

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

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Alupent® auf die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte

Von

TORSTEN-UDO HAUSAMEN und REINHARD POCHÉ *

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. November 1964)

Das N-Isopropyl-noradrenalinsulfat (Aludrin®), das seit Jahren seinen festen Platz in der Therapie des akuten Anfalles beim Asthma bronchiale besitzt, ist in letzter Zeit in zunehmendem Maße auch zur Therapie von Reizleitungsstörungen des Herzens verwendet worden (NATHANSON und MILLER, EFFERT und SCHMIDT u. a.). RONA u. Mitarb. sowie KORB und TOTÓVIĆ konnten bei Ratten durch Injektion hoher Dosen von Aludrin Herzmuskelnekrosen erzeugen.

Nach RONA u. Mitarb. traten bei subcutaner Injektion von 0,08—2,6 mg/kg Körpergewicht in 20—50%, bei Dosen von 5,25—42,5 mg/kg in 100% der Versuchstiere Herzmuskelnekrosen auf. KORB und TOTÓVIĆ fanden nach Injektion von 5 mg/kg kleinste Herzmuskelnekrosen, die nach einer Dosis von 75 mg/kg an Zahl und Ausdehnung zunahmen. Schon 1 Std nach der Injektion traten kleinste Fetttropfen in den Herzmuskelzellen auf, und nach 4 Std waren stellenweise Histocyten und Leukocyten sowie eine verstärkte Eosinophilie der Herzmuskelfasern zu erkennen. Interessant ist, daß bei Ratten nach mehrmaliger Wiederholung von Aludrininjektionen in größeren Zeitabständen offenbar eine Gewöhnung eintritt, so daß keine neuen Herzmuskelnekrosen mehr entstehen.

Statt Aludrin wird heute gewöhnlich Alupent® [1-(3,5-Dihydroxyphenyl)-2-isopropylamino-äthanol-sulfat] verwendet. Dieses unterscheidet sich vom Aludrin chemisch nur dadurch, daß sich die Hydroxylgruppen des Benzolringes in Meta-Stellung befinden; pharmakologisch hat es die gleichen Eigenschaften wie Aludrin, bietet aber den Vorteil, in wässriger Lösung stabil zu sein. Auf Veranlassung von Herrn Professor MEESEN soll in der vorliegenden Arbeit über akute Veränderungen der Ultrastruktur des Herzmuskels nach hohen Dosen von Alupent berichtet werden. Gleichzeitig soll geprüft werden, ob sich die nach einer exogenen Hypoxie im Unterdruckversuch auftretenden submikroskopischen Veränderungen des Herzmuskels durch vorherige Gaben von Alupent beeinflussen lassen.

Material und Methode

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten eines Inzuchtstammes von 250—300 g Körpergewicht.

Für die *Überdosierungsversuche* wurden sieben Tiere verwendet. Drei Tiere bekamen eine einmalige intraperitoneale Injektion von 2 mg/kg (Versuch I) und vier Tiere eine einmalige intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg (Versuch II) Alupent in einer 0,05%igen wässrigen Lösung. Die Tötung der Tiere erfolgte bei Versuch I 30 min nach der Injektion und bei Versuch II 100 min nach der Injektion durch Herausnahme des Herzens in leichter Äthernarkose. Für die *Unterdruckversuche* wurden vier Ratten verwendet. Diese Tiere wurden nach Injektion von 0,1 mg/kg Alupent i.p. in eine Unterdruckkammer von 0,9 m³ Raum-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

inhalt gebracht und innerhalb von 45 min auf einen Unterdruck entsprechend einer Höhe von 10000 m geschleust, in dem sie 60 min verblieben. Während des Versuches konnte die Kammer ständig mit Frischluft durchströmt werden. Der Abstieg auf Normaldruck erfolgte innerhalb von 5 min. Dieser Versuchsablauf wurde zweimal im Abstand von 24 Std wiederholt. Innerhalb von 30 min nach dem dritten Versuch wurden die Tiere durch Herausnahme des Herzens in leichter Äthernarkose getötet.

Von allen Tieren wurden unmittelbar nach Herausnahme des Herzens aus der Seitenwand des linken Ventrikels Herzmuskelproben zur elektronenmikroskopischen Untersuchung entnommen, 2 Std in 1%iger gepufferter isotonischer Osmiumtetroxydlösung fixiert, entwässert, in Vestopal W eingebettet, mit einem Ultramikrotom nach PORTER und BLUM geschnitten und mit dem RCA-Elektronenmikroskop EMU 3C untersucht. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Herzen bei 4° C in 10%igem Formalin und 96%igem Alkohol fixiert.

Befunde

Lichtmikroskopische Untersuchungen

Nach intraperitonealer Injektion von 2 mg/kg Alupent (Überdosierungsversuch I) zeigte der Herzmuskel bereits einen deutlichen Glykogenschwund, am stärksten in der inneren Schicht des linken Ventrikels, sowie vereinzelt sog. hyaline Querbänder, jedoch keine Verfettung. Einige kleine Venen waren erweitert. Nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg Alupent (Überdosierungsversuch II) war der Glykogenschwund auffallenderweise geringer als nach Injektion von 2 mg/kg. Hyaline Querbänder wurden nur ganz vereinzelt gefunden. Dagegen war die venöse Hyperämie etwas deutlicher ausgeprägt. Eine Verfettung der Herzmuskelzellen war nicht festzustellen. Bei einem Tier fanden sich Glanzstreifendehiszenzen.

Im Unterdruckversuch mit vorheriger intraperitonealer Gabe von 0,1 mg/kg Alupent ließ sich im Herzmuskel kein Glykogen mehr nachweisen. Hyaline Querbänder waren nicht vorhanden. Es fanden sich aber eine venöse Hyperämie, die etwa der beim Überdosierungsversuch I entsprach, und bei einem Tier eine kleine intramurale Blutung.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Überdosierungsversuch I. Nach intraperitonealer Injektion von 2 mg/kg Alupent sind die Veränderungen der Ultrastruktur des Herzmuskels verschieden stark ausgeprägt. Zahlreiche Herzmuskelzellen erscheinen fast unverändert, man erkennt nur eine Aufhellung des *Grund Sarkoplasmas* mit Verminderung der Glykogengranula ohne Zellödem. Die *Zellmembranen* sind intakt, die *Vesiculationen* sind nicht vermehrt. Die *Mitochondrien* zeigen dichtgepackte intakte Innenmembranen, jedoch sind die Granula in diesen Mitochondrien deutlich vermindert; man findet etwa 15 Granula auf 100 Mitochondrienanschnitte (gegenüber 65 auf 100 Anschnitte bei normalen Ratten). Die *transversalen Tubuli* und das *endoplasmatische Reticulum* sind nicht wesentlich erweitert. Die Fetttropfchen sind in den einzelnen Herzmuskelzellen verschieden stark vermehrt, der Durchmesser beträgt 0,2—0,7 μ . Die *Myofibrillen* sind unauffällig. Die Abstände der Z-Streifen betragen 0,8—1,3 μ . Einige wenige Zellen zeigen auch Kontrakturen mit verbreiterten Z-Streifen, deren Abstände bis auf 0,5 μ verringert sind. In solchen Zellen sind die Mitochondrien ganz leicht geschwollen. Ein Teil der Herzmuskelzellen zeigt stärkere Veränderungen: Das Grund Sarkoplasma ist stärker aufgehellt und geschwollen, so daß sich das Sarkolemm manchmal arkadenförmig abhebt. Hier können auch die Vesiculationen an den Proto-

membranen der Herzmuskelzellen etwas vermehrt sein (Abb. 1a). Die Mitochondrien zeigen eine leichte bis mittelgradige, meistens diffuse, stellenweise auch fleckige Schwellung und Aufhellung der Matrix sowie eine mäßige Verminderung und geringe Fragmentierung der Cristae (Abb. 1). Auch in solchen Mitochondrien findet man noch etwa 15 Granula auf 100 Mitochondrienanschnitte. Das *endoplasmatische Reticulum* ist in Herzmuskelzellen mit geschwollenen Mitochondrien mäßig aber deutlich erweitert (Abb. 1). Die Kerne sind in allen Herzmuskelzellen nicht wesentlich verändert; nur in Zellen mit geschwollenen Mitochondrien ist das Karyoplasma manchmal leicht aufgelockert und am Rande leicht verdichtet (Abb. 1b), außerdem ist der perinucleäre Raum zwischen primärer und sekundärer Kernmembran stellenweise etwas erweitert. Die *Glanzstreifen* sind intakt (Abb. 1b). Die *Blutcapillaren* sind durchgängig, einige Endothelzellen sind jedoch mäßig stark geschwollen und zwar besonders in der Umgebung von stärker veränderten Herzmuskelzellen. Stellenweise zeigen die Capillarendothelien auch eine vermehrte Mikropinocytose.

Überdosierungsversuch II. Nach Injektion von 10 mg/kg Alupent sind die submikroskopischen Veränderungen des Herzmuskels wesentlich ausgedehnter als nach Injektion von 2 mg/kg. Es finden sich nur noch vereinzelt nicht oder nur gering veränderte Herzmuskelzellen. In den meisten Zellen sind die *Mitochondrien* bis mittelgradig geschwollen (Abb. 2) und enthalten kaum noch Granula; bei Auszählung von 600 Mitochondrienanschnitten finden sich 7 Granula auf 100 Anschnitte. Im übrigen entsprechen die Befunde den stärkeren Veränderungen im Überdosierungsversuch I. Das *endoplasmatische Reticulum* ist meistens geschwollen. Die Fetttropfen sind in zahlreichen Herzmuskelzellen etwas vermehrt. Die Abstände der Z-Streifen der *Myofibrillen* betragen 0,8—1,1 μ . Kontrakturen mit Z-Streifen-Abständen bis 0,3 μ sind häufiger als in Überdosierungsversuch I (Abb. 2). Ganz vereinzelt finden sich — allerdings nur geringgradige — Glanzstreifendehiszenzen.

Unterdruckversuche mit Alupent. Nach dreimaligem Aufenthalt in der Unterdruckkammer mit vorheriger intraperitonealer Injektion von 0,1 mg/kg Alupent sind die submikroskopischen Veränderungen des Herzmuskels auffallend gering. In großen Bezirken findet sich das submikroskopische Bild eines fast normalen Herzmuskels (Abb. 3). Allerdings sind auch hier die Mitochondriengranula vermindert; man findet etwa 15 Granula auf 100 Mitochondrienanschnitte (bei Auszählung von 600 Mitochondrien). In einigen wenigen Herzmuskelzellen ist die Matrix der Mitochondrien geringgradig diffus oder fleckig aufgehellte und nur selten finden sich leicht bis mittelgradig geschwollene Mitochondrien. Das *Grund Sarkoplasma* der Herzmuskelzellen ist nur geringgradig aufgehellte und meistens nicht geschwollen. Die Glykogengranula sind jedoch deutlich vermindert. Das *endoplasmatische Reticulum* ist nur dort leicht geschwollen, wo auch die Mitochondrien geschwollen sind. Die Fetttropfen sind leicht vermehrt, etwa wie bei den Überdosierungsversuchen; ihre Größe liegt zwischen 0,1—0,7 μ . Die *Myofibrillen* sind intakt. Die Abstände der Z-Streifen betragen 0,7—1,2 μ . Kontrakturen sind nicht zu erkennen. Die Kerne sind unverändert. An den *Protomembranen* der Herzmuskelzellen sind die Membranvesiculationen vereinzelt etwas vermehrt. Die *Glanzstreifen* sind überall intakt; Dehiszenzen finden sich nicht. Die *Blutcapillaren* zeigen nur selten leicht geschwollene Endothelzellen; doch finden sich in den meisten Endothelzellen reichlich Mikropinocytosebläschen.

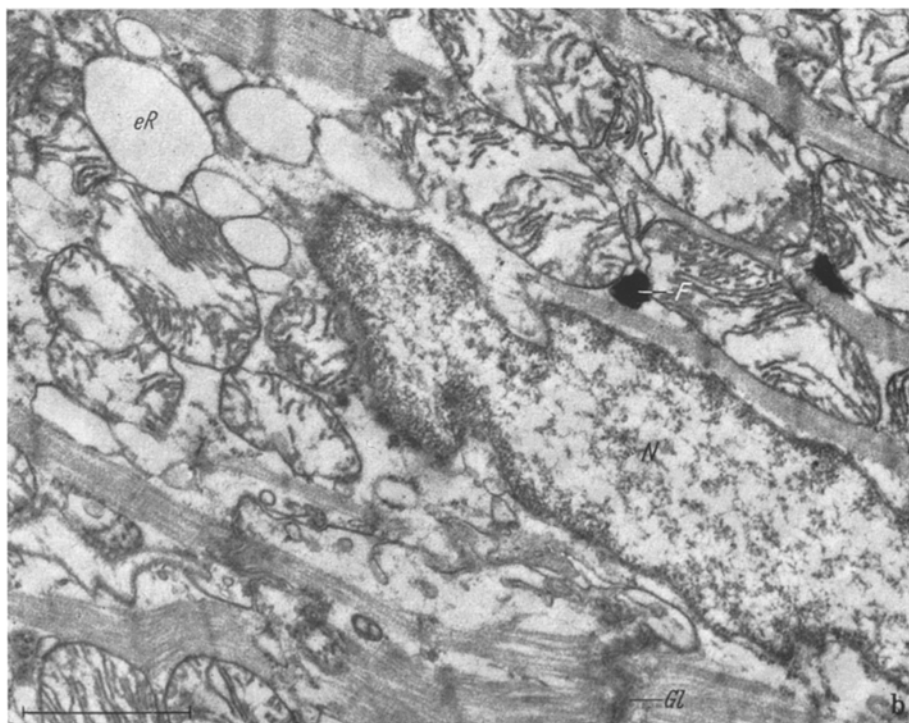
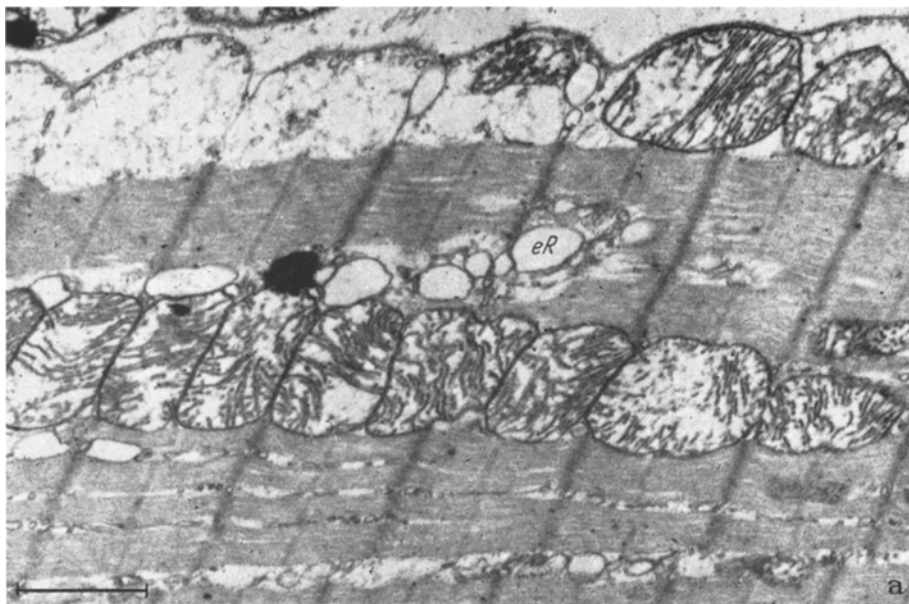


Abb. 1a u. b. Herzmuskel der Ratte 30 min nach Injektion von 2 mg/kg Alupent i.p. (Überdosierungsversuch I). Das Grund Sarkoplasma ist aufgehellte und geschwollen. Das Sarkolemm arkadenförmig abgehoben; leichte Vermehrung der Vesiculationen an der Protomembran. Die Mitochondrien sind geschwollen und zeigen marginale und zentrale Membrandestruktionen. Das endoplasmatische Reticulum (*eR*) ist erweitert. Die Myofibrillen sind intakt. Das Karyoplasma (*N*) ist aufgelockert und am Rande etwas verdichtet. Intakter Glanzstreifen (*GL*); Fetttröpfchen (*F*). a Arch.-Nr. 2870 B, elektronenoptisch 4550:1, Endvergrößerung 17000:1. b Arch.-Nr. 2874 B, elektronenoptisch 5800:1, Endvergrößerung 22000:1

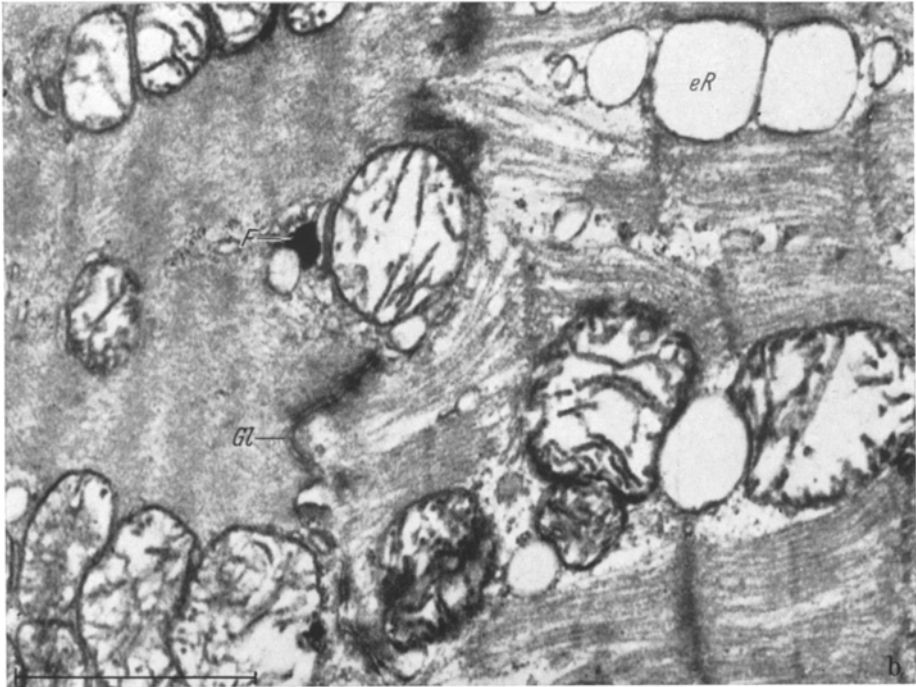
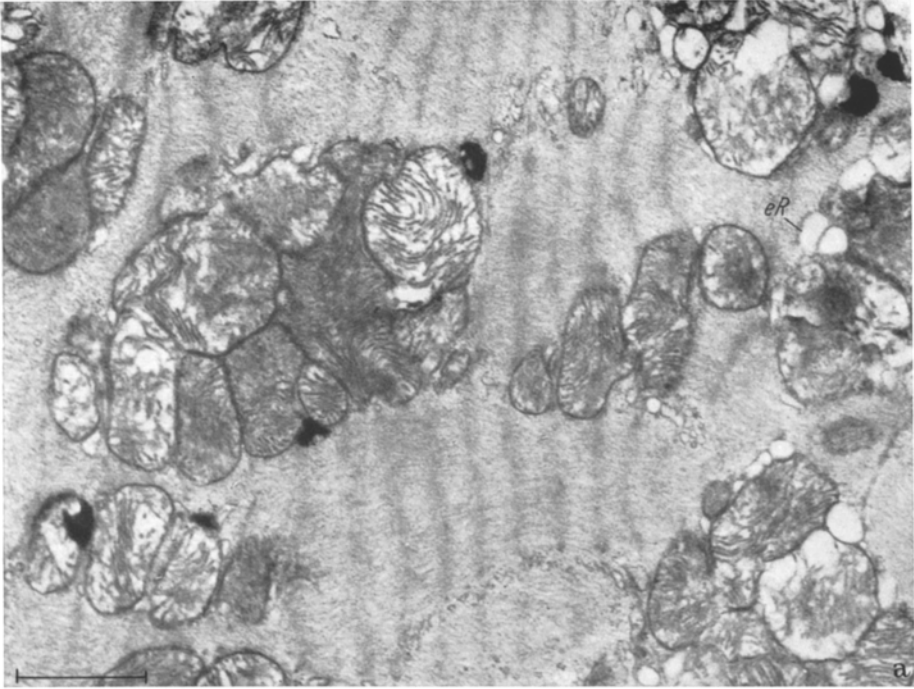


Abb. 2a u. b. Herzmuskel der Ratte 100 min nach Injektion von 10 mg/kg Alupent i.p. (Überdosierungsversuch II). a Die Myofibrillen zeigen Kontraktionen mit Z-Abständen bis zu $0,3 \mu$. Die Mitochondrien zum Teil verdichtet, zum Teil geschwollen. Das endoplasmatische Reticulum (*eR*) ist stellenweise erweitert. b In der linken Bildhälfte ist eine Kontraktur mit verwischten Z-Streifen (*Z*) zu erkennen. In der angrenzenden Herzmuskelzelle (rechte Bildhälfte) sind die Myofibrillen aufgelockert und aufgesplittet. Die Mitochondrien sind geschwollen, mit Verlust von Innenmembranen. Das endoplasmatische Reticulum (*eR*) ist stark erweitert. Glanzstreifen (*GL*); Fetttropfen (*F*). a Arch.-Nr. 3076 E, elektronenoptisch 4550:1, Endvergrößerung 17000:1, b Arch.-Nr. 3078 D, elektronenoptisch 8250:1, Endvergrößerung 31500:1

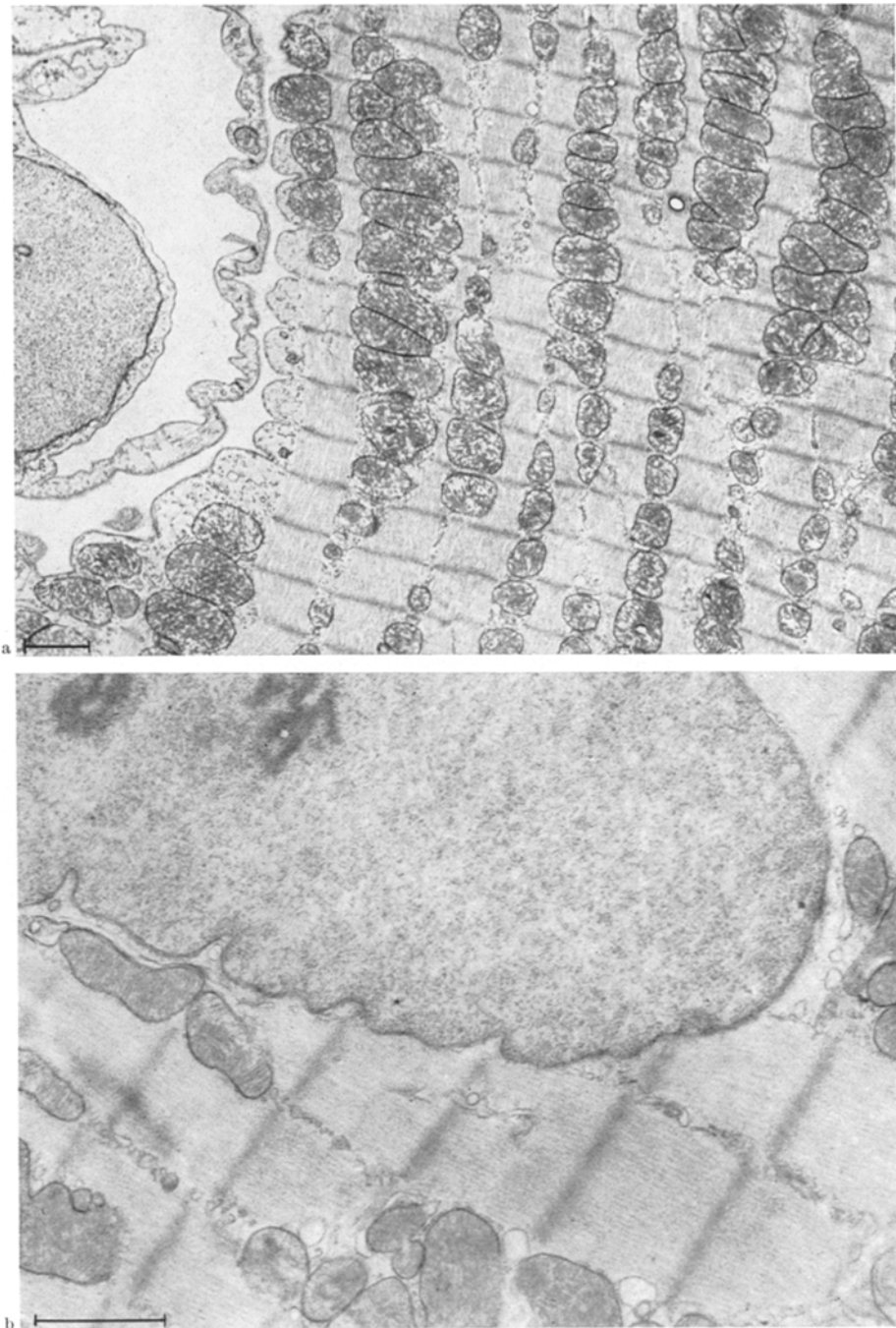


Abb. 3a u. b. Herzmuskel der Ratte nach dreimaligem Unterdruck entsprechend einer Höhe von 10000 m mit vorheriger Gabe von 0,1 mg/kg Alupent i.p. Die Übersicht zeigt das Bild eines fast normalen Herzmuskels. Das Grund Sarkoplasma ist nur gering aufgehellt. Die Mitochondrien zeigen nur stellenweise eine kleinfleckige Aufhellung der Matrix, Mitochondriengranula sind allerdings nicht zu erkennen. Die Myofibrillen sind intakt. Das endoplasmatische Reticulum ist unauffällig. Der Zellkern ist unverändert. Die Blutcapillare ist regelrecht weit. a Arch.-Nr. 3121 A, elektronenoptisch 2200:1, Endvergrößerung 8400:1, b Arch.-Nr. 3113 D, elektronenoptisch 4550:1, Endvergrößerung 17000:1

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen sollte die Wirkung hoher Dosen von Alupent auf die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte geprüft werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob die nach wiederholten Unterdruckversuchen auftretenden Herzmuskelveränderungen durch vorherige Gaben von Alupent beeinflusst werden können. Lichtmikroskopisch fanden sich nach Gabe von 2 mg/kg Alupent i.p. (Überdosierungsversuch I) besonders in den inneren Schichten des Herzmuskels ein deutlicher Glykogenschwund sowie vereinzelt hyaline Querbänder. Elektronenmikroskopisch waren neben fast unveränderten Herzmuskelzellen solche mit Aufhellung und Schwellung des Grundsarkoplasmas, Schwellung der Mitochondrien mit diffuser oder fleckiger Aufhellung der Matrix und Fragmentierung der Cristae sowie mit Verminderung der Mitochondriengranula, ferner mit einer deutlichen Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums zu erkennen. Einzelne Capillarendothelzellen waren geschwollen und zeigten eine Vermehrung der Mikropinocytose. Nach Gaben von 10 mg/kg Alupent i.p. (Überdosierungsversuch II) war lichtmikroskopisch der Glykogenschwund weniger deutlich, offenbar weil die Tiere länger überlebt haben als beim Überdosierungsversuch I. Vereinzelt traten auch Glanzstreifendehiszenzen auf. Elektronenmikroskopisch unterschieden sich die Veränderungen qualitativ nicht von denen beim Überdosierungsversuch I, quantitativ waren sie jedoch wesentlich stärker ausgeprägt: Es fanden sich nur noch selten nicht oder wenig veränderte Herzmuskelzellen. Meistens waren die Mitochondrien mittelgradig geschwollen und enthielten kaum noch Granula. Das endoplasmatische Reticulum war stärker geschwollen, Kontrakturen der Myofibrillen waren häufiger zu finden. Diese Veränderungen unterschieden sich nicht wesentlich von dem Bild, das der Herzmuskel von Ratten nach einmaliger Hypoxie im Unterdruckversuch bietet (HAUSAMEN und POCHÉ). Diese Befunde lassen sich mit der blutdrucksenkenden Wirkung von Alupent erklären. Auch RONA u. Mitarb. sowie KORB und TOTVIĆ erklären die von ihnen bei Ratten durch Aludrin erzeugten Herzmuskelnekrosen mit der durch die Blutdrucksenkung bedingten Coronarinsuffizienz. Die quantitativen Unterschiede der Herzmuskelveränderungen beim Überdosierungsversuch I und II stimmen mit den Angaben von RONA u. Mitarb. sowie von KORB und TOTVIĆ überein, nach denen auch lichtmikroskopisch das Ausmaß der Schädigung des Herzmuskels mit Erhöhung der Dosis von Aludrin zunimmt.

Bei den Unterdruckversuchen nach vorherigen Gaben von Alupent erhoben wir einen überraschenden Befund: Lichtmikroskopisch ließ sich bei diesen Tieren im Herzmuskel zwar kein Glykogen nachweisen, aber auch hyaline Querbänder oder Nekrosen waren nicht vorhanden. Elektronenmikroskopisch waren die meisten Herzmuskelzellen fast unverändert: Es fanden sich hier lediglich eine nur sehr geringe Aufhellung des Grundsarkoplasmas, eine Verminderung der Mitochondriengranula und nur einige wenige Kontrakturen. Eine stärkere Aufhellung und Schwellung des Grundsarkoplasmas, leichte bis mittelgradige Schwellungen der Mitochondrien sowie eine Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums waren nur ausnahmsweise festzustellen; die Endothelzellen der diesen Herzmuskelzellen benachbarten Blutcapillaren waren mäßig stark geschwollen und zeigten eine vermehrte Mikropinocytose, ihre Lichtung war aber immer noch gut durchgängig.

Wir können also feststellen, daß Alupent im akuten Überdosierungsversuch am Herzmuskel zu Veränderungen führt, wie sie für eine Coronarinsuffizienz charakteristisch sind. Im Unterdruckversuch, d.h. bei einer exogenen Hypoxie, entfaltete Alupent jedoch paradoxerweise eine die Ultrastruktur der Herzmuskelzellen und Capillarendothelzellen erhaltende Wirkung. Wie diese Wirkung zustande kommt, inwieweit sie dosisabhängig ist, und welche Stoffwechselprozesse dabei eine Rolle spielen, läßt sich zur Zeit nicht übersehen, da entsprechende Stoffwechseluntersuchungen noch nicht vorliegen.

Zusammenfassung

Bei männlichen Albinoratten führt eine Überdosierung von Alupent® (2 mg/kg bzw. 10 mg/kg i.p.) am Herzmuskel zu hypoxischen Veränderungen: Aufhellung des Grundsarkoplasmas mit Glykogenverlust, Schwellung der Mitochondrien mit Verlust von Innenmembranen und Verminderung der Mitochondriengranula, Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums. Als Ursache dieser Veränderungen — die mit steigender Dosis zunehmen — ist eine durch die blutdrucksenkende Wirkung von Alupent bedingte Coronarinsuffizienz anzusehen.

Männliche Albinoratten, die dreimal im Abstand von je 24 Std nach i.p. Injektion von 0,1 mg/kg Alupent einem Unterdruck von 60 min Dauer entsprechend einer Höhe von 10000 m ausgesetzt wurden, ließen — abgesehen von einem weitgehenden Schwund der Mitochondriengranula — keine wesentlichen hypoxischen Herzmuskelveränderungen erkennen. Alupent, das in hoher Dosierung selbst hypoxische Veränderungen des Herzmuskels hervorruft, ist also in therapeutischer Dosierung in der Lage, die Ultrastruktur des Herzmuskels bei einer exogenen Hypoxie weitgehend zu stabilisieren.

Electron Microscopic Studies of the Action of Alupent® on the Ultrastructure of the Rat Myocardium

Summary

An overdose of Alupent® (2 mg/kg and 10 mg/kg ip.) in male albino rats leads to hypoxic changes in the heart muscle, such as: clearing of the ground sarcoplasm with loss of glycogen, mitochondrial swelling with disappearance of inner membranes and a decrease in the mitochondrial granules, and a widening of the endoplasmic reticulum. A coronary insufficiency due to the hypotensive action of Alupent is regarded as a cause of these changes which increase with rising doses.

After an ip. injection of 0.1 mg/kg Alupent, male albino rats were exposed for 60 minutes on 3 occasions at intervals of 24 hours each to a hypobaric pressure equivalent to a height of 10,000 m. No important hypoxic changes were evident in their myocardium except for an extensive disappearance of the mitochondrial granules. Although Alupent itself in large doses calls forth hypoxic myocardial changes, it is able, nevertheless, in therapeutic doses to stabilize the ultrastructure of the myocardium during an exogenous hypoxia.

Literatur

- EFFERT, S., u. H. W. SCHMIDT: Isopropylnoradrenalin bei anfallsweisem Kammerflimmern. Dtsch. med. Wschr. 87, 880—883 (1962).
HAUSAMEN, T.-U., u. R. POCHÉ: Die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte nach einmaligen und wiederholten Unterdruckversuchen. Virchows Arch. path. Anat. 339, 212—224 (1965).

- KORB, G., u. V. TOTVIĆ: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel nach einer kurzfristigen Coronarinsuffizienz. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 475—484 (1963a).
- — Über Spätveränderungen im Herzmuskel der Ratte nach experimenteller Coronarinsuffizienz. Frankfurt. *Z. Path.* **73**, 175—181 (1963b).
- NATHANSON, M. H., and H. MILLER: Effect of 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol (isopropylpinephrine) on the rhythmic property of the human heart. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **70**, 633 (1949).
- RONA, G., C. J. CHAPPEL, T. BALAZS, and R. GAUDRY: An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch. Path.* **67**, 443—455 (1959).
- D. S. KALM, and C. J. CHAPPEL: Study on the healing of cardiac necrosis in the rat. *Amer. J. Path.* **39**, 473—498 (1961).

Prof. Dr. med. R. POCHÉ

Oberarzt des Pathologischen Institutes der Medizinischen Akademie in Düsseldorf
4 Düsseldorf, Moorenstr. 5