

## Ultrastrukturelle Veränderungen des Herzmuskels bei Ratten unter polyensäurearmer Diät

L. VITALI-MAZZA, P. ANVERSA und O. VISIOLI

Institut für Anatomie und Histopathologie (Direktor: Prof. ARMANDO TARDINI)

Institut für Allgemeine Medizin und Therapie (Direktor: Prof. CARLO BIANCHI)  
der Universität Parma

Eingegangen am 5. September 1966

Ein Mangel an essentiellen Fettsäuren führt bei der Ratte zu Verschiebungen innerhalb der Lipidzusammensetzung und Veränderungen des Energie- und Lipidstoffwechsels (COLLINS, 1962; HAYASHIDA und PORTMAN, 1963; JOHNSON, 1963; MARTINELLI und PUDDU, 1963; SMITH und DE LUCA, 1963; VISIOLI u. Mitarb., 1966). Diese Veränderungen treten hauptsächlich in den Zellen der Leber und des Herzmuskels auf. Im einzelnen wurden ein geringer Anstieg der Phospholipide des Herzmuskels und eine deutlichere Erhöhung der unveresterten Fettsäuren mit gleichzeitiger starker Abnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren festgestellt (AAES-JØRGENSEN, 1961; FIDANZA und CONSTABLE, 1962; TURCHETTO u. Mitarb., 1963; RINETTI u. Mitarb., 1965). Es ist daher zu vermuten, daß diese biochemischen Veränderungen in ultrastrukturellen Veränderungen der Zellen ihre Entsprechung finden. Das gilt besonders für diejenigen Zellen, in denen Phospholipide und Lipoproteine, die ihrerseits einen bedeutenden Anteil an Polyensäuren aufweisen, am meisten vertreten sind. Wir haben daher elektronenoptische Untersuchungen an Herzmuskel und Leber polyensäurearm ernährter Ratten durchgeführt. Wir hofften mit Hilfe eventuell auftretender Veränderungen mehr darüber zu erfahren, welche Bedeutung den mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Zellaufbau zukommt und welche Mechanismen in der Zelle wirksam werden, um sich ihrem Fehlen anzupassen.

### Material und Methoden

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir 12 Wistar-Morini-Ratten, die sofort nach der Entwöhnung eine polyensäurearme und cholesterinreiche Kokosöldiät nach PFEIFER erhielten, deren genaue Zusammensetzung gaschromatographisch kontrolliert wurde (RINETTI u. Mitarb., 1965). Eine gleiche Anzahl Tiere erhielt eine ausgewogene Diät und diente als Kontrollgruppe.

Ein Teil der Ratten (4 Tiere der Kontrollgruppe und 6 Versuchstiere) wurde nach 45 und die übrigen nach 100 Tagen getötet. In beiden Gruppen der Versuchstiere zeigten sich Störungen in der körperlichen Entwicklung sowie die bekannten charakteristischen Hautveränderungen (AAES-JØRGENSEN, 1961), die jedoch an Intensität verschieden waren. Bei der Sektion war die Leber vergrößert, blaß und von gelblicher Farbe. Auch das Herzvolumen war vergrößert. Wegen der sofort erforderlichen Entnahme von Stücken für die Untersuchung im Elektronenmikroskop war eine genaue Gewichtsfeststellung nicht möglich. Bei gleichzeitig gezüchteten Ratten lag jedoch bei den Versuchstieren nach 45 Tagen Mangeldiät das Verhältnis Herz/Körpergewicht um 18% höher als bei den Kontrollen.

Was die Veränderungen des Lipidgehaltes betrifft, verweisen wir auf eine frühere Arbeit (RINETTI u. Mitarb., 1965), aus der ein deutlicher Abfall der Öl- und Arachidonsäure sowie der charakteristische Anstieg der Eikose-Triensäure hervorgeht.

Den Ratten wurde unter Pentothalnarkose das Herz entfernt, und kleine Stücke der Vorderwand aus beiden Herzkammern wurden 2 Std in 1%iger gepufferter Osmiumsäurelösung (pH 7,6) nach MILLONIG fixiert und in eine Araldit- und Vestopal W.-Lösung eingebracht. In einigen Fällen wurden der vordere Papillarmuskel der linken Herzkammer und ein Trabekel der rechten Herzkammer vorher unter Zug gespannt und in Osmiumsäure wie oben fixiert. Außerdem wurden Leberstückchen entnommen und nach den gleichen Methoden fixiert. Die Schnitte wurden nach Kontrastierung mit Blei nach den Methoden A und B von KARNOVSKY im Siemens Elmiskop I untersucht. Außerdem wurden Schnitte von ca. 1  $\mu$  Dicke hergestellt und nach Anfärbung mit 1%igem Toluidinblau in 1%iger Natriumkarbonatlösung lichtmikroskopisch untersucht.

### Ergebnisse

Die Betrachtung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop zeigt die Integrität der Muskelzellstruktur mit deutlicher Streifenzeichnung der Muskelfasern und normaler Lokalisation der Mitochondrien, deren Volumen im Vergleich zu den Kontrollen leicht vergrößert erscheint, jedoch ohne Veränderung ihrer Färbbarkeit.

Im *Elektronenmikroskop* bestätigt sich die Integrität der *Muskelfibrillen*. Lediglich in einem Fall waren die Muskelfasern in einem umschriebenen peripheren Bezirk verschwunden, wodurch ein watteartiges Bild mittlerer Dichte entsteht. In dieser Zone sieht man dichtere Bände, die mit den Z-Linien gleich verlaufen. Die Zellmembran erscheint nicht verändert. In den Bezirken unter dem Sarkolemm finden sich zahlreiche Einstülpungen derselben, welche sich in Fadennetzen fortsetzen, ein Zeichen dafür, daß eine pinocytäre Aktivität besteht, ähnlich wie sie bei den Kontrollen festgestellt wurde.

Gleichermaßen ist die Stellung der eingeschobenen Streifen absolut in Dekkung zu bringen mit denjenigen, die man normalerweise im Herzmuskel der Ratte findet, und nur selten beobachtet man Trennungslinien mit Vergrößerung des Interzellularraumes, die sich als Folge abnormer Kontraktionen nach der Entnahme, jedoch vor der Fixierung deuten lassen. Das Glykogen ist noch vorhanden, wenn auch in geringerer Menge als bei den Kontrollen. Es wurde keine Veränderung der Zahl der Lipofuszinkörnchen beobachtet.

Was die *Mitochondrien* angeht, so handelt es sich hierbei im wesentlichen um Veränderungen der Dimensionen, was eine Betonung der normalen volumetrischen Ungleichheit der Sarkosome bedingt (Abb. 1—3). In den Längsschnitten der Myokardzellen trifft man häufig Mitochondrien an, die sich in der Länge der verschiedenen Sarkomeren ausbreiten. Wir fanden bis zu 5 (Abb. 4). Ihre Konturen sind nicht regelmäßig, jedoch weisen sie abwechselnd Einschnürungen auf der Höhe der Z-Streifen und erhebliche Aufblähung der dazwischen liegenden Anteile auf. Die Volumenzunahme ist auch in den Quer- bzw. Schrägschnitten deutlich erkennbar. Hier sind die verschiedenen Einheiten überwiegend kreisförmig angeordnet und scheinen ineinander zu verschmelzen. Wenn auch die Bewertung schwierig ist, so erscheinen doch im Vergleich zu den Kontrollen die Cristae zahlenmäßig erhöht und unterschiedlich verteilt. In den Riesenmitochondrien nehmen sie in Bündeln einen parallelen oder leicht bogigen Verlauf (Abb. 4 u. 5). Daraus ergibt sich, daß trotz der beobachteten volumetrischen und strukturellen Veränderungen die Grundanordnung der Mitochondrien unversehrt geblieben ist (Abb. 3). Es liegen somit keine Zeichen für eine Rückbildung vor, wenn man von den Veränderungen in der Verteilung der Herde absieht, die aus zwei Grundarten bestehen: Die erste ist hauptsächlich diffus. Sie betrifft nur eine oder

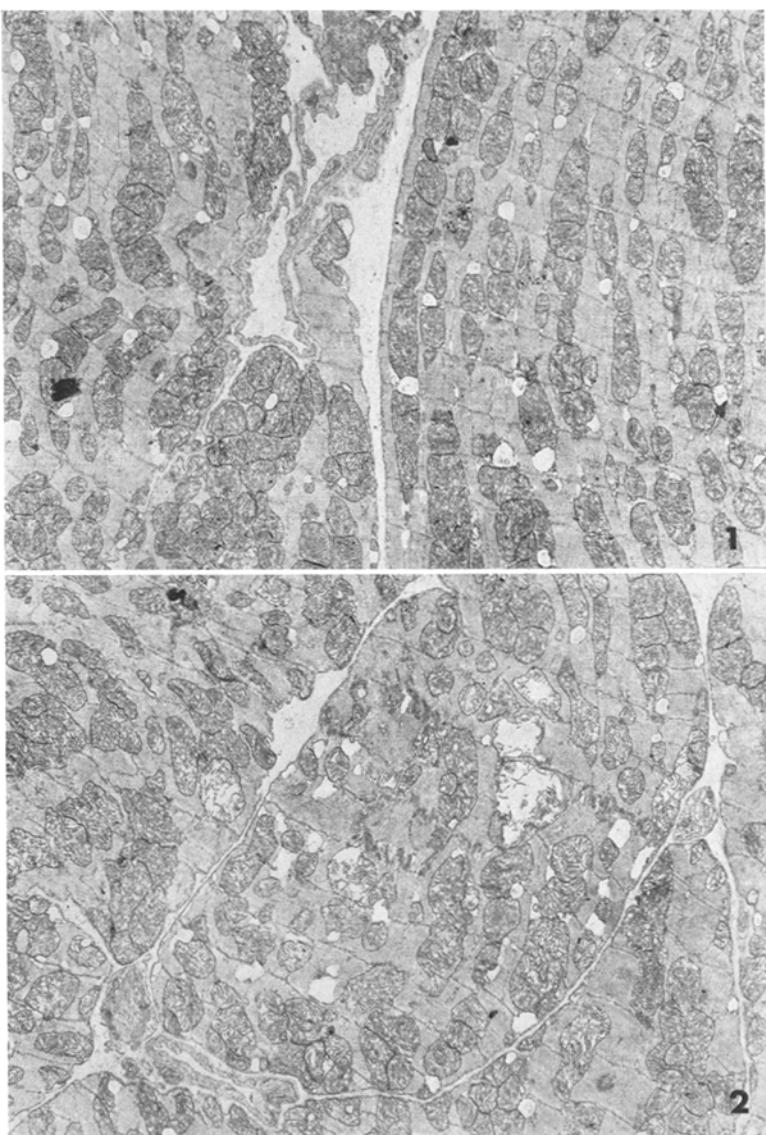


Abb. 1. Volumenzunahme der Mitochondrien mit zahlreichen Cristae bei erhaltenener Matrix. Die Profile des endoplasmatischen Reticulums sind erweitert. (Ratte 45 Tage Mangeldiät),  $\times 4650$

Abb. 2. Ähnliche Aufnahme wie oben: einige Mitochondrien erscheinen stark aufgebläht. (Ratte 100 Tage Mangeldiät),  $\times 4650$

mehrere Mitochondriensäulen und besteht aus einer Aufblähung, verbunden mit einer Aufhellung der Matrix und Abnahme der Cristae, die verzerrt und fragmentarisch erscheinen (Abb. 2, 6, 7). Die Mitochondrien können entweder teilweise oder in ihrer Gesamtheit betroffen sein, und in diesem Falle erscheinen leere Vacuolen, von einer Doppelmembran begrenzt, die mit der inneren Membranschicht verbunden ist, von der nur noch Reste von Cristae angetroffen werden.

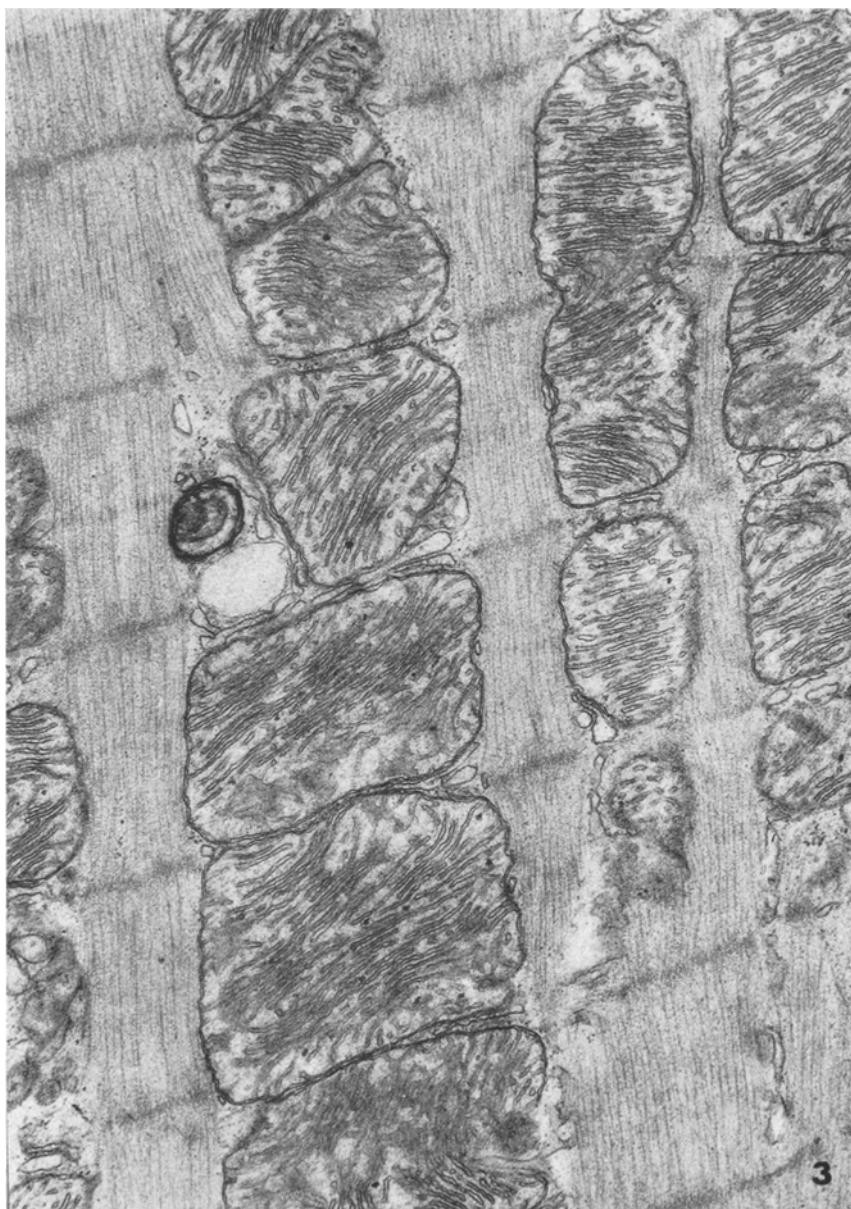


Abb. 3. Die Dimensionen der Mitochondrien sind sehr unterschiedlich. Die größeren herrschen vor. Die Matrix ist erhalten, die zahlreichen Cristae sind häufig parallel angeordnet. (Ratte 45 Tage Mangeldiät)  $\times 30000$

Die zweite, seltene Art besteht aus einer Veränderung der Dichte bei einigen Cristae, die intensiv osmiophil werden und Myelininformationen gleichen. Sie umgeben eine Kavität, die von einer dichten Membran begrenzt ist (Abb. 5, 10). Im Inneren der Matrix sind dagegen unregelmäßige Körper sichtbar, die aus einem Material verschiedener elektrischer Dichte, das von einer deutlichen Zwischen-

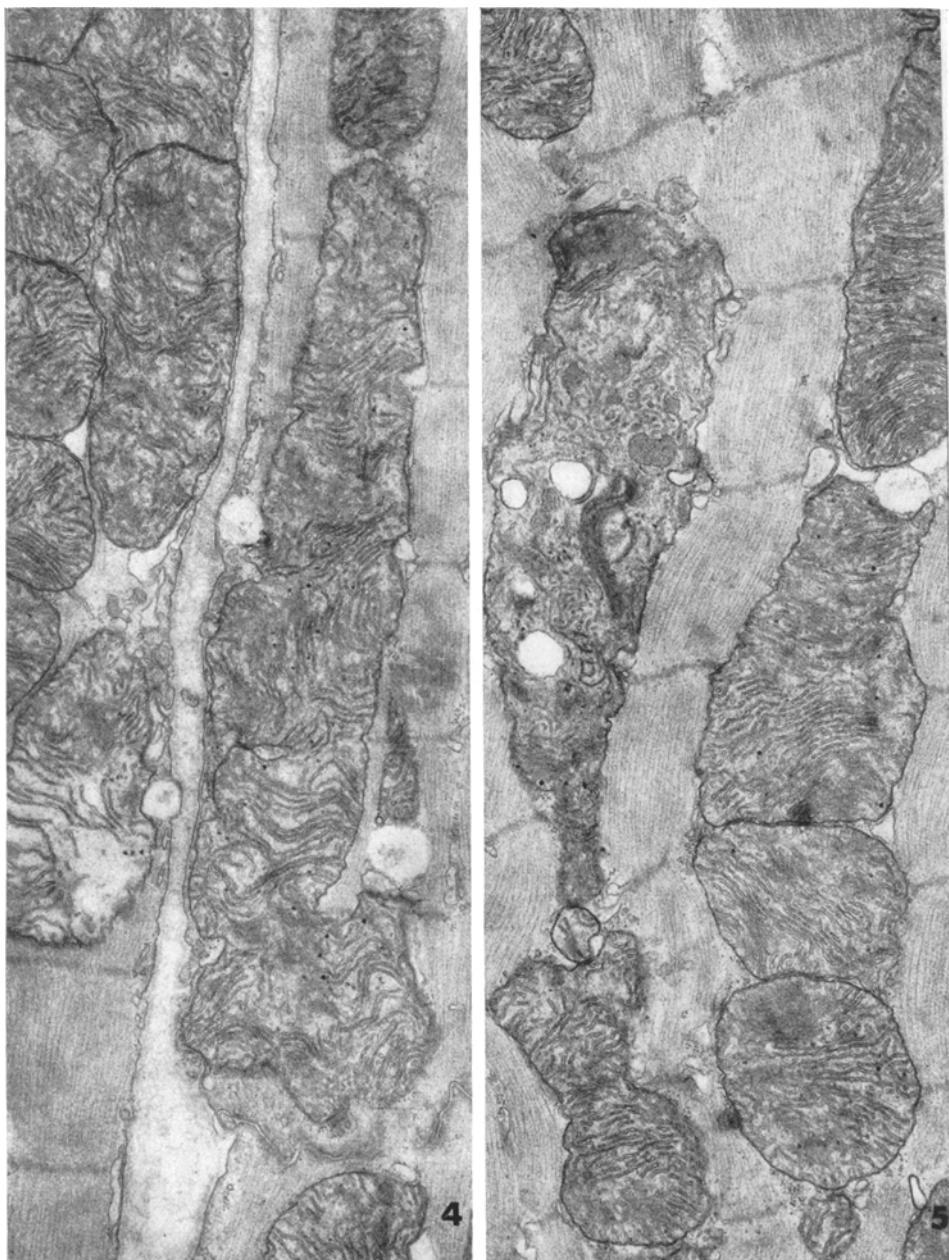


Abb. 4. Riesenmitochondrium mit segmentierten Konturen und Wucherungen der Z-Linien. Die Cristae sind verschieden angeordnet. Links sieht man ein partiell aufgeblähtes Mitochondrium. Die Integrität der kontrahierten Muskeffibrillen, der eingeschobenen Streifen und des Sarkolemm ist sichtbar. (Ratte 100 Tage Mangeldiät)  $\times 19250$

Abb. 5. Deutliche „Hypertrophie“ der Mitochondrien. In einem dieser Mitochondrien finden sich Myelinformationen, leere Vacuolen und elektronoptisch geringfügig undurchsichtige Körper, die unterschiedlich in den Matrices verteilt sind. (Ratte 100 Tage Mangeldiät),  $\times 19250$

schicht getrennt ist, bestehen und die mit osmiophilen Plättchen vermischt sind (Abb. 8—10).

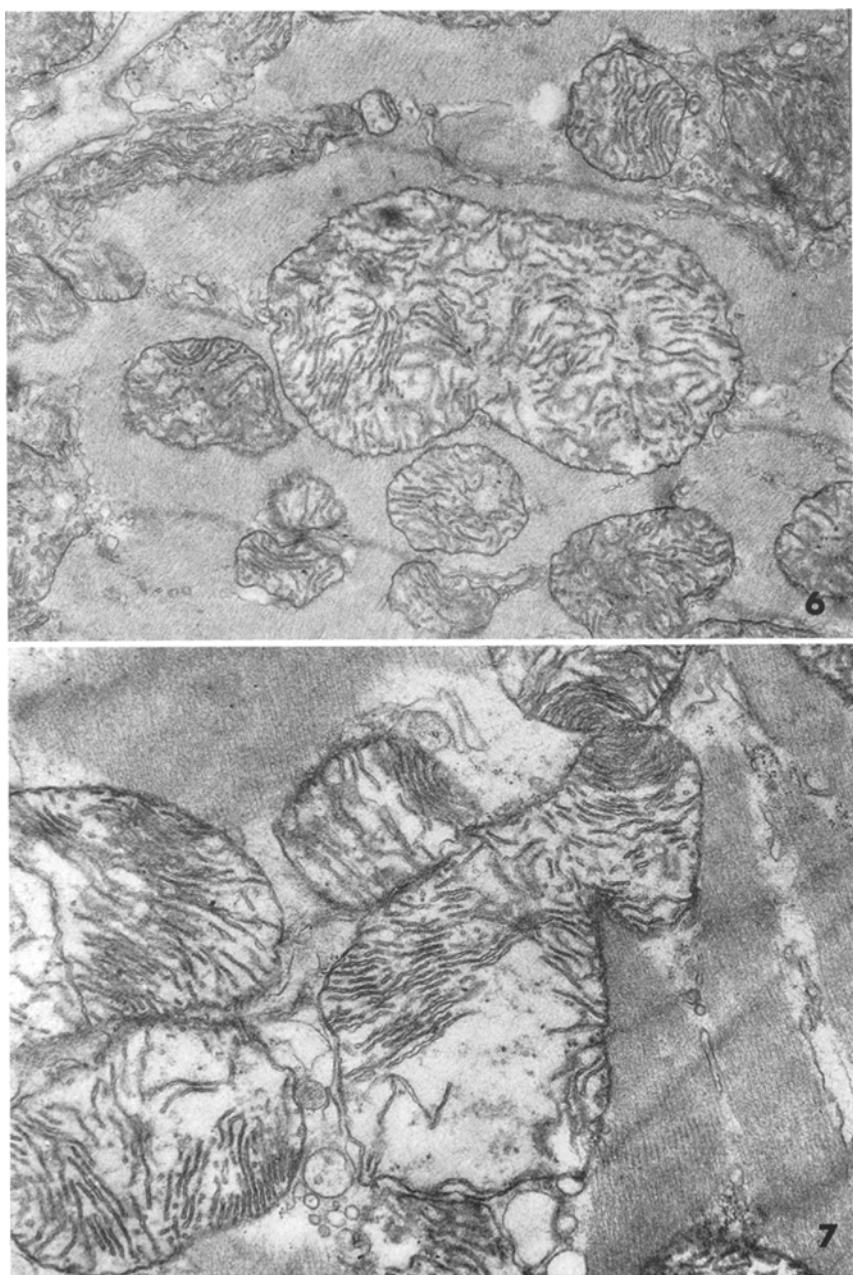


Abb. 6. Riesenmitochondrien mit charakteristischer Aufblähung und Aufhellung der Matrix bei Verringerung der Cristae. (Ratte 45 Tage Mangeldiät),  $\times 19250$

Abb. 7. Partielle Aufblähung mit Schwund der Matrix und der Cristae in einigen Mitochondrien. (Ratte 100 Tage Mangeldiät),  $\times 23000$

Die Leberveränderungen bestätigen grundsätzlich die Beobachtungen von WILSON und LEDUC, 1963, wenn auch die Vergrößerung der Mitochondrien weniger konstant ist und hierzu nur selten eine zentrale Erhöhung der Cristae mit

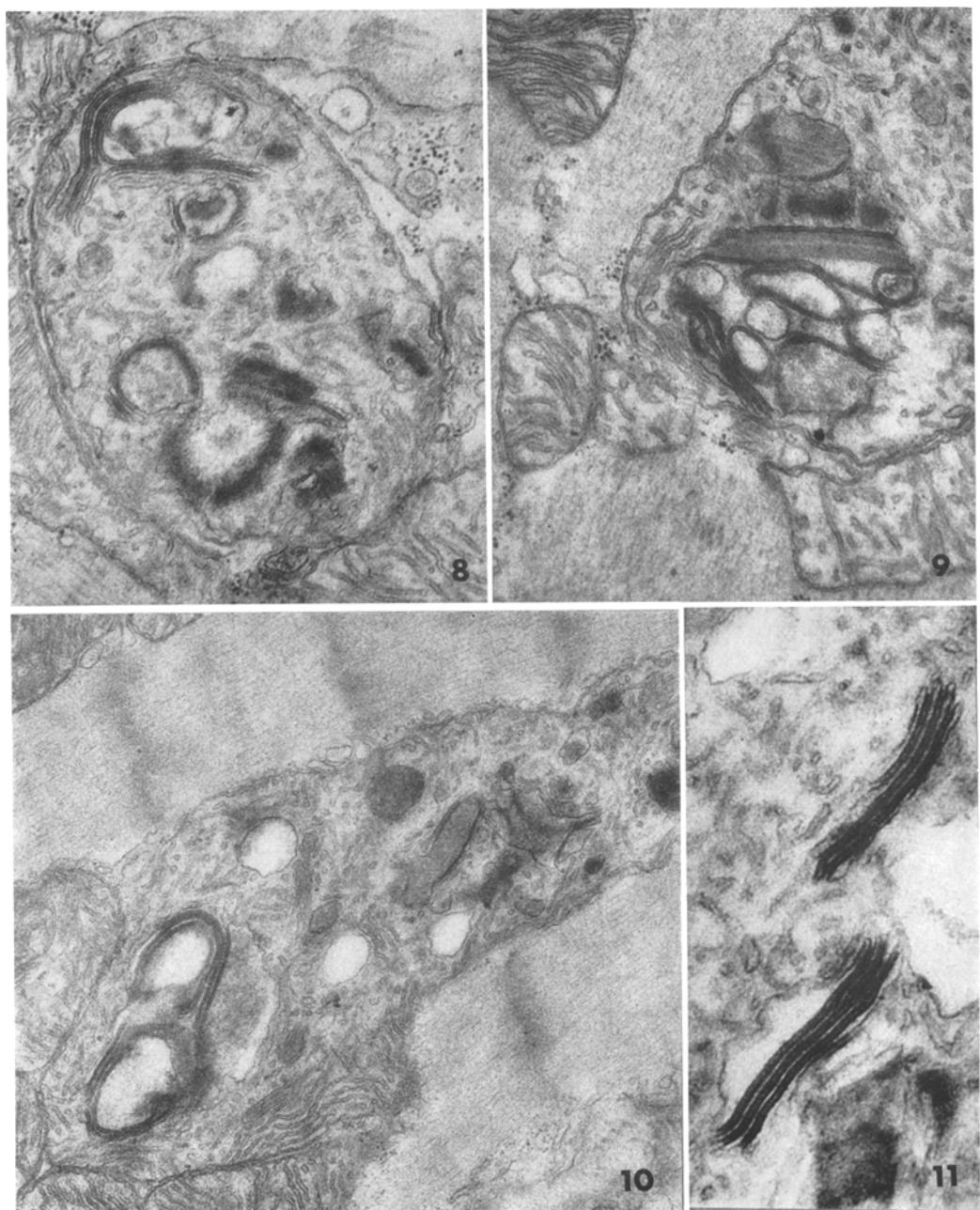


Abb. 8—10. Verschiedene Bilder von der „myelinischen“ Veränderung der Mitochondrien: In Abb. 8 bestehen einige Cristae aus stark osmiophilen Membranen, umgeben von Bezirken, in denen die Matrices rarefiziert sind. Die Grenzmembran zeigt ein normales Bild. In den Abb. 9 und 10 sieht man außer den vorbeschriebenen Veränderungen noch dichte Körper unterschiedlicher Form. (Ratte 100 Tage Mangeldiät),  $\times 37500$ ,  $\times 37500$ ,  $\times 30800$

Abb. 11. Stark osmiophile Cristae in den Mitochondrien, die den Myelininformationen vorausgehen. (Ratte 100 Tage Mangeldiät).  $\times 60000$

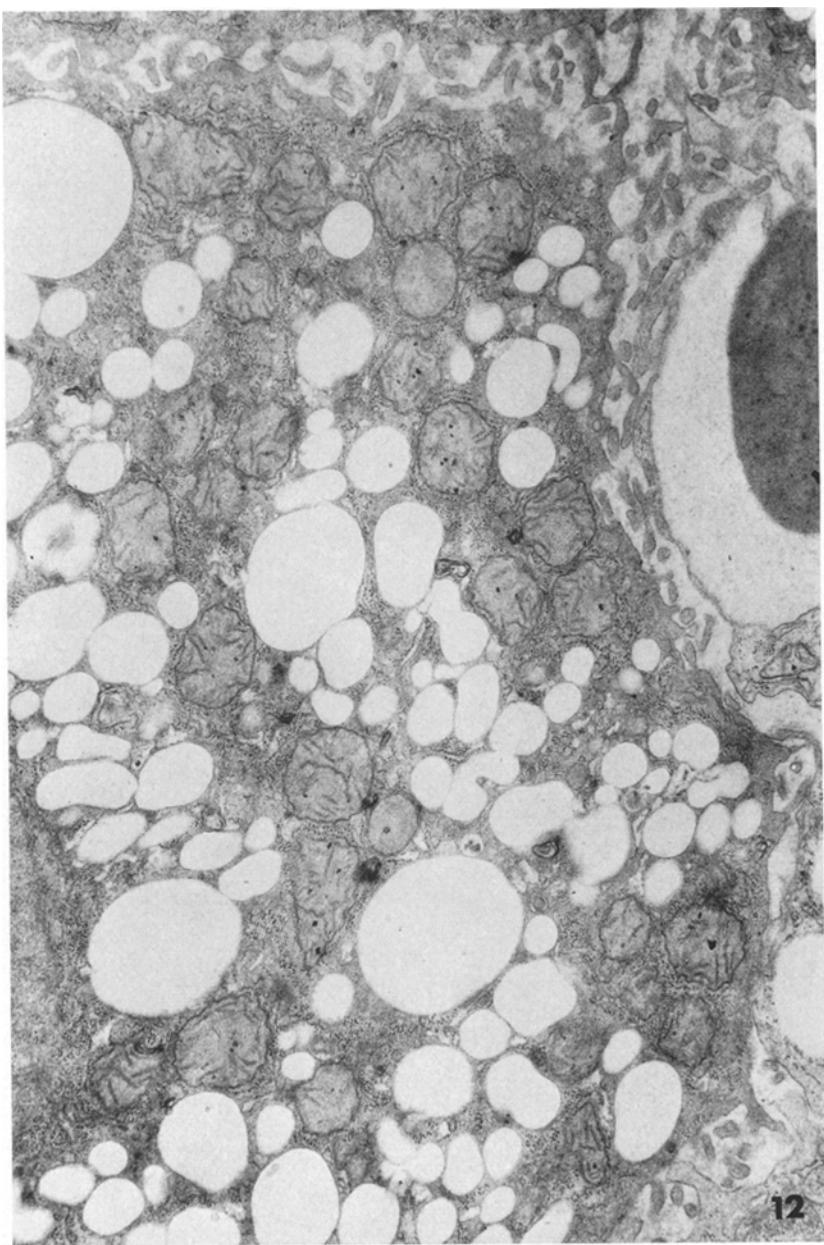


Abb. 12. Rattenleber nach Mangeldiät (45 Tage): Diffuse Vacuolisierung des Cytoplasmas. Leichte Volumenzunahme der Mitochondrien bei Erhaltung der Matrix'.  $\times 19250$

Anordnung in parallel verlaufenden Banden kommt. Außer den Veränderungen der Mitochondrien war eine diffuse Vacuolisierung der cytoplasmatischen Matrix zu beobachten, ohne daß irgendein Zusammenhang mit den Profilen des Reticulums bestand (Abb. 12).

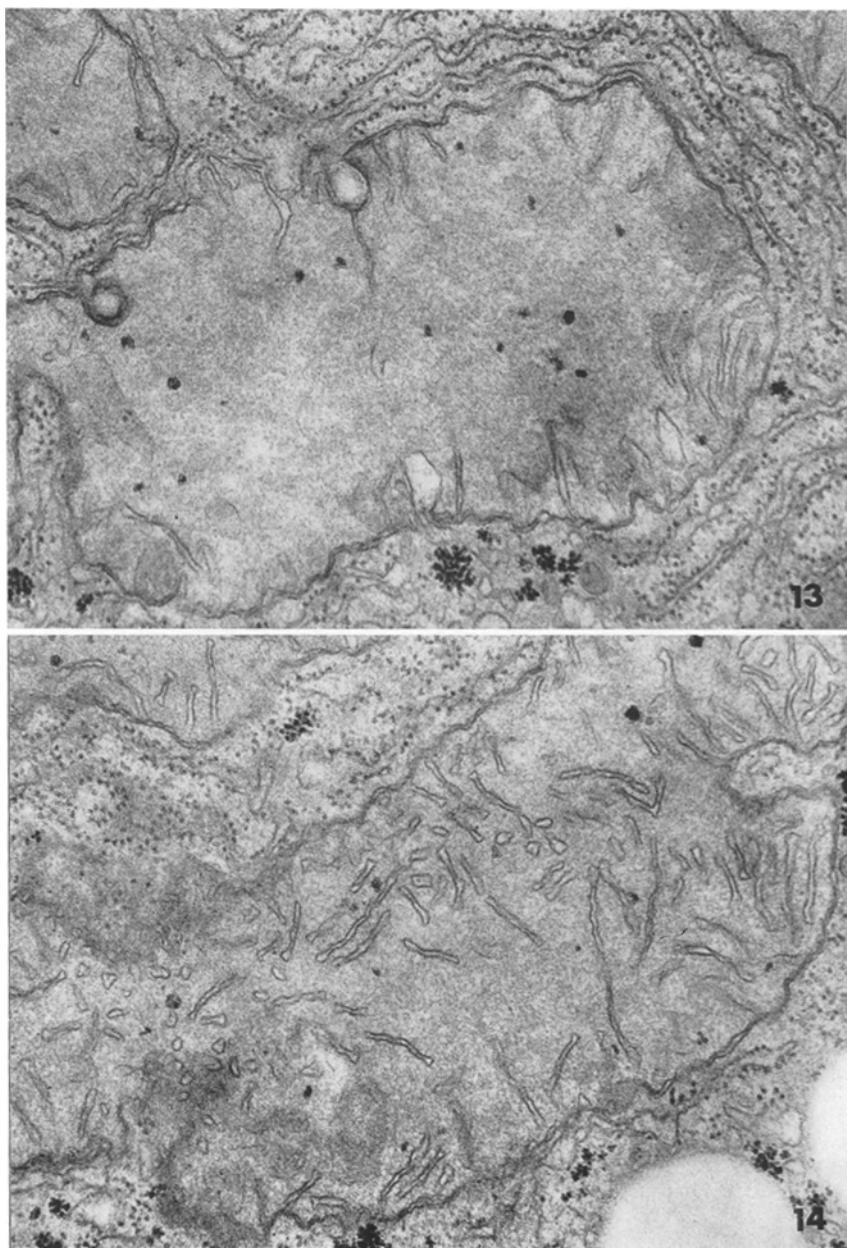


Abb. 13 u. 14. Rattenleber nach Mangeldiät (110 Tage): Große Mitochondrien mit erhaltener Matrix und Erhöhung der Zahl der Cristae (Fig. 14),  $\times 48000$

Mit Ausnahme eines deutlichen Abfalls des Glykogengehaltes zeigen die anderen Zellbestandteile im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen.

### Diskussion

Obwohl die mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugegebenermaßen eine wesentliche Rolle im Aufbau der Lipoproteine spielen, aus denen die Struktur der Zellmembranen besteht, fanden wir bei der angewandten Methode keinen Einfluß der starken Polyensäureverminderung im Herzmuskel auf die Morphologie der Zellmembranen. Das normale Bild der einzelnen „Membraneinheiten“ fand jedoch keine Entsprechung in der morphologischen Anordnung der Mitochondrien, deren Volumen vergrößert war und manchmal riesige Ausmaße erreichte. Die volumetrische Vergrößerung schien zuweilen von einer Verschmelzung der einzelnen Mitochondrieneinheiten herzuröhren, wie es NOVIKOFF (1961) behauptet hat. Ihm erschien das äußere Profil der Mitochondrien entsprechend den Verschmelzungslinien segmentiert. Die Volumenzunahme ist bereits von LEVIN u. Mitarb. (1957) an isolierten Mitochondrien beschrieben worden. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß die Veränderungen auf Grund der Isolierungsprozesse an durch den Lipidmangel besonders anfälligen Mitochondrien künstlich hervorgerufen wurden. Der hier zitierte Versuch bestätigt vor allem, daß diese Veränderungen, wie sie an der Leber schon von WILSON u. Mitarb. (1963) beobachtet wurden, *in vivo* wirksam sind. Außer der Erhöhung des Mitochondrienvolumens haben diese Autoren, die die Mitochondrien der Rattenleber nach Fettnahrung bzw. Polyensäuremangeldiät beschrieben haben, eine große Anzahl Cristae gesehen, die oft innerhalb einer dichteren Matrix plättchenförmig parallel gelagert waren. Diese Veränderungen entsprechen unseren Beobachtungen am Myokard und bestätigten sich im wesentlichen auch bei der Leber. Somit können sie als morphologische Charakteristika dieser Lipiddiät gelten.

Bei der Deutung der Arbeit WILSON u. Mitarb. (1963) ergeben sich im wesentlichen drei Hypothesen über die Volumenzunahme der Mitochondrien: Aufblähung, Verschmelzung oder Vergrößerung. Theoretisch widersprechen diese drei Möglichkeiten einander nicht. Uns scheint jedoch die erste auf Grund unserer morphologischen Befunde schwer zu belegen, während sie die Möglichkeit einer „Verschmelzung“ oder „Vergrößerung“ durchaus bestätigen können.

So kann man die Veränderungen der Mitochondrien als einen Prozeß echter Hypertrophie deuten, der eine Kompensation grundlegender Stoffwechselveränderungen, d.h. der Störung der oxydativen Phosphorylierung darstellt, die mit einer wirkungslosen Erhöhung der Oxydationsvorgänge einhergeht.

Als Folge oder Begleiterscheinung der Hypertrophie können Aufblähung und degenerative Veränderungen auftreten, wie von STEIN u. STEIN (1964) schon früher summarisch berichtet wurde. In unserem Material zeigten sich zwei Hauptarten von Rückbildungerscheinungen:

a) Aufblähung mit Verzerrung der Cristae und Aufhellung der Matrix.

b) Auftreten von intensiv osmiophilen Plättchen ähnlich Myelininformationen, die häufig leere Vacuolen oder unregelmäßige Körper verschiedener Dichte umgeben.

Die in der Einleitung genannten Stoffwechselveränderungen und besonders der Mangel an ATP bieten eine hinreichend überzeugende Erklärung für die Aufblähung. Die myelinische Degeneration könnte eine unmittelbare Folge der

Veränderung des Lipidgehaltes der Cristae mitochondriales bei kompensatorischer Hypertrophie sein.

### Zusammenfassung

An Ratten, die unter polyensäurearmer Kost gehalten wurden, wurden die ultrastrukturellen Veränderungen des Herzmuskels untersucht.

Es wurde eine auffallende und unregelmäßige Zunahme des Mitochondrienvolumens beobachtet. Gleichlaufend mit der Hypertrophie der Mitochondrien sahen wir degenerative Veränderungen, die sich in Aufblähung und Auftreten von Vacuolen sowie osmiophilen Formationen ausdrückten.

Die morphologischen Befunde stimmen mit den biochemischen Veränderungen im Herzmuskel überein, die charakteristisch für einen Mangel an essentiellen Fettsäuren sind, insbesondere im Hinblick auf die Störung der oxydativen Phosphorylierung und die wirkungslose Erhöhung der Oxydationsprozesse.

### Ultrastructural Changes in the Myocardium of Rats Fed a Polyunsaturated Fatty Acids Deficient Diet

#### Summary

The authors have studied the ultrastructural alterations of myocardium of rats kept on a diet lacking polyunsaturated fatty acids.

They observed the great and irregular volumetric increase mitochondria.

Degenerative focal lesions (swelling and myelinlike lesions) occurred with mitochondrial hypertrophy.

Morphological observations agree with myocardial metabolic alterations secondary to the lacking of essential fatty acids: particularly with the uncoupling of the oxidative phosphorylation and with the vain increase of the oxidative exchanges.

#### Literatur

- AAES-JØRGENSEN, E.: Essential fatty acids. *Physiol. Rev.* **41**, 1 (1961).
- COLLINS, F. D.: Phospholipid metabolism in essential fatty acid deficient rats. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **9**, 289 (1962).
- FIDANZA, A., e B. J. CONSTABLE: Gli acidi grassi dei lipidi del cuore di ratto: influenza di differenti grassi nella dieta. *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.* **38**, 1681 (1962).
- HAYASHIDA, T., and O. W. PORTMAN: Changes in succinic dehydrogenase activity and fatty acid composition of rat liver mitochondria in essential fatty acid deficiency. *J. Nutr.* **81**, 103 (1963).
- JOHNSON, R. M.: Adenosine triphosphatase and ATP-Pi exchange in mitochondria of essential fatty acid-deficient rats. *J. Nutr.* **81**, 411 (1963).
- LEVIN, E., R. M. JOHNSON, and S. ALBERT: Mitochondrial changes associated with essential fatty acid deficiency in rats. *J. biol. Chem.* **228**, 15 (1957).
- MARTINELLI, M., e P. PUDDU: Effetti di acidi grassi polinsaturi e di fosfatidi cardiaci sul metabolismo fosfolipidico del cuore di ratti in carenza di ac. grassi essenziali. *Minerva nucl.* **7**, 525 (1963).
- NOVICOFF, A. B.: Mitochondria. In: *The cell* (J. BRACHET and A. E. MIZOKY, eds.), vol. 2, cap. 5, p. 299—421. New York: Academic Press 1961.
- RINETTI, M., O. VISIOLI, L. COLOMBI, and F. BARBARESI: The cardial lipids after intense muscular work in rats fed on a diet lacking essential fatty acids. *Nutr. et Dieta (Basel)* **7**, 81 (1965).

- SMITH, J., and H. F. DE LUCA: Essential fatty acid deficiency and rat liver homogenate oxidations. *J. Nutr.* **79**, 416 (1963).
- STEIN, O., and Y. STEIN: Metabolism in vitro of palmitic and linoleic acid in the heart and diaphragm of essential fatty acid-deficient rats. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **84**, 621 (1964).
- TURCHETTO, E., M. G. GANDOLEI e S. ROSSI: Influenza dei lipidi dietetici sullo spettro degli acidi grassi dei fosfolipidi del cuore. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **39**, 1242 (1963).
- VISIOLI, O., M. RINETTI, A. CHIZZOLA, e G. BIANCHI: Nucleotidi liberi, creatina e creatinofosfato nel miocardio di ratti mantenuti a dieta carente in acidi grassi polinsaturi. *G. Clin. med.* **47**, 258 (1966).
- WILSON, J. W., and E. H. LEDUC: Mitochondrial changes in the liver of essential fatty acid-deficient mice. *J. Cell Biol.* **16**, 281 (1963).

Professor Dr. L. VITALI-MAZZA  
Istituto di Anatomia e Istologica Patologica  
Parma (Italien)