der Mitochondrien (RAAFLAUB, SIEKEVITZ). Die Möglichkeit einer Erfassung der gesteigerten ATPase-Aktivität bei Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung mit histochemischen Methoden konnte auch VORBRODT nach Gabe von Dinitrophenol demonstrieren.

Die geringe Aktivitätsabnahme am unfixierten Schnitt kann wohl darauf zurückgeführt werden, daß es hier zu einem Austritt der ATPase aus den geschä-

digten Mitochondrien in die Inkubationslösung kommt. Aus Untersuchungen von LAZARUS u. BARDEN wissen wir, daß eine kurzfristige Fixierung eine bessere Darstellung der mitochondrialen ATPase ermöglicht, während es bei langer Fixierung zu einer fast völligen Hemmung dieses Enzyms kommt.

Im Gegensatz zu den eben geschilderten Befunden weist die ATPase pH 9,4, bei der es sich vorwiegend um die myofibrilläre ATPase handelt (PADYKULA u. GAUTHIER), keine oder nur ganz geringfügige Veränderungen auf. Selbst bei einer Infarktdauer von 14 Tagen stellt sie sich in den noch erhaltenen Fasern des Infarktgebietes unverändert dar. Dieses Verhalten findet seine Erklärung im elektronenmikroskopischen Befund, daß die dicken Myofibrillen des A-Bandes erhalten bleiben, die im wesentlichen für die Wirksamkeit der myofibrillären ATPase verantwortlich zu machen sind (BAILEY, SZENT-GYÖRGYI), während die dünnen Myofilamente frühzeitig zugrunde gehen (DAVID u. HECHT). Auch aus biochemischen Befunden (KAKO u. BING, BROWN u. Mitarb.) ist bekannt, daß die myofibrilläre ATPase eine relativ große Stabilität aufweist. Auch die geringgradige mit AMP und FDP als Substrat noch feststellbare Aktivität bei älteren Infarkten möchten wir auf die phosphat-abspaltende Aktivität der Myofibrillen zurückführen, die nicht streng auf das ATP beschränkt zu sein scheint.

Worauf der Effekt der gesteigerten FDPase-Aktivität und das unterschiedliche Verhalten an fixierten und unfixierten Schnitten zurückzuführen sind, können wir nicht befriedigend beantworten. Die gesteigerte Esterasenaktivität ist vielleicht dadurch erklärbar, daß es zu einer Freisetzung des strukturell gebundenen Enzyms kommt.

Der zeitliche Ablauf der fermenthistochemischen Befunde läßt den Schluß zu, daß es in der ersten Phase des Infarktes zu einer Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung mit einem Mangel an energiereichem Phosphat und raschem Glykogenverlust kommt. Die Schädigung der Enzyme des Citronensäurecyclus und der übrigen Dehydrogenasen tritt erst wesentlich später in Erscheinung. Das wird auch durch die Mitteilung von POCHE u. OHM unterstrichen, die beim ischämisch induzierten Herzstillstand keine Veränderungen der SDH sowie DPND und TPND feststellen konnten.

Inwieweit die erhobenen fermenthistochemischen Befunde reversibler Natur sind, läßt sich auf Grund unserer Befunde nicht sicher entscheiden. Doch unter Berücksichtigung entsprechender Untersuchungen nach temporärem Verschuß der Coronararterien (BLUMGART u. Mitarb., JENNINGS u. Mitarb.) müssen die unseren Befunden zugrunde liegenden Schädigungen des Zellstoffwechsels als irreversibel angesehen werden. Das schließt eine Funktionstüchtigkeit einzelner Enzyme nicht aus.

Unsere Ergebnisse unterstreichen, daß wir mit Hilfe fermenthistochemischer Untersuchungsmethoden durchaus in der Lage sind, Frühveränderungen im Stoffwechselgeschehen zu erfassen und dadurch die bei Anwendung gewöhnlicher licht-optischer Untersuchungsmethoden recht lange Manifestationszeit für Zellschädigungen erheblich zu verkürzen. Doch demonstrieren unsere Ergebnisse, vor allem am Beispiel der Beeinflussung des ATPase-Nachweises durch Fixierung, auch die Wichtigkeit der Beachtung methodischer Prinzipien bei der Darstellung von Enzymen.



### Zusammenfassung

Es wird über fermenthistochemische Befunde beim experimentellen Herzinfarkt berichtet. Dabei wird ein Überblick über den zeitlichen Ablauf der enzymatischen Veränderungen gegeben.

Als herausragender Befund ist einmal die qualitative Veränderung der Formazangranula beim Dehydrogenasennachweis zu bewerten. Dieser wird als Folge einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran und einer gesteigerten Aktivität gedeutet.

Von besonderem Interesse und bisher noch nicht beschrieben, ist die gesteigerte ATPase-Aktivität an fixierten Schnitten. Dieser Befund wird als eine Folge der Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung angesehen und beruht auf der Wirksamkeit der mitochondrialen ATPase.

Die bei pH 9,4 dargestellte myofibrilläre ATPase zeigt nur geringfügige Veränderungen. Ihre Aktivität bleibt erhalten, solange die dicken Myosinfilamente der Myofibrille als Träger der ATPase-Eigenschaft nachzuweisen sind.

### Early Histochemical Changes of Enzymes in Experimental Cardiac Infarcts

#### Summary

The results of histochemical studies of enzymes in experimental cardiac infarction are reported, and include as well a survey of the enzymatic changes occurring with time.

As a prominent finding thereby is the qualitative change of the formazan granules in the demonstration of dehydrogenase; this change is interpreted as resulting from an increased permeability of the mitochondrial membrane and an enhanced activity.

Of special interest is the increased ATPase activity in fixed sections. This increased activity until now has not been described. This result is looked upon as a consequence of uncoupling of the oxidative phosphorylation; it depends on the activity of the mitochondrial ATPase.

The myofibrillary ATPase demonstrated at pH 9.4 shows only minimal changes. Its activity remains intact as long as the thick filaments of myosin of the myofibrils are demonstrable as carriers of the ATPase property.

### Literatur

- BAILEY, K.: Myosin and adenosintriphosphatase. *Biochem. J.* **36**, 121—139 (1942).  
 BENNETT, H. S.: The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulfhydryl reagent. *Anat. Rec.* **110**, 231—247 (1951).  
 BLUMGART, H. L., D. R. GILLIGAN, and M. J. SCHLESINGER: Experimental studies on the effect of temporary occlusion of coronary arteries. II. The production of myocardial infarction. *Amer. Heart J.* **22**, 374—389 (1941).  
 BROWN, A., A. ARAS, and G. M. HASS: Method for isolation of large quantities of human and canine cardiac myofibrils. *J. biol. Chem.* **234**, 438—440 (1959).  
 BURSTONE, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112—122 (1959).  
 —, and F. N. MILLER: Histochemical demonstration of changes in cytochrome oxidase activity in human myocardial infarction. *Amer. J. clin. Path.* **35**, 118—121 (1961).  
 CAIN, H., u. W. ASSMANN: Fermentgeschehen bei koronariellen Durchblutungsstörungen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **43**, 196—198 (1959).

- DAVID, H., u. A. HECHT: Elektronenmikroskopische Befunde an den Herzmuskelzellen der Ratte in späteren Stadien des experimentellen Herzinfarktes. *Z. ges. inn. Med.* **18**, 351—357 (1963).
- DEANE, H. W., R. J. BARNETT u. A. M. SELIGMAN: *Handbuch der Histochemie*, Bd. VII/1, S. 195. Stuttgart: Gustav Fischer 1960.
- GLENNER, G. G., H. J. BURTNER, and G. W. BROWN: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 591—600 (1957).
- GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958).
- GORNAK, K., u. E. F. LUSHNIKOV: Histochemische Untersuchung des experimentellen Herzinfarktes bei Hunden. *Arkh. Pat.* **25**, 14—24 (1963).
- HEIMBURGER, R. F.: Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch. Surg.* **52**, 677—689 (1946).
- GRÄFF, S.: Eine Anweisung zur Herstellung von Dauerpräparaten bei Anwendung der Naphthol-blauoxydasereaktion mit einigen Bemerkungen zur Theorie und Technik der Reaktion. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **27**, 313—318 (1916).
- HECHT, A., G. KORB, u. H. DAVID: Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 267—284 (1961).
- HESS, R., G. SCARPELLI, and A. G. E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 753—760 (1958).
- JENNINGS, R. B., H. M. SOMMERS, G. A. SMYTH, H. A. FLACK, and H. LINN: Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Path.* **70**, 68—78 (1960).
- JOHNS, T. N. P., and B. J. OLSON: Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* **140**, 675—682 (1954).
- KAKO, K., and R. J. BING: Contractility of actomyosin bands prepared from normal and failing human hearts. *J. clin. Invest.* **37**, 465—470 (1958).
- KAUFMAN, N., T. L. GAVAN, and R. W. HILL: Experimental myocardial infarction in the rat. *Arch. Path.* **67**, 482—488 (1959).
- KENT, S. P., and M. DISEKER: Early myocardial ischemia. Study of histochemical changes in dog. *Lab. Invest.* **4**, 398—405 (1955).
- LAZARUS, S. S., and H. BARDEN: Histochemistry and electron microscopy of mitochondrial adenosinetriphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 285—293 (1962).
- LUSHNIKOV, E. F.: Experimentelle histochemische Untersuchung des Myokardinfarktes. *Arkh. Pat.* **24**, 55—62 (1962).
- MARTIN, A. M., and D. B. HACKEL: The myocardium of the dog in hemorrhagic shock. A histochemical study. *Lab. Invest.* **12**, 77—91 (1963).
- NACHLAS, M. M., and T. K. SHNITKA: Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Amer. J. Path.* **42**, 379—405 (1963).
- K. C. TSOU, E. DE SOUZA, C. S. CHENG, and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957).
- PADYKULA, H. A., and G. F. GAUTHIER: Cytochemical studies of adenosine triphosphatase in skeletal muscle fibres. *J. Cell Biol.* **18**, 87—107 (1963).
- , and E. HERMAN: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 170—195 (1955).
- PEARSE, A. G. E.: Extension of the limits of cellular pathology: The role of enzyme histochemistry. *J. clin. Path.* **11**, 520—534 (1958).
- , and J. L. REIS: The histochemical demonstration of a specific phosphatase (5-Nucleotidase). *Biochem. J.* **50**, 534—536 (1952).
- POCHE, R., u. H. G. OHM: Lichtmikroskopische, histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Herzmuskels vom Menschen nach induziertem Herzstillstand. *Arch. Kreisl.-Forsch.* **41**, 86—135 (1963).

- RAAFLAUB, J.: Über den Wirkungsmechanismus von Adenosintriphosphat (ATP) als Cofaktor isolierter Mitochondrien. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **11**, 157—165 (1953).
- SCARPELLI, G., R. HESS, and A. G. E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 747—752 (1958).
- SCHREIBER, G., u. H. SIMON: Beitrag zur Technik des histotopochemischen Dehydrogenasen-Nachweises. *Acta histochem. (Jena)* **15**, 192—193 (1963).
- SELIGMAN, A. M., and A. M. RUTENBERG: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* **113**, 317—320 (1951).
- SHNITKA, T. K., and M. M. NACHLAS: Histochemical alterations in ischemic heart muscle and early myocardial infarction. *Amer. J. Path.* **42**, 507—527 (1963).
- SIEKEVITZ, P.: Oxidative phosphorylation in muscle mitochondria and its possible regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **72**, 500—514 (1959).
- SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch. Biochem.* **42**, 305—320 (1953).
- VORBRODT, A.: The effect of some inhibitors of oxidative phosphorylation on the histochemically demonstrable phosphatases. *Exp. Cell Res.* **12**, 154—162 (1957).
- 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.* **31**, 353—365 (1955).
- WITTELS, B. J., L. REINER, and H. A. FRANK: Influence of anoxia and muscular contraction upon myocardial glycogen in the rat. *Arch. Path.* **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.* **59**, 347—354 (1955).
- ZIMMERMANN, H.: Kritisches zur histochemischen Darstellung Pyridinnukleotid-gebundener Dehydrogenasen. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **2**, 164—174 (1961).
- , and A. G. E. PEARSE: Limitation in the histochemical demonstration of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases ("nothing dehydrogenase"). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 271—275 (1959).

Dozent Dr. ARNO HECHT,  
Pathologisches Institut der Humboldt-Universität,  
Berlin N 4, Schumannstr. 20/21