

Aus dem Pharmakologischen Institut und der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie
der Freien Universität Berlin

Mitochondrienstruktur und Atmungskettenphosphorylierung im Herzmuskel nach vollständiger Kreislaufunterbrechung*

Von

JÜRGEN WEDELL **, HANS-JOACHIM MERKER und DIETHER NEUBERT

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. August 1964)

Die operative Korrektur komplizierter Herzfehler macht es in vielen Fällen notwendig, das Herz bis zu 2 Std völlig stillzulegen. Es ist dabei von lebenswichtiger Bedeutung, die Dauer einer Ischämie zeitlich so zu begrenzen, daß noch keine wesentlichen irreversiblen Funktionsausfälle am Herzmuskel auftreten. Nur in diesem Falle kann nach Beendigung der Ischämie auch mit einer raschen Wiederkehr aller Funktionen gerechnet werden.

Seit den Untersuchungen BÜCHNERS und seiner Mitarbeiter über die Coronarinsuffizienz wissen wir, welche irreversiblen Schäden am Herzmuskel nach einem akuten oder chronischen Sauerstoffmangel entstehen können. Am *ischämisch stillgelegten* Herzen fanden HIBBS et al.; LÖHR, MEESSEN und POCHE; HÖLSCHER, JUST und MERKER; HÖLSCHER sowie POCHE und OHM elektronenmikroskopisch nachweisbare Veränderungen vor allem an der Mitochondrienstruktur in Form von Schwellung und gleichzeitigem Verlust der Innenstruktur. Die Enzyme der Atmungskettenphosphorylierung sind in der Struktur der Mitochondrien fest verankert; unter aeroben Bedingungen gewinnt der Herzmuskel auf dem Wege über dieses Multienzymsystem seine Energie in Form von ATP. Darum muß damit gerechnet werden, daß die beobachtete Schädigung der mitochondrialen Struktur gleichzeitig auch diese lebensnotwendigen enzymatischen Vorgänge in Mitleidenschaft zieht. Die Entwicklung entsprechender Methoden zur Isolierung von Zellpartikeln aus den Geweben gibt uns heute die Möglichkeit, Mitochondrien aus dem Herzmuskel für Stoffwechseluntersuchungen zu gewinnen, so daß eine Untersuchung der Beziehung zwischen ihrer Ultrastruktur und Funktion durchgeführt werden kann.

Wir haben durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Herzmuskelstruktur sowie durch biochemische Analyse einiger mitochondrialer Funktionen (Elektronentransport durch die Atmungskette und oxydative Phosphorylierung) im Verlaufe einer kompletten Ischämie des Herzmuskels geprüft, über welchen Zeitraum eine solche Belastung ohne morphologische oder funktionelle Schäden des mitochondrialen Systems toleriert werden kann. Es war weiterhin von Interesse zu wissen, in welchem Maße sich durch eine Temperatursenkung das Auftreten etwaiger morphologischer und funktioneller Schäden hinauszögern läßt.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Jetzt Chirurgische Universitätsklinik Kiel.

Darüber hinaus liefert diese Arbeit einen Beitrag zur Klärung der recht widerspruchsvollen Ansichten über die Verwendung autoptischen Materials für elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen.

Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche an 68 Kaninchen ausgewertet. Die Herzen wurden sofort nach dem Ausbluten der Tiere entnommen und in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach Homogenisieren des Gewebes in 0,25 M Saccharose + 0,5 mM EDTA-Lösung durch Differentialzentrifugation. Alle Operationen wurden bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen für die biochemischen Messungen sind bei den einzelnen Abbildungen und Tabellen angegeben. Die aus normalen Herzen isolierten Mitochondrien-Fractionen enthielten — wie entsprechende elektronenmikroskopische Befunde ergaben — keine nennenswerten Verunreinigungen mit anderen Zellbestandteilen.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die isolierten Mitochondrien in einer gepufferten (pH 7,4) Formaldehyd-Lösung fixiert, mit Kochsalzlösung gewaschen und mit 2%iger ungepuffelter OsO_4 -Lösung nachfixiert. Nach Dehydratation in der Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in eine Mischung von Butyl- und Methylmethacrylat.

Die Gewebestücke wurden nach entsprechenden Zeiten sofort in 1%iger gepufferter (pH 7,4) OsO_4 -Lösung fixiert und nach Entwässerung in Aceton in Vestopal W eingebettet. Schnitte: LKB-Ultratom und Servall-Mikrotom. Aufnahmen: Siemens-Elmiskop I bei einer Strahlspannung von 80 kV.

Ergebnisse und Diskussion

I. Struktur und mitochondriale Funktion der normalen Herzmuskelzelle

Vergleicht man die aus einem Herzmuskel isolierten Mitochondrien mit den entsprechenden Partikeln im Zellverband, so ergibt sich hinsichtlich ihrer Struktur kein wesentlicher Unterschied. Die isolierte Mitochondrien-Fraktion ist sauber und einheitlich, die Mitochondrien selbst sind kaum geschwollen, die äußere Doppelmembran allseitig vollständig und die Matrix gleichmäßig dicht.

Mit der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen relativ intakten Struktur dieser isolierten Partikel geht parallel die Unversehrtheit ihrer Funktion. So ergibt die Prüfung der Atmung und der ATP-Synthese durch oxydative Phosphorylierung mit α -Ketoglutarat als Substrat einen P/O-Quotienten von 3,1—3,6, entsprechend einem heute angenommenen Maximalwert von 4. Durch Zusatz von Malonat wird eine definierte enzymatische Einstufenreaktion des Tricarbonsäurecyclus infolge Hemmung der anschließenden Succinatoxydation erreicht. Die α -Ketoglutaratoxydation hat den Vorteil eines recht komplexen Vorganges, da gleichzeitig mit einer Atmungskettenphosphorylierung auch noch eine Substratphosphorylierung verbunden ist. Die Angriffsmöglichkeiten für eine Schädigung sind deshalb besonders groß.

Die Tabelle 1 gibt die unter unseren Versuchsbedingungen gefundenen Normalwerte auch für die Oxydation von β -Oxybutyrat (BOH) und Succinat wieder, aus Tabelle 2 sind entsprechende Werte für die Atmungskontrolle ersichtlich.

II. Mitochondriale Struktur und Funktion der Kaninchen-Herzmuskelzelle nach kompletter Kreislaufunterbrechung bei 37°

1. Nach 15 min: 15 min nach Beginn der Ischämie entsprechen alle untersuchten Parameter vollkommen der Norm. Dies gilt sowohl für die elektronenmikroskopischen Bilder des Gewebes und der isolierten Mitochondrien als auch

für die biochemischen Größen wie Atmung, Atmungskettenphosphorylierung und Atmungskontrolle.

2. *Nach 30 min:* Die aus der rechten und linken Kammerwand entnommenen Herzmuskelstücke weisen zu dieser Zeit eine noch relativ normale Feinstruktur auf. Vereinzelt erkennt man Mitochondrien, deren Matrix stellenweise leicht aufgehellte und dadurch fleckig gezeichnet ist. Die äußere und innere Doppelmembran ist überall scharf konturiert, in keinem Schnittpräparat sind die Mito-

Tabelle 1. *Normalwerte für den Sauerstoffverbrauch und die oxydative Phosphorylierung isolierter Mitochondrien aus Kaninchenherzen*

Die Herzen wurden sofort nach dem Ausbluten der Tiere entnommen und in kalte Saccharose-Lösung + 0,5 mM EDTA gelegt, wo sie nach 2—3 Schlägen stillstanden. Es sind Mittelwerte von jeweils mindestens 10 Versuchen \pm der extremen Abweichung vom Mittelwert angegeben. Versuchsansatz zur Messung der oxydativen Phosphorylierung in 1,5 ml: 0,2 ml Mitochondriensuspension, 14 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,4, 35 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM Substrat, 3 mM ADP, 75 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 1 mg/ml äther-extrahiertes Rinder-Serumalbumin, (0,5 mM NAD) und 0,1 ml Hexokinase-Glucose-Lösung im Seitenarm des Warburg-Gefäßes. Inkubation bei 25°C, 7—12 min.

	Q_{O_2} (mg Protein)	P/O
Succinat	147 \pm 37	1,9 \pm 0,2
α -Ketoglutarat + Malonat	163 \pm 32	3,2 \pm 0,3
β -Hydroxybutyrat (BOH)	238 \pm 36	2,7 \pm 0,2

Tabelle 2. *Atmungskontrolle von isolierten Kaninchenherz-Mitochondrien nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 37°C*

Der Sauerstoffverbrauch wurde manometrisch mit α -Ketoglutarat + Malonat gemessen. Die Atmungskontrolle gibt das Verhältnis der Atmung mit und ohne Phosphatacceptor-System wieder. In Klammern: Anzahl der Versuche.

	$\frac{+ ADP}{\emptyset ADP}$
Normal	8—10 (7)
15 min bei 37°C	8—10 (3)
30 min bei 37°C	6—8 (4)
60 min bei 37°C	4—5 (3)
90 min bei 37°C	2—3 (2)

matischen Reticulums geringgradig erweitert. Kerne und Myofibrillen sind ebenso unverändert wie die Blutcapillaren.

In der Abb. 1 a ist die entsprechende isolierte Mitochondrienfraktion dargestellt. Sie bietet ein recht uniformes Bild und entspricht weitgehend den Partikeln im Zellverband. Auch hier finden sich wieder die oben erwähnten Mitochondrien mit der aufgehellten Matrix. Bei der biochemischen Analyse ergibt sich jetzt bereits ein deutlicher Abfall der α -Ketoglutarat-Atmung von 3,6 μ AO/15 min \times mg Protein im Mittel auf 2,8. Das bedeutet einen Ausfall des Elektronentransportes von etwa 20%. Interessanterweise bleibt die Kopplungsrate unter diesen Bedingungen jedoch praktisch erhalten (P/O = 3,1). Dieser primäre Angriff an der Atmungskette nach der Ischämie ist nicht für α -Ketoglutarat spezifisch, denn gleichartige Veränderungen zeigen sich auch bei den Substraten Succinat und BOH (Abb. 1 b). Beim BOH ist zu diesem Zeitpunkt allerdings auch das Absinken der P/O-Relation bereits angedeutet. Ein Zusatz von NAD zum Versuchsmedium bei den beiden NAD-abhängigen Reaktionen hat keinerlei Einfluß auf den Elektronentransport. Es handelt sich also offenbar nicht einfach um eine NAD-Verarmung der Zellpartikel.

Diese Befunde stehen im Gegensatz zu unseren Ischämieversuchen an der Leber (MERKER, WEDELL u. NEUBERT), in denen sich die Atmungskette der Leber-

chondrien stärker geschwollen. An einzelnen Stellen ist das Tubulussystem des sarcoplas-

mitochondrien stabiler erwies als die oxydative Phosphorylierung. Andererseits läßt sich dieser Befund mit Beobachtungen von DANFORTH und BING vergleichen, die an *Gewebeschnitten* von ischämisch stillgelegten Herzen einen starken Abfall des Q_{O_2} fanden. Eine ähnliche Verminderung des Elektronentransportes durch

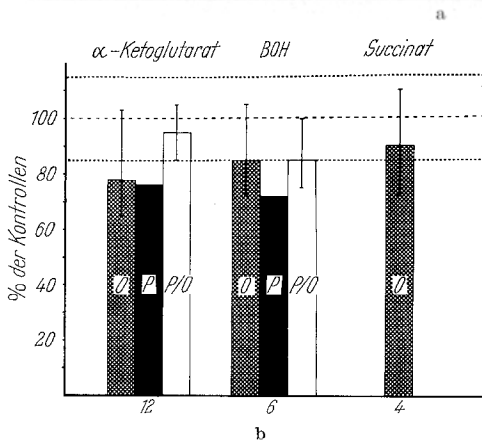
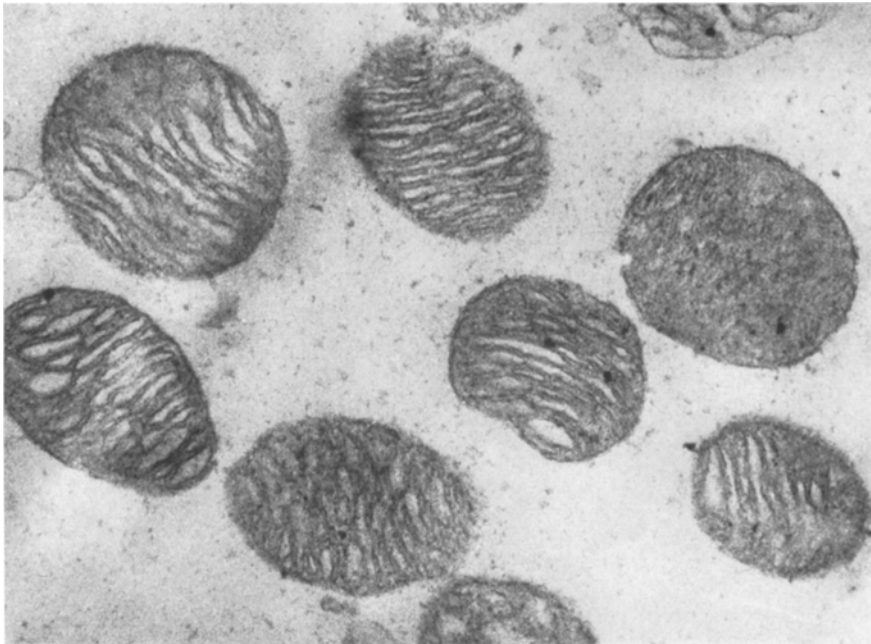


Abb. 1a u. b. Kaninchenherz 30 min nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 37°C. a Isolierte Mitochondrien. Angedeutete Aufhellung der Mitochondrienmatrix. 1:40 000. b Atmung und Atmungskettenphosphorylierung isolierter Mitochondrien. Im Gegensatz zu den Herzen der Kontrollen schlugen diese Herzen nach dem Herausnehmen aus dem Organismus noch bis zu 10 min. O Sauerstoffverbrauch ($-\mu\text{AO}/10 \text{ min} \times \text{mg Mitochondrien-Protein}$), P ATP-Bildung ($\mu\text{mole P verestert}/10 \text{ min}$). Die Zahlen unter den Säulen geben die Anzahl der Versuche an. Alle gemessenen Stoffwechselparameter der isolierten Mitochondrien liegen an der unteren Grenze der Norm.

↕ entspricht den Normalbereich

die Atmungskette bei intakter oxydativer Phosphorylierung sahen wir an isolierten Lebermitochondrien nach Einwirkung von Phosphorwasserstoff [NEUBERT und HOFFMEISTER (2)]. Die Befunde zeigen, daß die Atmungskettenphosphorylierung im Energiestoffwechsel nicht unbedingt die empfindlichste Reaktion darstellen muß. Die Verminderung des Elektronentransportes, sowohl bei der Succinat-oxydation als auch bei der Oxydation NAD-abhängiger Substrate, weist auf den Ausfall einer gemeinsamen Komponente in beiden Ketten hin. Wir haben an eine

Störung der Ubichinon-Funktion gedacht. Versuche, die Atemverminderung durch Zusatz von Ubichinon zum Versuchsmedium auszugleichen, sind bisher jedoch nicht erfolgreich gewesen.

Die Prüfung der Atmungskontrolle, eines relativ empfindlichen Kriteriums für die Intaktheit des mitochondrialen Systems (z.B. HOCH u. LIPMANN; CARAFOLI et al.), ergibt nach 30 min Kreislaufunterbrechung noch normale Werte (Tabelle 2). Wir glauben daher, daß die Atemhemmung als reversibel angesehen werden kann. Nach 30 min Ischämie ergibt sich somit bei der Korrelation von mitochondrialer Funktion und Struktur eine recht gute Übereinstimmung.

Vergleicht man unsere morphologischen Befunde mit den Ergebnissen anderer Untersucher, so kann man über eine gewisse Diskrepanz nicht hinwegsehen: LÖHR, MEESSEN und POCHE beschrieben erste morphologische Mitochondrienveränderungen bereits nach 10 min experimentellen anoxischen Herzstillstandes in Form von Schwellung und marginaler Destruktion der Innenmembran. Nach 30—40 min Ischämie sind die Veränderungen derart schwer, daß an der Reversibilität, zumindest bei einigen Herzmuskelzellen, von den Autoren gezweifelt wird. Nach den Untersuchungen dieser Autoren verhält sich beim Kaliumcitratstillstand der Herzmuskel viel stabiler, denn hierbei treten morphologische Veränderungen erst nach 40 min auf, die vergleichbar mit denen nach 10 min anoxischem Herzstillstand sind. Die Ursache hierfür mag zunächst einmal in dem strukturstabilisierenden Effekt des Kaliumcitrats zu suchen sein. Zum anderen aber führt das Kaliumcitrat einen fast momentanen Herzstillstand herbei. Es ist anzunehmen, daß der Stoffwechsel solcher Herzmuskelzellen gegenüber einem vergleichbaren bis zur Erschöpfung schlagenden anoxischen Herzens eine weitaus günstigere Ausgangslage hat und dadurch eine Ischämie besser zu überstehen vermag. Bedenkt man, daß in unseren Versuchen die isolierten Herzen in der feuchten Kammer bis zu 6 min schlagen, ist man erstaunt über die nach 30 min Ischämie beobachteten relativ geringen morphologischen und biochemischen Veränderungen des mitochondrialen Systems.

Am wahrscheinlichsten ist, daß die Diskrepanz zwischen den Befunden von LÖHR, MEESSEN und POCHE und unseren Ergebnissen hinsichtlich des zeitlichen Auftretens sowie der Schwere der Veränderungen in der Verwendung verschiedener Einbettungsmittel gesucht werden muß. So scheint das von uns benutzte Vestopal W im Vergleich zu dem von den genannten Autoren verwandten Methacrylat ein geeigneteres Einbettungsmittel zu sein, und die Struktur dem jeweiligen Funktionszustand des Zellgefüges relativ adäquat zu erhalten. Dies bezeugt vor allem auch die jetzige Untersuchungsreihe im Vergleich zu den früheren Befunden von HÖLSCHER, JUST u. MERKER und HÖLSCHER, in denen noch Methacrylat zur Einbettung verwandt wurde, und bereits nach 30 min schwerste, teilweise vacuolige Mitochondriendestruktionen beobachtet wurden. Derart schwere Strukturveränderungen an den Mitochondrien sind auf Grund unserer jetzigen Untersuchungen zu einem so frühen Zeitpunkt jedoch mit keiner entsprechenden schweren Störung der Fähigkeit zur Atmungskettenphosphorylierung zu korrelieren.

Die in jüngster Zeit von POCHE und OHM mitgeteilten Befunde am menschlichen Herzmuskelgewebe, das während der Operation einer Fallotschen Tetralogie gewonnen werden konnte, sind mit unseren an gesunden Herzen erhobenen

Ergebnissen nur schwer zu vergleichen. Trotz Einbettung des Gewebes in Vestopal W sind auch hier bereits nach 10 min Ischämie so schwere mitochondriale Veränderungen nachweisbar, daß man fast eine besondere Labilität dieser fehlgebildeten Herzen gegenüber einer Ischämie annehmen muß. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von HOELSCHER u. STOLPMANN, die in den Herzmuskelzellen bei verschiedenen Anomalien auch ohne Anoxämie schon Mitochondrienveränderungen fanden.

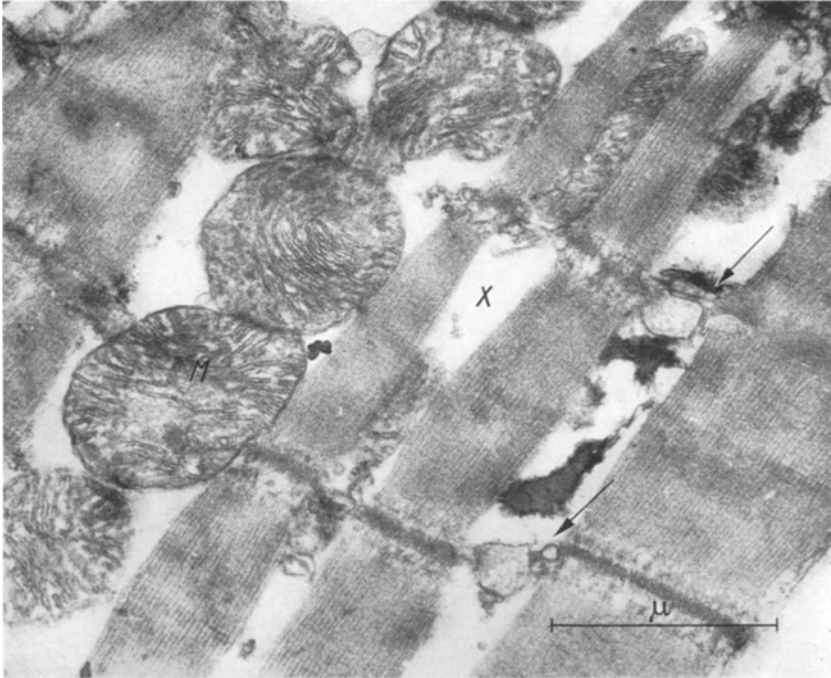


Abb. 2a

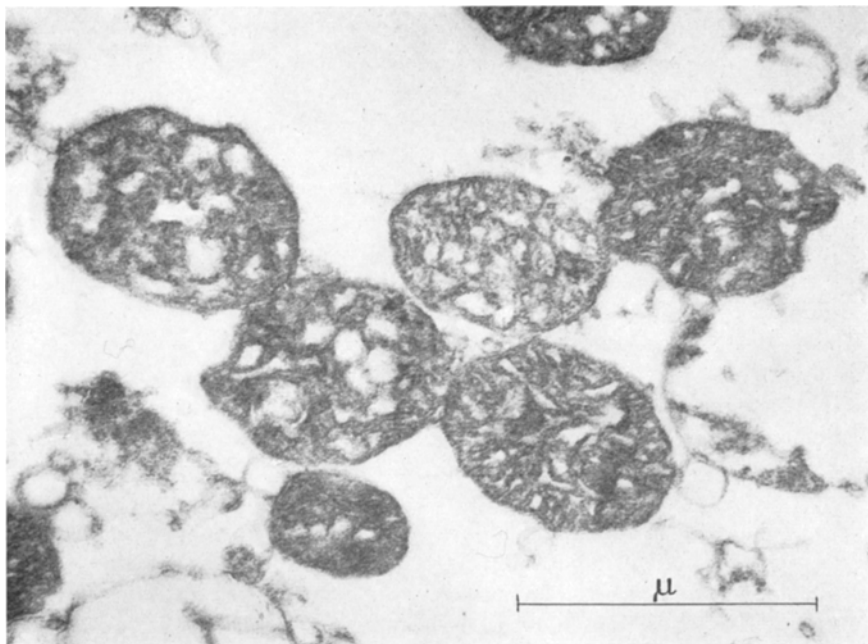
3. *Nach 60 min:* Die Matrix der Mitochondrien ist zu diesem Zeitpunkt fast völlig verschwunden. Dadurch treten die Cristae besonders deutlich hervor. An einzelnen Stellen ist der Raum zwischen den Cristae erweitert und der Cristaeverlauf unregelmäßiger. Es beginnt also eine deutliche Mitochondrienschwellung. Die Räume zwischen den Myofibrillen verbreitern sich durch die Ausbildung eines interfibrillären Ödems. Die Packung der Myofilamente ist jedoch noch regelmäßig. Einzelne Tubuli des sarcoplasmatischen Reticulums zeigen eine geringgradige Erweiterung. Die sonst außerordentlich homogen verteilte Kernsubstanz beginnt sich zu dichteren Aggregaten zusammenzulagern.

Die isolierte Mitochondrienfraktion zeigt völlig entsprechende Veränderungen. Auch hier ist die Matrix verschwunden und die Cristae werden stellenweise als Ausdruck einer Mitochondrienschwellung auseinandergedrängt.

Die Atmung mit α -Ketoglutarat ist noch weiter abgefallen und beträgt nur noch etwa 60% des Ausgangswertes. Die von DANFORTH und BING gemessenen QO_2 -Werte an Herzmuskelschnitten (Glucose) nach 60 min Ischämie zeigten ebenfalls einen Abfall in der gleichen Größenordnung. Ähnliche Befunde an *Schnitten*

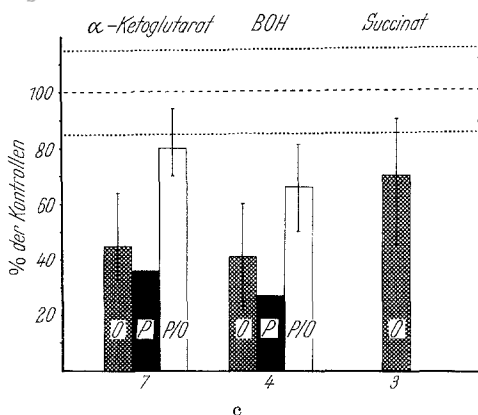
des Herzmuskels wurden von WEBB, SAUNDERS und THIEME und von FUHRMANN, FUHRMANN und FIELD mitgeteilt.

Die mit dem Elektronentransport durch die Atmungskette gekoppelte oxydative Phosphorylierung ist in unseren Versuchen nach 60 min Ischämie ebenfalls



b

Abb. 2a—c. Kaninchenherz 90 min nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 37°C. a Schnitt durch eine Herzmuskelzelle. Aufhellung der Mitochondrienmatrix. Unregelmäßiger Verlauf der Cristae. Deutliches interfibrilläres Ödem (\times). Schwellung der sarcoplasmatischen Hohlräume (\downarrow). 1:30 000. b Isolierte Mitochondrien 1:40 000. c Atmung und Atmungskettenphosphorylierung isolierter Mitochondrien. Experimentelle Bedingungen wie in der Abb. 1 und Tabelle 1 angegeben. Die Atmung mit α -Ketoglutarat und mit BOH als Substrat ist deutlich vermindert. Die P/O-Quotienten mit α -Ketoglutarat liegen an der unteren Grenze der Norm, die mit BOH sind bereits deutlich abgesunken



c

deutlich abgesunken. Auch die Atmungskontrolle (Tabelle 2) und die ATPase-Reaktionen weisen Zeichen einer Schädigung auf.

Die biochemischen Veränderungen zeigen damit, daß die Schwellung der Mitochondrien, die Auflockerung der Cristastruktur sowie der starke Matrixverlust auch funktionell zu einer deutlichen Schädigung der Kapazität des Energiestoffwechsels geführt haben. Wahrscheinlich ist hier das Stadium der irreversiblen Schädigung erreicht.

4. *Nach 90 min.*: Auf dem Schnittbild durch den Herzmuskel (Abb. 2a) treten die Strukturveränderungen jetzt noch deutlicher hervor. Die Myofibrillen sind weit auseinandergedrängt, und auch die Packung der Myofilamente ist stellenweise schon unregelmäßig. Die Mitochondrien weisen eine aufgelockerte Innenstruktur auf, die Cristae sind leicht auseinandergedrängt, ihr Verlauf unregelmäßig und die Matrix herausgelöst. Es liegt also eine deutliche Mitochondrienschwellung vor. Interessanterweise sind gegenüber den mitochondrialen Veränderungen diejenigen der Kernstruktur viel auffälliger und schwerer. Das sonst homogen verteilte Caryoplasma weist eine Verklumpung auf, die besonders marginal deutlich hervortritt. An einzelnen Stellen findet man auch eine beginnende Auflösung der Kernmembran in kleinere Vesikel. Die Glanzstreifen zeigen keine Erweiterung des Spatiums zwischen den aneinandergrenzenden Protomembranen. Das Tubulus-system des endoplasmatischen Reticulums kann stellenweise erweitert sein. Der Endothelbelag der Capillaren ist verbreitert und das Cytoplasma hell und arm an Zellorganellen. Es besteht offenbar eine Endothelschwellung.

Die isolierte Mitochondrienfraktion (Abb. 2b) weist die gleichen Veränderungen auf, wie wir sie für die Partikel im Gewebsverband beschrieben haben. Dies ist von genereller Bedeutung insofern, als damit ausgeschlossen werden kann, daß die bereits im Gewebsverband deutlich in ihrer Struktur veränderten Partikel während des Isolierungsvorganges noch zusätzlich übermäßig geschädigt werden. Gleichzeitig belegt die nachweisbare strukturelle Übereinstimmung von isolierter Fraktion und den entsprechenden Partikeln im Gewebe, daß nicht etwa eine Fraktion von überwiegend intakten Partikeln zur Stoffwechselmessung gelangt. Diese Probleme wurden bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert (MERKER, WEDELL u. NEUBERT; NEUBERT u. HOFFMEISTER (1)]. Die isolierten Mitochondrien zeigen nach 90 min Ischämie eine ovale bis längliche Form. Die Matrix ist aufgehellte, die Cristae sind teilweise auseinandergedrängt, aber an keiner Stelle zerstört. Insgesamt sind die Mitochondrien mehr oder minder stark geschwollen. Die begrenzende Doppelmembran ist überall scharf gezeichnet und intakt. Bei der Prüfung der Mitochondrienfunktion wird jetzt auch die Schädigung an der oxydativen Phosphorylierung ganz offenkundig (Abb. 2c). Der P/O-Quotient mit α -Ketoglutarat ist auf einen Wert von 2,6 abgesunken und die Atmung auf etwa 40% der Norm. Die Atmungskontrolle beträgt nur noch 3 statt ursprünglich 9. Durch das Absinken der Fähigkeit zur Atmung und Atmungskettenphosphorylierung wird die Möglichkeit zur aeroben Energiebildung um etwa 70% vermindert. Die ermittelten Werte sind während der ersten 10–15 min des Stoffwechselversuches gemessen, da eine längere Inkubation zu einer weiteren Schädigung dieser primär veränderten Zellpartikel führt.

5. *Nach 180 min.*: Die Herzmuskelzellen lassen jetzt ein deutliches interfibrilläres Ödem erkennen. Stellenweise sind die Myofilamente noch regelrecht gepackt, an anderen Stellen dagegen sind sie auseinandergedrängt und verlieren ihre feste Gliederung. Die Mitochondrien sind stark geschwollen, ihre Cristae liegen nicht mehr dicht aneinander, sondern verlaufen durch weite intercristäre Räume getrennt, außerordentlich unregelmäßig (Abb. 3a). Obwohl schon durch die Schwellung allein die Zahl der Cristae pro Flächeneinheit relativ geringer wird, scheint darüber hinaus auch ein absoluter Verlust der Cristae, teilweise ein

Zerfall in kleine vesiculäre Bruchstücke, vor sich zu gehen, so daß auch ihre Menge pro Mitochondrium abnimmt.

Die marginale und zentrale Aggregation der Kernsubstanz hat weiter zugenommen. Die Tubuli des endoplasmatischen Reticulums sind stellenweise

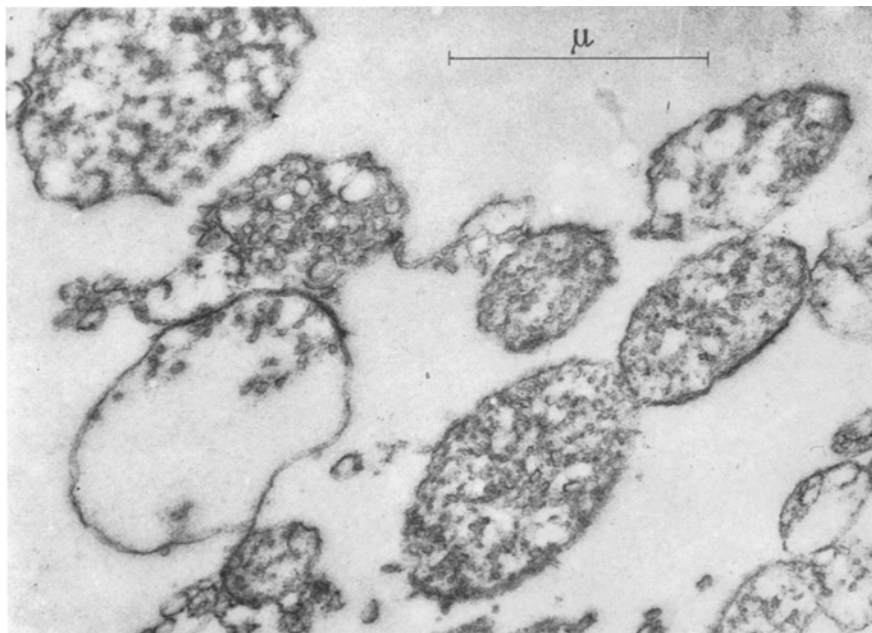
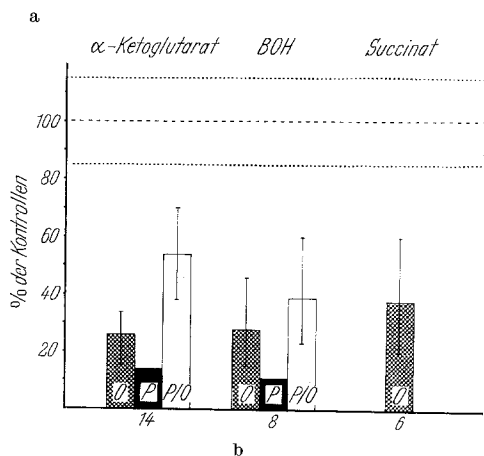


Abb. 3 a u. b. Kaninchenherz 180 min nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 37°C. a Isolierte Mitochondrien. Deutliche Mitochondrienschwellung. 1:35000. b Atmung und Atmungskettenphosphorylierung isolierter Mitochondrien. Experimentelle Bedingungen wie in der Abb. 1 und Tabelle 1 angegeben. Alle untersuchten Stoffwechselleistungen der isolierten Zellpartikel sind erheblich vermindert

unauffällig, zum Teil aber auch deutlich erweitert. Die Mitochondrien in der isolierten Fraktion sind ebenfalls stark geschwollen. Dabei fällt auf, daß die Cristae und das wenige noch vorhandene Matrixmaterial teilweise in einem Pol

liegen, während das übrige Mitochondrienareal optisch leer erscheint. Die Zahl der Cristae hat deutlich abgenommen. Außerdem ist auch hier der Zerfall der Cristae in kleine, meist vesiculäre Bruchstücke zu beobachten. Eine Verbindung der Cristae zur inneren Mitochondrienmembran ist nicht mehr nachzuweisen.

Die isolierte Mitochondrienfraktion zeigt im Stoffwechselversuch klar, zu welch schweren Veränderungen des Elektronentransportes und der oxydativen



Phosphorylierung die Schädigung des mitochondrialen Strukturgefüges geführt hat (Abb. 3b). Der noch meßbare Elektronentransport durch die Atmungskette beträgt etwa 25—30% des Ausgangswertes, die Atmungskontrolle ist weitgehend erloschen und der P/O-Quotient ist auf etwa 50% der Norm abgefallen. Die maximal mögliche aerobe Energiebildung in der Herzmuskelzelle wird damit auf ein Minimum reduziert. Sie kann nach Wiederherstellung der Kreislauffunktion höchstens noch eine oxydative ATP-Bildung von 10—15% des Ausgangswertes

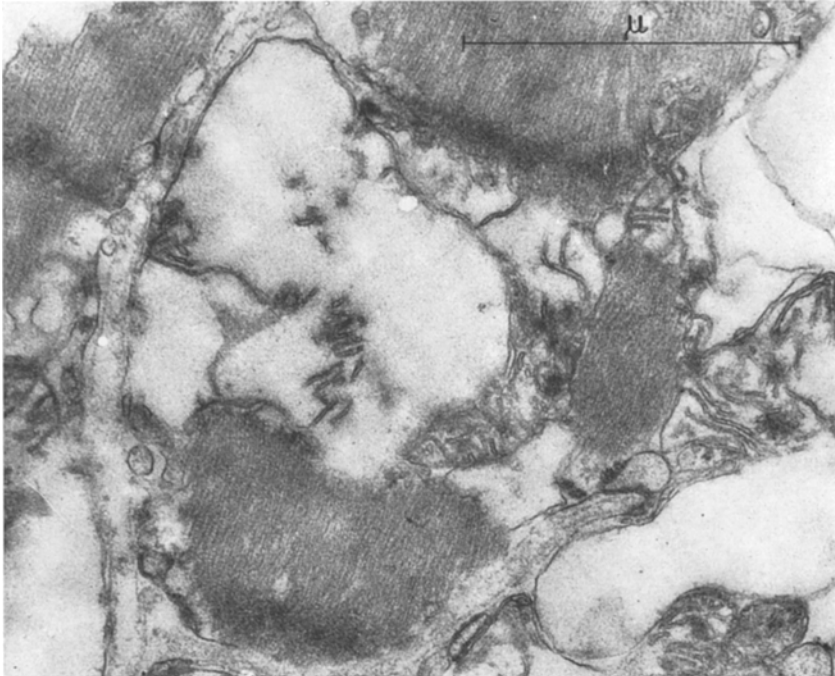
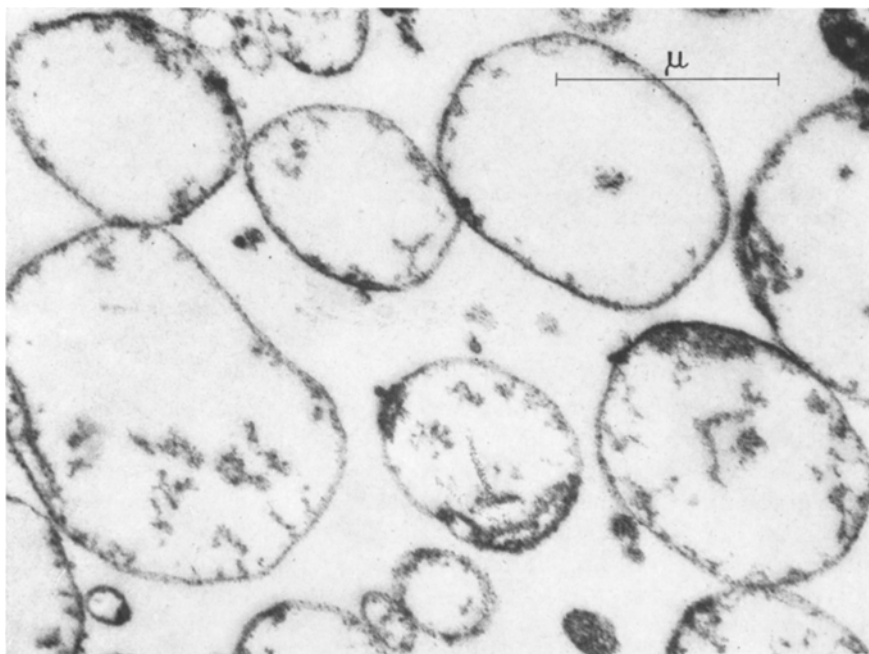


Abb. 4a

erbringen. In diesem Zusammenhang möchten wir noch darauf hinweisen, daß die gemessenen Q_{O_2} -Werte wahrscheinlich Maximalwerte darstellen, da das Bezugssystem (pro Milligramm Protein) mit zunehmender Dauer der Ischämie nicht mehr ganz verläßlich ist. Wie morphologische Befunde belegen, kommt es im Verlaufe der Ischämie zu einem weitgehenden Matrixverlust, so daß damit der Proteingehalt pro Mitochondrium abnimmt, und die gemessenen Proteinwerte der Mitochondrienfraktion absolut gesehen zu niedrig sind. Dies führt natürlich bei der Berechnung der Q_{O_2} -Werte leicht zu höheren Werten.

6. *Nach 240 min:* Vier Stunden nach Ausschaltung der Kreislauffunktion liegt morphologisch wie auch biochemisch das Bild eines extrem geschädigten Herzmuskels vor. Die interfibrillären Räume werden jetzt von den außerordentlich geschwollenen Mitochondrien ausgefüllt. Stellenweise ist die äußere Membran verlorengegangen. Im Innern lassen sich nur noch wenige Cristaebruchstücke nachweisen. Auch die Hohlräume des sarkoplasmatischen Reticulums scheinen stark gebläht zu sein, so daß sie oft nicht von Mitochondrienanschnitten getrennt werden können (Abb. 4a). Die isolierten Mitochondrien bestehen nur noch aus

fast leeren Säcken, die von einer einfachen Membran begrenzt werden und nur wenig fädiges oder granuläres Material enthalten (Abb. 4b). Die Rest-Atmung ist kaum meßbar (Abb. 4c) und beträgt höchstens noch 10%. Es ist erstaunlich, daß die so schwer geschädigten Zellpartikel überhaupt noch zu einem Elektronen-

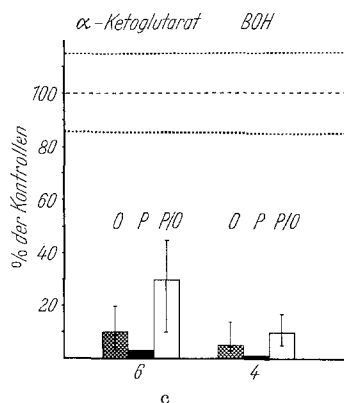


b

Abb. 4a—c. Kaninchenherz 240 min nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 37°C. a Schnitt durch eine Herzmuskelzelle. Extreme Schwellung der Mitochondrien und der Hohlräume des sarcoplasmatischen Reticulums. Auflösung der Cristae. 1:45000. b Isolierte Mitochondrien. 1:30000. c Atmung und Atmungskettenphosphorylierung isolierter Mitochondrien. Experimentelle Bedingungen wie in der Abb. 1 und der Tabelle 1 angegeben. Sämtliche untersuchten Stoffwechselleistungen sind kaum noch meßbar

transport und einer ATP-Bildung befähigt sind. Von einer irgendwie geordneten Funktion kann natürlich keine Rede mehr sein.

Wir haben in den hier vorgelegten Untersuchungen die *Kapazität* der isolierten Mitochondrien zur Atmungskettenphosphorylierung untersucht, und damit die Fähigkeit, nach Wiedereinsetzen der O₂- und Substratversorgung, eine ATP-Synthese durchzuführen. Selbstverständlich können diese Fähigkeiten der Mitochondrien während der Dauer der Ischämie nicht ausgenutzt werden. Aber auch die Frage, wieweit diese noch vorhandenen enzymatischen Möglichkeiten nach der Wiederdurchblutung des Organs in Anspruch genommen werden können, hängt von einer Reihe auch außerhalb des Herzens gelegener Faktoren ab. Es soll in diesem



Zusammenhang nur an das Problem der sog. Sofort-Suffizienz erinnert werden (GROTE et al. 1963).

Es ist zu berücksichtigen, daß zunächst von uns nur über einige Stoffwechselreaktionen der Mitochondrien berichtet wurde. Von vielen anderen enzymatischen Umsetzungen, die diese Zellpartikel katalysieren, und die natürlich ebenfalls gemessen werden können, ist vor allem die Fettsäureoxydation (KENNEDY u. LEHNINGER) interessant. Es gilt heute als sicher, daß der intakte Herzmuskel seine Energie bevorzugt aus der Oxydation von Fettsäuren bezieht (BING et al.; BERNSMEIER u. RUDOLPH). Der kontinuierliche Abfall des Glykogengehaltes bei gleichzeitigem Anstieg der Milchsäure (CONN et al.; THORN) unter der Ischämie weist jedoch darauf hin, daß unter diesen pathologischen Bedingungen die Glucoseoxydation durch die Glykolysekette herangezogen wird, um den ATP-Bedarf wenigstens notdürftig zu decken. Da dem ATP eine strukturerhaltende Wirkung an den Mitochondrien zugeschrieben wird (RAAFLAUB; LEHNINGER; NEUBERT u. LEHNINGER) könnte ein Absinken dieses Nucleotids auf kritische Werte irreversible Schädigungen dieser Zellorganellen einleiten. Zu dieser Vorstellung paßt gut, daß eine wesentliche Verminderung des Glucose- und ATP-Gehaltes ebenfalls zwischen 20 und 60 min nach Einsetzen der Ischämie erreicht wird (ISSELHARD).

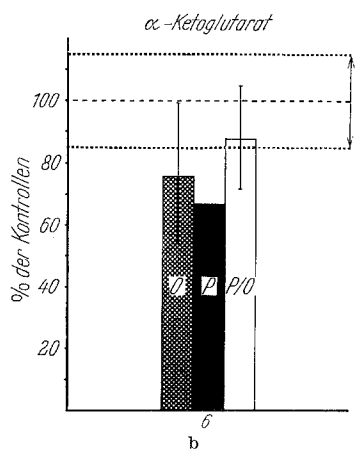
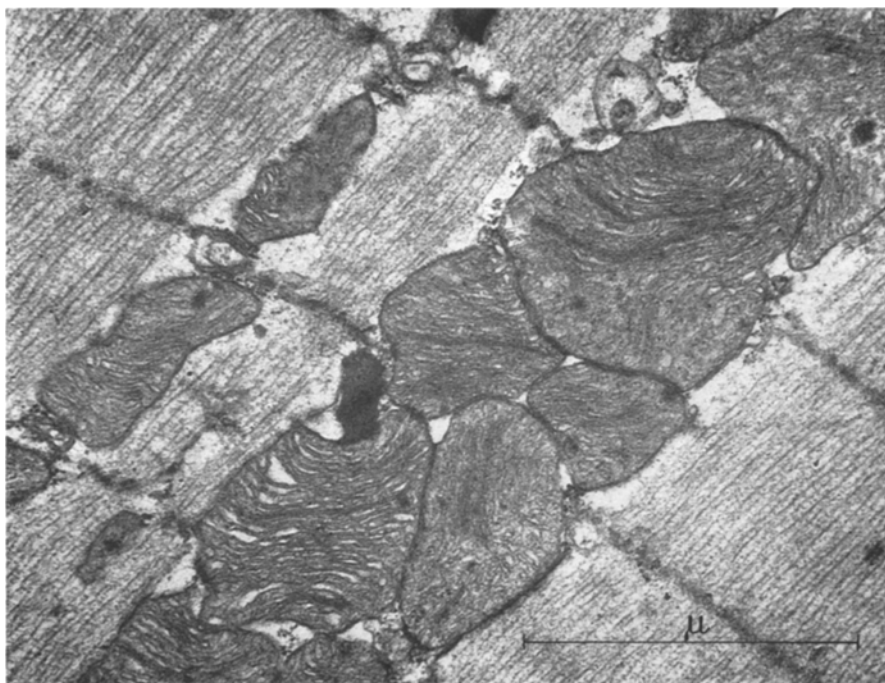
III. Mitochondrienstruktur und Funktion nach ischämischem Herzstillstand bei erniedrigter Umgebungstemperatur

Wie bei allen chemischen Reaktionen ist auch die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Umsetzungen bei erniedrigter Umgebungstemperatur vermindert. Der Q_{10} für viele biochemische Reaktionen beträgt etwa 2. Dennoch sind die biochemischen und physiologischen Parameter, die bei einer Verminderung der Temperatur am Herzen gemessen werden können, durchaus widerspruchsvoll und ergeben kein einheitliches Bild.

So fand LOCKER bei der Untersuchung des Sauerstoffverbrauches von Mäusegeweben im Bereich zwischen 17 und 37°C Q_{10} -Werte für Gehirn (1,9–2,1), Leber (1,5–2,0) und Niere (1,2–2,6), die etwa dem zu erwartenden Wert entsprechen, am Herzen jedoch nur eine Relation von 1,1–1,3. Andererseits haben eine Reihe von Untersuchern gezeigt, daß Versuchstiere eine Unterbrechung der Blutzirkulation auch am Herzen bei erniedrigter Körpertemperatur besser überstehen als in Normothermie (COOKSON et al.; BIGELOW et al.; u.a.).

Exakte Angaben über Q_{10} -Werte autolytischer Vorgänge und der daran beteiligten hydrolysierenden Fermente sind uns nicht bekannt. Die allgemeine Herabsetzung autolytischer Vorgänge bei tiefen Temperaturen ist jedoch aus der pathologischen Anatomie geläufig. Erwähnenswert mag noch sein, daß ein Schwellungsvorgang der Mitochondrien, der bei unseren Untersuchungen ja eine ganz bevorzugte Rolle spielt, auch in vitro verfolgt werden kann. Bei solchen Untersuchungen wurden, je nach der Ursache der Schwellung, Q_{10} -Werte zwischen 1,3 und 4,4 gemessen (NEUBERT, FOSTER und LEHNINGER).

Unsere elektronenmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen zeigen ebenfalls den günstigen Effekt einer Temperatursenkung für die Erhaltung zellulärer Struktur und der Funktion von Herzmuskelzellen. So führte während des ischämischen Herzstillstandes der Ratte eine Senkung der Umgebungstemperatur auf 22°C erst nach 3 Std zu solchen morphologischen Schäden an der Herzmuskelzelle bzw. zu funktionellen Veränderungen an der Atmungskettenphosphorylierung, wie man sie schon nach 30 min ischämischen Herzstillstandes bei einer Temperatur von 37°C beobachtet. Versuche am Kaninchenherzen (Abb. 6) ergeben, daß bereits eine Senkung der Umgebungstemperatur von 37°C auf 30°C zu einer deutlichen Stabilisierung der Fähigkeit zur ATP-Bildung führt. Bei einer sehr extremen Senkung der Umgebungstemperatur bis auf 5°C tritt der stabilisierende Effekt auf Struktur und Funktion der Herzmuskelzelle noch augenfälliger hervor. So findet man bei bis zu 16 Std dauernder Ischämie in den elektronenmikrosko-



pischen Bildern eine gegenüber dem Normalen weitgehend unveränderte Herzmuskelstruktur. Mit dieser Unversehrtheit der Struktur stimmt auch die intakte Funktion des Elektronentransportes sowie der Atmungskettenphosphorylierung gut überein. Es ist vielleicht in diesem Zusammenhang von Wichtigkeit darauf hinzuweisen, daß auch in diesen Versuchen nach Setzen der Ischämie die Herzen

Abb. 5a u. b. Kaninchenherz 42 Std nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei 5°C. a Schnitt durch eine Herzmuskelzelle. Angedeuteter Verlust der Mitochondrienmatrix. Intracelluläre Strukturen fast unverändert. b Atmung und Atmungskettenphosphorylierung isolierter Mitochondrien. Experimentelle Bedingungen wie in der Abb. 1 und der Tabelle 1 angegeben. Die Mittelwerte der gemessenen biochemischen Reaktionen liegen etwa an der unteren Grenze der Norm. Es fällt jedoch die starke Streuung auf. Neben völlig normalen Werten kommen auch deutlich erniedrigte vor

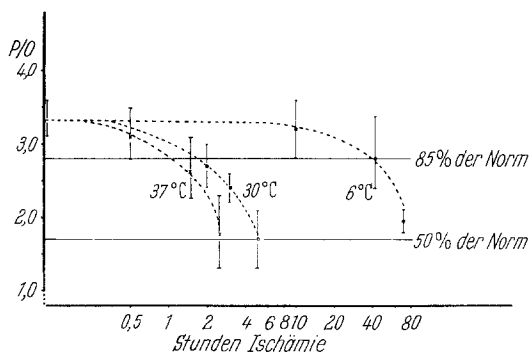


Abb. 6. Atmungskettenphosphorylierung isolierter Kaninchenherz-Mitochondrien nach vollständiger Kreislaufunterbrechung bei verschiedenen Temperaturen

durchschnittlich noch 2—3 min bis zur völligen Erschöpfung weiterschlugen. Wir finden nach annähernd 40 Std Ischämie neben Herzen mit einer deutlich geschädigten mitochondrialen Funktion auch immer noch Organe, die eine intakte Atmungskettenphosphorylierung besitzen. Erst nach 55 Std Ischämie sieht man eine gleichmäßige Funktionsabnahme der Atmungskettenphosphorylierung, die nach etwa 60—70 Std etwa 50 % beträgt (Abb. 5b). Diese funktionellen Veränderungen haben in gleicher Weise ihr Äquivalent in einer entsprechend starken bzw. geringen Schädigung der Herzmuskelstruktur, vor allem der mitochondrialen Strukturen. Die Tatsache, daß in einem Herzmuskel nach einer kompletten Ischämie von fast 2½ Tagen bei einer Temperatur von 5°C der oxydative Energiestoffwechsel noch zu 50 % funktionsfähig ist, erscheint beinahe unglaublich. Abb. 5a zeigt das elektronenmikroskopische Bild eines Herzmuskels nach 42 Std Ischämie bei 5°C mit einer noch weitgehend unveränderten Feinstruktur.

Der in dieser Arbeit geschilderte zeitliche Verlauf der morphologischen und biochemischen Veränderungen nach Beginn einer vollständigen Kreislaufunterbrechung läßt auch Schlüsse zu über die Aussichten, biochemische Untersuchungen des Energiestoffwechsels an autoptischem Material durchzuführen.

Damit kommt man dem Ziel der Pathologie näher, nämlich der Gewinnung eines einigermaßen vollständigen Bildes von der veränderten Zelle durch kombinierte morphologische und biochemische Untersuchungen. Unsere Befunde zeigen, daß sowohl eine elektronenmikroskopische Untersuchung als auch eine Beurteilung des Energiestoffwechsels durch Messung einigermaßen verlässlicher P/O-Quotienten im Herzmuskel noch 30—60 min nach Eintritt des „Todes“ möglich ist, wenn das Gewebe auf 37°C gehalten wird. Durch eine geeignete schnellere Abkühlung kann diese Möglichkeit noch wesentlich erweitert werden. Allerdings lassen sich diese an Kaninchen- und Rattenherzen gewonnenen Ergebnisse nur sehr bedingt auf andere Organe übertragen, wie unsere vergleichenden morphologischen und biochemischen Untersuchungen an der Leber gezeigt haben (MERKER, WEDELL und NEUBERT). Über die Ergebnisse mit menschlichem Sektionsmaterial werden wir an anderer Stelle berichten.

Aus der in jedem Falle gefundenen guten Übereinstimmung zwischen unseren morphologischen und biochemischen Untersuchungen möchten wir den Schluß ziehen, daß die irreversible Schädigung der Mitochondrienfunktion wenigstens einen limitierenden Faktor für das Überleben der Zelle bei einer Ischämie darstellt. Diese vorliegenden Untersuchungen erlauben uns deshalb, die Mitochondrienfunktion als ein Kriterium für die relative Intaktheit der Zelle zu betrachten und versetzt uns in die Lage, nun den Einfluß von Pharmaka auf die Überlebenszeit zu testen.

Zusammenfassung

Nach vollständiger Kreislaufunterbrechung lassen sich im Herzmuskel folgende Veränderungen beobachten: Schwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulums, Zerfall der Cristae, Auftreten eines interfibrillären Ödems und Verklumpung der Kernstrukturen. Nach 30 min bei 37° erscheint der Herzmuskel noch normal. Deutliche und wahrscheinlich irreversible Veränderungen treten nach 60—90 min auf. Die isolierten Mitochondrien entsprechen den Mitochondrien in den Schnittbildern. Die untersuchten biochemischen Funktionen der isolierten Mitochondrien lagen ebenfalls 30 min (37°) nach vollständiger Kreis-

laufunterbrechung noch im normalen Bereich. Eine 50%ige Verringerung der ATP-Synthese bestand nach 60 min (37°). Die Erniedrigung der Temperatur auf 30° oder 5° verzögerte deutlich das Auftreten der morphologisch und biochemisch faßbaren Veränderungen.

Mitochondrial Structure and Oxidative Chain Phosphorylation in the Myocardium after Complete Ischaemia

Summary

Ischaemic or "autolytic" alterations in heart tissue consisted of a swelling of mitochondria and a disappearance of the cristae, interfibrillar edema, aggregation of the nuclear structures and a swelling of the endoplasmic reticulum. Whereas these changes were negligible within the first 30 minutes after circulatory arrest at 37°C, severe and probable irreversible structural disintegration started after 60—90 minutes. There was an excellent agreement between the electron microscopic results obtained from tissue sections and those obvious from the mitochondria isolated from the ischaemic hearts. The biochemical functions tested were about normal within the first 30 minutes following the onset of ischaemia, in agreement with the electron microscopic results. A 50% reduction of the capacity for ATP-synthesis was noted at about 60 minutes of ischaemia (37°). Reducing the temperature to 30° or 5° resulted in a marked retardation in the onset of the structural as well as the biochemical lesions.

Literatur

- BERNSMEIER, A., u. W. RUDOLPH: Myokardstoffwechsel. Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch., S. 59. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1961.
- BIGELOW, W. G., W. T. MUSTARD, and J. G. EVANS: Some physiologic concepts of hypothermia and their applications to cardiac surgery. J. thorac. Surg. **28**, 463 (1954).
- BING, R. J., A. SIEGEL, I. UNGER, and M. GILBERT: Metabolism of the human heart. II. Metabolism of fats, proteins and ketones. Amer. J. Med. **16**, 504 (1954).
- CARAFOLI, E., A. MARGRETH, and P. BUFFA: Biochemical changes in pigeon breast muscle mitochondria following nerve section. Nature (Lond.) **196**, 1101 (1962).
- CONN, H. L., J. C. WOOD, and G. S. MORALES: Rate of change in myocardial glycogen and lactic acid following arrest of coronary circulation. Circulat. Res. **7**, 721 (1959).
- COOKSON, B. A., W. B. NEPTUNE, and C. P. BAILEY: Intracardiac surgery with hypothermia. J. int. Col. Surg. **27**, 685 (1952).
- — — Hypothermia as a means of performing intracardiac surgery under direct vision. Dis. Chest **22**, 245 (1952).
- DANFORTH, H., and R. J. BING: The heart in anoxia and ischaemia. Brit. J. Anaesth. **30**, 456 (1958).
- FUHRMAN, W. J., F. A. FUHRMAN, and J. FIELD: Metabolism of rat heart slices with special reference to effects of temperature and anoxia. Amer. J. Physiol. **163**, 642 (1950).
- GROTE, G., H. J. STREICHER, V. SCHLOSSER u. K. KÖRNER: Bestimmung der Wiederbelebungszeit des Herzens mit Sofortinsuffizienz im Tierversuch. Thoraxchirurgie **2**, 20 (1963).
- HIBES, R. G., and W. C. BLACK: Electron microscopy of post-mortem changes in the rat myocardium. Anat. Rec. **147**, 261 (1963).
- HOCH, F. L., and F. LIPMANN: The uncoupling of respiration and phosphorylation by thyroid hormones. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 909 (1954).
- HÖLSCHER, B.: Tierexperimentelle Untersuchungen zum künstlichen Herzstillstand. Langenbecks Arch. klin. Chir. **300**, 634 (1962).
- O. H. JUST, and H.-J. MERKER: Studies by electron microscope on various forms of induced cardiac arrest in dog and rabbit. Surgery **49**, 492 (1961).

- HÖLSCHER, B., u. H. J. STOLPMANN: Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen bei der Korrektur des künstlich stillgelegten Herzens verschiedener Herzanomalien. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **301**, 664 (1962).
- ISSELHARD, W.: Das Verhalten des Energiestoffwechsels im Warmblüterherzen bei künstlichem Herztillstand. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 347 (1960).
- KENNEDY, E. P., and A. L. LEHNINGER: The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.* **185**, 275 (1950).
- LEHNINGER, A. L.: Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.* **234**, 2465 (1959).
- LOCKER, A.: Über Stoffwechselunterschiede zwischen den Geweben kalt und warmblütiger Tiere. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **275**, 238 (1962).
- LÖHR, B., H. MEESSEN u. R. POCHÉ: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Herzmuskels vom Hund bei experimentellem Herztillstand durch Kaliumcitrat und Anoxie. *Arch. Kreisl.-Forsch.* **33**, 108 (1960).
- MERKER, H. J., J. WEDELL u. D. NEUBERT: Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **249**, 85 (1964).
- NEUBERT, D., u. I. HOFFMEISTER: (1) Mitochondrienatmung und Atmungskettenphosphorylierung bei erhöhtem intramitochondrialen Gehalt an Gesamtfetten. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **238**, 348 (1960).
- — (2) Veränderungen im intermediären Stoffwechsel nach Einwirkung von Phosphorwasserstoff. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **239**, 219 (1960).
- , and A. L. LEHNINGER: Role of C-Factor in water uptake and extrusion by mitochondria and interference by various drugs. In: B. UVNÄS, *Methods for the study of pharmacological effects at cellular and subcellular levels*. I. *Internat. Pharmacol. Meeting*, vol. V, p. 127. Stockholm: Pergamon Press 1963.
- G. V. FOSTER, and A. L. LEHNINGER: Effect of temperature on uptake and extrusion of water by isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **60**, 492 (1962).
- POCHÉ, R., u. H. W. OHM: Lichtmikroskopische, histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Herzmuskels vom Menschen nach induziertem Herztillstand. *Arch. Kreisl.-Forsch.* **41**, 86 (1963).
- RAAFLAUB, J.: Die Korrelation zwischen Struktur und Aktivität von isolierten Lebermitochondrien. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **10**, 122 (1952).
- Über den Wirkungsmechanismus von Adenosin-triphosphat (ATP) als Cofaktor isolierter Mitochondrien. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **11**, 157 (1953).
- THORN, W.: Metabolitkonzentrationen im Herzmuskel unter normalen, hypoxischen und anoxischen Bedingungen. *Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch.* S. 76. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1961.
- WEBB, W. R., P. R. SAUNDERS, and C. H. THIEME: The metabolism of the heart in relation to drug action. I. The endogenous aerobic metabolism of rat heart slices. *Arch. Biochem.* **22**, 444 (1959).

Dr. J. WEDELL u. Priv.-Dozent Dr. D. NEUBERT
Pharmakologisches Institut der Freien Universität
1 Berlin 33 (Dahlem), Thielallee 69/73

Priv.-Dozent Dr. H. J. MERKER
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität
1 Berlin 33 (Dahlem), Königin Luise-Straße 15