

Lipidchemische Untersuchungen zur Frage der degenerativen Myokardverfettung* **

F. LINDLAR und I. A. ZAKI

Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend (Direktor: Prof. Dr. W. MASSHOFF)

Eingegangen am 28. Januar 1966

Die Beteiligung der Lipide an der Strukturbildung und an der Energieversorgung des Myokards erhellt aus der Tatsache, daß die Herzmuskelzelle auf Grund ihres hohen Gehaltes an Mitochondrien und endoplasmatischem Reticulum phosphatidreich ist, ferner daß sie einen großen Teil ihres Energiebedarfes aus der Veratmung von freien höheren Fettsäuren, insbesondere Ölsäure, deckt (ROTHLIN u. BING, 1961).

Vom Standpunkt der pathologischen Anatomie und Histologie interessieren die nicht strukturgebundenen Fettstoffe der Herzmuskelfaser vom Moment ihrer lichtmikroskopischen Darstellbarkeit als sudanophile Substanzen. In diesem Falle stellen sie einen pathologischen Befund dar, der die funktionelle Beeinträchtigung des Myokards anzeigt. LINZBACH (1952) deutet die bei der degenerativen Myokardverfettung auftretenden Lipide überwiegend als Glyceride.

Bei morphologischen und chemisch-analytischen Untersuchungen am Herzmuskel des Menschen ist man in erster Linie auf autoptisches Gewebsgut angewiesen. Dieses weist immer postmortale Veränderungen auf, deren Kenntnis für die Deutung von Befunden unerlässlich ist. Daß Organlipide bei der Autolyse charakteristische Abwandlungen erfahren, konnte in früheren Untersuchungen bewiesen werden (LINDLAR, 1962; MASSHOFF u. Mitarb., 1964). Die vorliegenden Untersuchungen haben das Ziel, mit Hilfe morphologischer und chemischer Verfahren Möglichkeiten und Grenzen der Auswertung lipidchemischer Befunde an Leichenherzen aufzuzeigen.

Material und Methodik

Als Ausgangsmaterial für die Hauptversuchsserie dienten 40 normale bzw. degenerativ verfettete Leichenherzen von Menschen beiderlei Geschlechts zwischen 60 und 80 Jahren. Die Obduktion der bei 0° C gekühlten Leichen erfolgte 14—64 Std nach dem Tode. Unmittelbar nach der Sektion des Herzens wurden aus der Hinterwand des linken Ventrikels 4—8 g schwere fettgewebtsfreie Myokardstücke herauspräpariert und halbiert. Die eine Hälfte wurde zur histologischen Untersuchung in 10%igem Formalin fixiert, die andere genau gewogen, mit der Schere so fein wie möglich zerkleinert und wie früher beschrieben (MASSHOFF u. Mitarb., 1964) extrahiert und lipidchemisch aufgearbeitet. Zusätzlich wurden folgende drei Versuchsserien angesetzt:

1. Systematische Autolyse eines 1 Std nach dem Tode entnommenen Herzens, Analyse der nach 1—72 Std extrahierten Lipide. 2. Herzen von Ratte, Meerschweinchen, Huhn, Kaninchen und Hund unmittelbar nach der Tötung entnommen und extrahiert. 3. Dün-

* Auszug aus der Dissertation von I. A. ZAKI, Hamburg 1966.

** Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

schichtchromatographische Trennung (MANGOLD u. Mitarb., 1961) der Chloroform-Methanol-(CM-)Extrakte nach 1-, 2- und 4wöchiger Aufbewahrung bei 0° C, Zimmertemperatur und 65° C.

Ergebnisse

Der Gesamtlipidgehalt der 40 Leichenherzen liegt zwischen 7,4 und 19,3% bezogen auf das Trockengewicht, die Phosphatide betragen 4,9—8,8%, das Cholesterin 1,0—2,1%. Die aus der Differenz zwischen Gesamtlipiden einerseits, Phosphatiden und Cholesterin andererseits errechnete Neutralfettfraktion macht zwischen 0,1 und 12,0% der Trockenmasse aus. Es fand sich, daß die Werte für Phosphatide und Cholesterin korrespondieren, ferner daß die Menge der Gesamtlipide wesentlich von der Größe der Neutralfettfraktion abhängt. Diese Verhältnisse finden sich in Abb. 1 graphisch dargestellt.

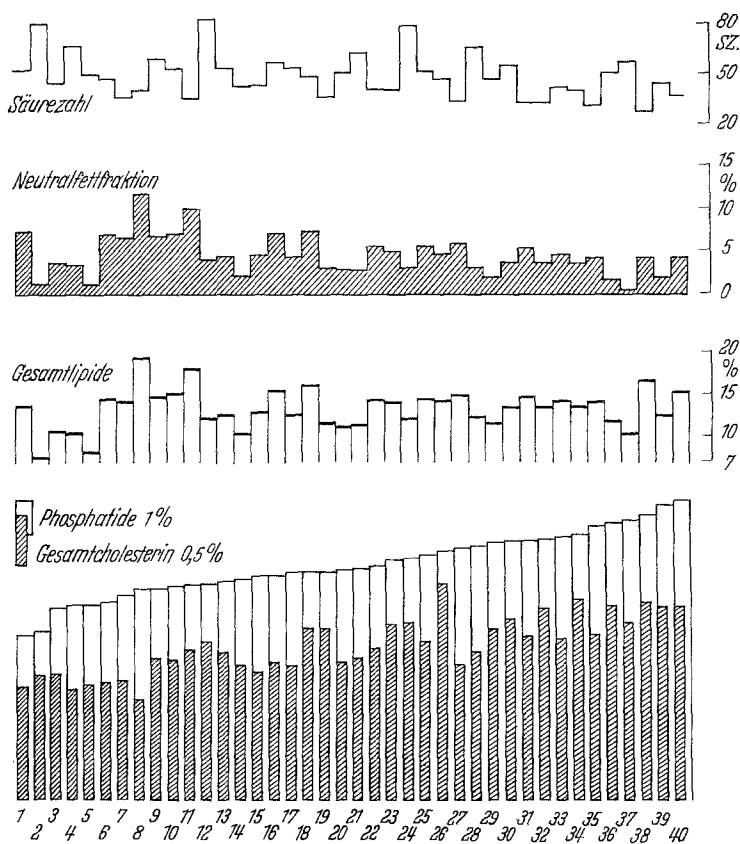


Abb. 1. Phosphatide, Gesamtcholesterin, Gesamtlipide und Neutralfettfraktion in % der Trockensubstanz; Säurezahl

a) Veränderungen an den Lipiden von Leichenherzen

Bei der qualitativen dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Neutralfettfraktion fanden sich überraschend in den verschiedenen Proben erhebliche zunächst kaum erklärbare Unterschiede in der Beziehung zwischen Triglyceriden, freien Fettsäuren (FFS), Fettsäuremethylestern (FSME) und höheren Aldehyden. Für das Auftreten von größeren Mengen FFS ließ sich an

Hand eines einfachen Autolyseversuches eine hinreichende Erklärung finden. Ein leichter Anstieg der FFS bereits von der 12. Std, ein starker Anstieg etwa vom 3. Autolysetag an geht mit einem entsprechenden Abfall der Triglyceride einher. Bei der Überprüfung der Zeiten zwischen Eintritt des Todes und Obduktion bzw. Beginn der Lipidextraktion fand sich, daß im allgemeinen um so mehr FFS auftreten, je länger die Leiche gelegen hatte. Frisch extrahierte Tierherzen zeigen ebenso wie das 1 Std nach dem Tode entnommene, frisch extrahierte Menschenherz nur kleine Mengen FFS. FSME treten dünnstichtchromatographisch in allen bisher untersuchten Organen nur in kleinen Mengen auf, sofern die verwendeten CM-Extrakte bald nach der Gewinnung analysiert werden. Gekühlte Extrakte zeigen selbst nach längerer Aufbewahrung keine größeren Mengen FSME, bei Zimmertemperatur gelagerte oder stärker erwärmte Extrakte sind reich an diesen Estern, Tierherzen enthalten keine oder nur Spuren FSME.

Freie höhere Aldehyde kommen bereits in frisch aufgearbeiteten Herzen vor, verschwinden aber am 3. Autolysetag, wahrscheinlich indem sie zu Fettsäuren oxydiert werden.

Aus den Befunden ergibt sich das Vorliegen eines Autolyseeffektes, wenn die in allen Herzen in größerer Menge vorhandenen Triglyceride zugunsten der FFS abnehmen, eines Aufbewahrungseffektes, wenn die FSME auf Kosten der FFS zunehmen (Reaktion der FFS mit dem Methanol des CM-Gemisches unter Bildung von FSME). Für die Beantwortung der Frage nach effektiven Unterschieden im Gehalt an Neutralfett, FFS, FSME und Aldehyden sind daher autoptisch gewonnene Herzen kaum zu verwerten. Die aus den aufgeführten Lipiden bestehende Fraktion als Ganzes dürfte sich indessen bei den beschriebenen Ab- und Umbauvorgängen an ihren Komponenten quantitativ nicht wesentlich ändern. Diese Feststellung bildet die Voraussetzung für die Deutung der Befunde an degenerativ verfetteten Herzen, über die noch zu berichten sein wird.

Bei der qualitativen papierchromatographischen Untersuchung der Phosphatide auf Kieselgelpapier fanden sich ziemlich starke Differenzen hinsichtlich der Lecithine, Kephaline, Plasmalogene und ihrer Lysoverbindungen; Sphingomyelin, Cardiolipin und Inositphosphatide bleiben weitgehend konstant. An Hand der Papierchromatographie der bereits dünnstichtchromatographisch analysierten Autolyseserie eines Herzens vom Menschen konnten die betreffenden Lipidveränderungen als postmortal gedeutet werden. Die Abnahme der Esterphosphatide und des Plasmalogen wird von einer Zunahme der Lysophosphatide begleitet. Leichenherzen mit viel Lysophosphatiden sind arm an Lecithinen, Kephalinen und Plasmalogen, reich an FFS und (oder) FSME und arm an Triglyceriden. Phosphatid- und Neutralfettabbau während der Autolyse verhalten sich gleichsinnig.

b) Über die Lipide des normalen und des degenerativ verfetteten Myokard

Bei den stärkeren Formen der degenerativen Myokardverfettung finden sich sudanophile Tröpfchen oft in einem Ausmaß, das zur Annahme eines lipidchemisch faßbaren zumindest quantitativen Äquivalents zwingt. (Bestimmte Formen feinstäubiger Verfettung, die mit Scharlachrot kaum sichtbar werden, ließen sich

mit Sudanschwarz B eindrucksvoll zur Darstellung bringen; zuweilen ließ sich erst nach Anwendung dieser Färbung das Ausmaß einer Verfettung abschätzen.)

Es wurde gezeigt, daß sich infolge autolytischer Veränderungen die relative Zusammensetzung der Lipide des Myokards ändert. Trotzdem dürfte die Menge der Gesamtlipide nicht nennenswert abnehmen, weil bei der Aufspaltung von Triglyceriden in freie Fettsäuren und Glycerin einerseits, beim Zerfall von Phosphatiden in freie Fettsäuren und Lysoverbindungen andererseits letztlich wieder nur Lipide (mit Ausnahme des Glycerins) in Form der genannten Abbauprodukte entstehen. Daher erschien es vertretbar, zunächst einmal die 40 Proben aus Leichenherzen nach ihrem Lipidgehalt so zusammenzustellen, daß am Anfang die mit wenig, am Ende die mit viel Gesamtlipiden stehen (Abb. 2). Bei der

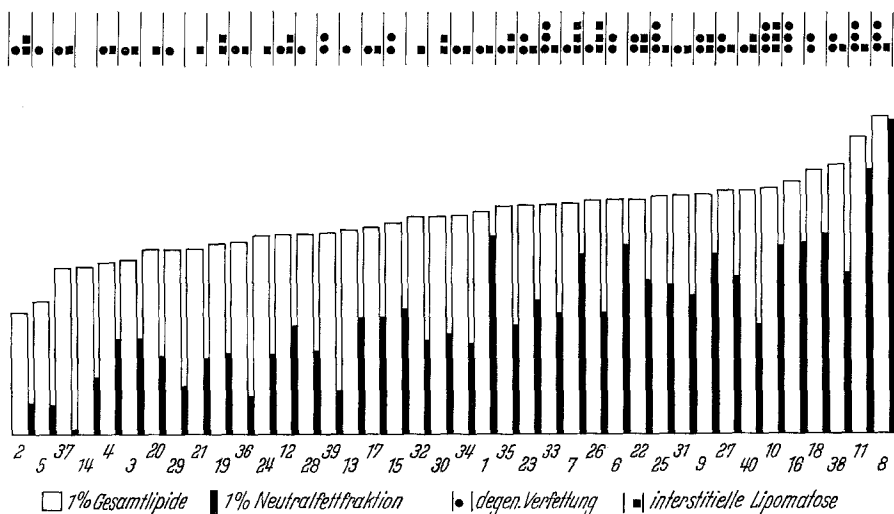


Abb. 2. Gesamtlipide und Neutralfettfraktion in % der Trockensubstanz. Oben das Ergebnis der fetthistologischen Untersuchung; Punkte degenerative Verfettung, Quadrate interstitielle Lipomatose. Numerierung vgl. Abb. 1

Zuordnung der entsprechenden Neutralfettfraktionen zeigt sich, wie schon aus der graphischen Darstellung in Abb. 1 hervorgeht, daß die Zunahme der Gesamtlipide von einer entsprechenden Zunahme der Neutralfettfraktion begleitet wird. Die histologische Untersuchung der zugehörigen Präparate ergab insofern Übereinstimmung mit den chemisch ermittelten Werten, als sich im großen ganzen bei niederem Gesamtlipid-(und Neutralfett-)Gehalt keine oder nur geringe, bei hohem eine starke degenerative Verfettung findet. Dieses Verhalten wurde in Abb. 2 zum Ausdruck gebracht, indem in der oberen Zeile der Darstellung je nach Grad der degenerativen Verfettung ein, zwei oder drei Punkte eingezeichnet wurden. Nun fand sich aber bei der histologischen Untersuchung, daß in einigen Fällen eine geringe, makroskopisch noch nicht in Erscheinung getretene interstitielle Lipomatose vorlag. Es war abzusehen, daß die hierbei auftretenden relativ großen Fetttropfen nicht ohne Einfluß auf das Ergebnis der lipidchemischen Untersuchung bleiben würden. In der Tat zeigten etwa fünf Proben mit histologisch nachgewiesener interstitieller Lipomatose einen höheren Gesamtlipidgehalt. Die (nur histologisch nachweisbare) interstitielle Lipomatose wurde in der oberen Zeile von Abb. 2 in Form schwarzer Quadrate eingezeichnet. Je

nach Menge wurden wie bei den Punkten für die degenerative Verfettung ein, zwei bzw. drei Quadrate für den jeweiligen Fall eingesetzt. Wie bereits betont, besteht kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der degenerativen Verfettung und der Höhe des Phosphatid- und Cholesterinwertes.

Der chemisch ermittelte Gehalt an Gesamtlipiden und an Neutralfett stellt also einen Gradmesser für das Ausmaß der degenerativen Myokardverfettung dar. Von etwa 14% Gesamtlipiden und etwa 5% Neutralfett an aufwärts zeigt der Vergleich mit dem histologischen Befund eine deutliche degenerative Verfettung. Die Lipide bei der interstitiellen Lipomatose, selbst wenn diese nur in mikroskopisch nachweisbarem Ausmaß vorliegt, beeinflussen erwartungsgemäß das Ergebnis der lipidchemischen Untersuchung. Phosphatide und Cholesterin als strukturbildende Lipide der Herzmuskelfaser haben mit der degenerativen Verfettung nichts zu tun.

Diskussion

Auf die Frage nach den Ursachen der degenerativen Myokardverfettung soll hier nicht näher eingegangen werden. Zum Mechanismus der Verfettung ist nach den mitgeteilten Ergebnissen in Verbindung mit bekannten Befunden seitens der Herzphysiologie zu bemerken, daß die mit dem Blutstrom angebotenen freien höheren Fettsäuren beispielsweise infolge Hypoxie nicht in genügendem Umfang veratmet werden können; sie werden vermehrt in Triglyceride eingebaut, welche die Herzmuskelzelle nachgewiesenermaßen nicht umzusetzen vermag (BERNSMEIER u. Mitarb., 1965). So bilden die aus den FFS des Blutes in der Herzmuskelzelle entstandenen, in tropfiger Form abgelagerten Triglyceride das alleinige Substrat der degenerativen Verfettung.

Freie höhere Fettsäuren sind in kleiner Menge in jedem lebensfrischen Myokard vorhanden. Fallen sie bei der Autolyse in vermehrtem Umfang an, so stammt der Überschuß aus der hydrolytischen Spaltung der Phosphatide und Triglyceride sowie aus höheren Aldehyden, deren CHO-Gruppe zur Carboxylgruppe oxidiert worden ist. Die Säurezahl in Lipidextrakten (Abb. 1, oben) erwies sich als ein unsicheres Maß für die Menge der FFS, wahrscheinlich weil sie durch saure Gruppen in Phosphatiden und Sulfatiden mitbestimmt wird.

In den mitgeteilten eigenen Untersuchungen beträgt der niederste Lipidwert 7,4%. KÁDAS u. Mitarb. (1964) fanden an Hand der chemischen Analyse von 123 Leichenherzen in zahlreichen Fällen Werte unter 7%, Minima lagen bei 2–3%. Herzlipidwerte von wesentlich weniger als 7% sind unseres Erachtens höchstens in Schwielenewebe denkbar. Andererseits dürfte es bei der von KÁDAS angewandten Methode der Lipidgewinnung aus bei über 100° C 2 Tage lang getrocknetem Gewebsgut nicht ausgeschlossen sein, daß sich insbesondere die polyensäurereichen Phosphatide bereits vor der Extraktion irreversibel verändert haben, wodurch sie bekanntlich gegenüber sämtlichen Solventien unlöslich werden können.

Zusammenfassung

Degenerativ verfettetes Myokard enthält je nach Ausmaß der Verfettung rund 14–19% Gesamtlipide, davon etwa 5–12% Neutralfett. Phosphatide und Cholesterin als strukturbildende Lipide der Herzmuskelfaser haben, wie nach bekannten morphologischen Befunden zu erwarten, mit der degenerativen Myokardverfettung nichts zu tun.

Bei der sterilen Autolyse *in vitro* wie auch bei postmortalen Vorgängen *in situ* werden im Myokard Triglyceride, Lecithine, Kephaline und Plasmalogene in unterschiedlichem Umfang gespalten. Dabei entstehen hauptsächlich lipoide Abbauprodukte in Form von freien Fettsäuren und Lysophosphatiden. Fettsäuremethylester entstehen durch spontane Veresterung freier Fettsäuren in methanolhaltigen Extraktionsgemischen. Die postmortalen Veränderungen schränken den Aussagewert der an Leichenherzen zu erhebenden qualitativen lipidchemischen Befunde erheblich ein.

Chemical Investigations of Lipids in Fatty Degeneration of the Myocardium

Summary

The myocardium in fatty degeneration contains from 14 to 19% of total lipids, including 5 to 12% of neutral fat. Phosphatides and cholesterol are the structural lipids of myocardial fibers and are, in accordance with morphological findings, not involved in fatty degeneration of the myocardium.

During sterile autolysis of the myocardium *in vitro* as well as in the post-mortem myocardium *in situ*, triglycerides, lecithines, cephalines and plasmalogenes are broken down. The main products of the dissolution are free fatty acids (FFA) and lysophosphatides. In addition, methyl esters of fatty acids form during storage of the methanolic extracts due to the spontaneous esterification of FFA. It is concluded that because of postmortem changes, the value of qualitative lipid-chemical findings of autopsy hearts is considerably restricted.

Literatur

- BERNSMEIER, A., u. W. RUDOLPH: Die Fettsäuren im Stoffwechsel des Herzmuskels. Dtsch. med. Wschr. **90**, 743—749 (1965).
- KÁDAS, I., M. NÉMETH-CSÓKA, E. PINTER u. M. SIMON: Chemische Analyse und vergleichende histologische Untersuchung von Leichenherzen. I. Untersuchung von Erwachsenenherzen. Zbl. allg. Path. path. Anat. **106**, 16—20 (1964).
- LINDLAR, F.: Das Auftreten von Lysophosphatiden bei der Autolyse. Naturwissenschaften **49**, 543—544 (1962).
- LINZBACH, A. J.: Über die vacuoläre Verfettung der Herzmuskelfasern. Virchows Arch. path. Anat. **321**, 611—622 (1952).
- MANGOLD, H. K., and N. TUNA: Analysis of tissue lipids by TLC and GLC. Fed. Proc. **20**, 268 (1961).
- MASSHOFF, W., F. LINDLAR u. H. J. STOLPMANN: Morphologische und lipidchemische Untersuchungen zur Autolyse von Leber und Pankreas. Virchows Arch. path. Anat. **337**, 340—352 (1964).
- ROTHLIN, M. E., and R. J. BING: Extraction and release of individual free fatty acids by the heart and fat depots. J. clin. Invest. **40**, 1380—1386 (1961).

Privat-Dozent Dr. FRIEDRICH LINDLAR
Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
1 Berlin 19, Spandauer Damm 130