

## Experimentelle Herzmuskelnekrosen bei der Ratte nach Gabe von l-Noradrenalin und Strophanthin

### Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen

U. Kreinsen und C. M. Büsing

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. W. Doerr)

Eingegangen am 11. Februar 1975

### Experimental Heart Muscle Necroses in the Rat after Administration of l-Noradrenaline and Strophanthin

#### Light- and Electron Microscopic Studies

*Summary.* Female rats with a body weight of approximately 200 g regular show necroses of myocardial fibers after subcutaneous injection of l-Noradrenaline (2.5 mg/kg body weight). After intraperitoneal premedication with Strophanthin k in a therapeutical dosage ( $2 \times 10^{-5}$  g/kg body weight), the increase in number and extent of the necroses is statistically significant.

These findings argue against a preventive effect of Strophanthin k and can be explained by the mode of action of catecholamines and glycosides, as both substances, in a like manner, cause an increase in the mobilizable intracellular calcium of the myocardial fiber.

Premedication with Strophanthin causes no alteration in the distribution pattern of necroses, nor in the electron-microscope findings in the case of myocardial necroses produced by Noradrenaline.

*Key words:* Noradrenaline — Catecholamine — Rat Heart — Myocardial Necroses — Optical Microscopy — Electron Microscopy.

*Zusammenfassung.* Weibliche Wistarratten von ca. 200 g Körpergewicht zeigen nach subcutaner Gabe von l-Noradrenalin (2,5 mg/kg Körpergewicht) regelmäßig Herzmuskelfasernekrosen. Nach intraperitonealer k-Strophanthin-Prämedikation in therapeutischer Dosierung ( $2 \times 10^{-5}$  g/kg Körpergewicht) nehmen Zahl und Ausdehnung der Nekrosen statistisch signifikant zu.

Diese Befunde sprechen gegen einen präventiven Schutzeffekt des k-Strophanthins und erklären sich aus dem biochemischen Wirkungsmechanismus der Katecholamine und Glykoside, indem beide Substanzen gleichsinnig eine Erhöhung des mobilisierbaren intracellulären Calcium der Herzmuskelfaser bewirken.

Eine Strophanthin-Prämedikation bewirkt bei den durch Arterenol induzierten Myokardfasernekrosen weder im Verteilungsmuster der Nekrosen noch im elektronenmikroskopischen Befund eine Änderung.

In vorausgehenden Untersuchungen hatte sich ergeben, daß sowohl am menschlichen Herzen als auch am Myokard der Ratte (Doerr, 1971; Bersch *et al.*, 1973) und des Kaninchens (Büsing *et al.*, 1975) nach Gabe von Arterenol (Noradrenalin) und Alupent (Orciprenalin) charakteristische Nekrosen zu finden sind, die als sogen. Epinephrin-Myokarditis bezeichnet werden (Szakacs und Cannon, 1958; Rona und Kahn, 1967). Diese Nekrosen sind topographisch weitgehend an die Innenschichten und die Papillarmuskeln der linken Herzkammer gebunden. Elektronenoptisch läßt sich eine Zerstörung der Myofibrillenstruktur bei relativ gut erhaltenen Mitochondrien erkennen.

Die Veränderungen bei hochdosierten Glykosidgaben am Herzen wurden morphologisch bereits 1934 von Büchner untersucht. Auch Lindner (1957) fand nach letaler Strophanthindosis am Froschherzen und tödlicher Digitoxindosis am Herzen des Meerschweinchens Veränderungen an den Mitochondrien mit einem Zerfall der Innenmembran und Verlust der Granula. Nach Schwiegl und Jahrmärker (1960) sind vorwiegend subendokardiale Muskelschichten von Nekrosen betroffen.

Auf Grund dieser vorliegenden Befunde stellt sich uns die Frage, ob eine Prämedikation mit Strophanthin

1. eine Bedeutung für die Ausbildung der Arterienolnekrosen hat und
2. ob sich licht- und elektronenmikroskopische Unterschiede in der Morphologie der Nekrosen finden lassen.

### Material und Methode

Wir untersuchten insgesamt 116 weibliche Wistarratten mit einem Körpergewicht zwischen 180 und 230 g in 4 Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1

Gruppe		Na Cl 0,9 %	k-Strophanthin <sup>a</sup>	l-Noradrenalin <sup>b</sup>
1	Versuchsbeginn	1 ml i.p.	—	—
	12 h später	1 ml i.p. + s.c.	—	—
2	Versuchsbeginn	—	$2 \times 10^{-5}$ g/kg i.p.	—
	12 h später	1 ml s.c.	$2 \times 10^{-5}$ g/kg i.p.	—
3	Versuchsbeginn	1 ml i.p.	—	—
	12 h später	1 ml i.p.	—	2,5 mg/kg s.c.
4	Versuchsbeginn	—	$2 \times 10^{-5}$ g/kg i.p.	—
	12 h später	—	$2 \times 10^{-5}$ g/kg i.p.	2,5 mg/kg s.c.

<sup>a</sup> Kombetin der Firma Boehringer, Mannheim.

<sup>b</sup> Arterenol der Firma Hoechst.

Die 104 Tiere der Gruppen III und IV wurden paarweise gehalten, jeweils ein Tier der Serie III mit einem Tier der Serie IV (nur Noradrenalin s.c. bzw. k-Strophanthin i.p. und Noradrenalin s.c.).

Die Injektionen wurden allen Tieren in 12stündigem Abstand verabreicht. In der Dosierung des Strophanthins richteten wir uns nach der von v. Ardenne und Lippmann (1971) angegebenen therapeutischen Wirkdosis.

12 Std nach der letzten Injektion wurden alle Tiere in leichter Äthernarkose getötet, ihre Herzen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die  $4 \mu$  starken Längsschnittpräparate durch den Herzmuskel mit Septum und beiden Vorhöfen wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch von beiden Autoren in guter Übereinstimmung ohne Kenntnis der Serienzugehörigkeit nach Lokalisation und Ausdehnung der Nekrosen ausgewertet. Notiert wurde die Lokalisation der Nekrosen (linke Herzkammer, getrennt in freie Kammerwand und Papillarmuskeln; rechte Herzkammer; Kammerseptum und Vorhöfe; Herzkammerbasis und Herzkammerspitze). Ferner wurde die Ausdehnung der Nekrosen in 3 subjektiven Schweregraden (vereinzelte Fasernekrosen, dichte und konfluierende Nekrosen) vermerkt. Die statistische Prüfung auf Unterschiede in der Intensität der Nekrosen in den einzelnen Serien erfolgte nach der Methode der Sequenzanalyse (Cavalli-Sforza, 1969).

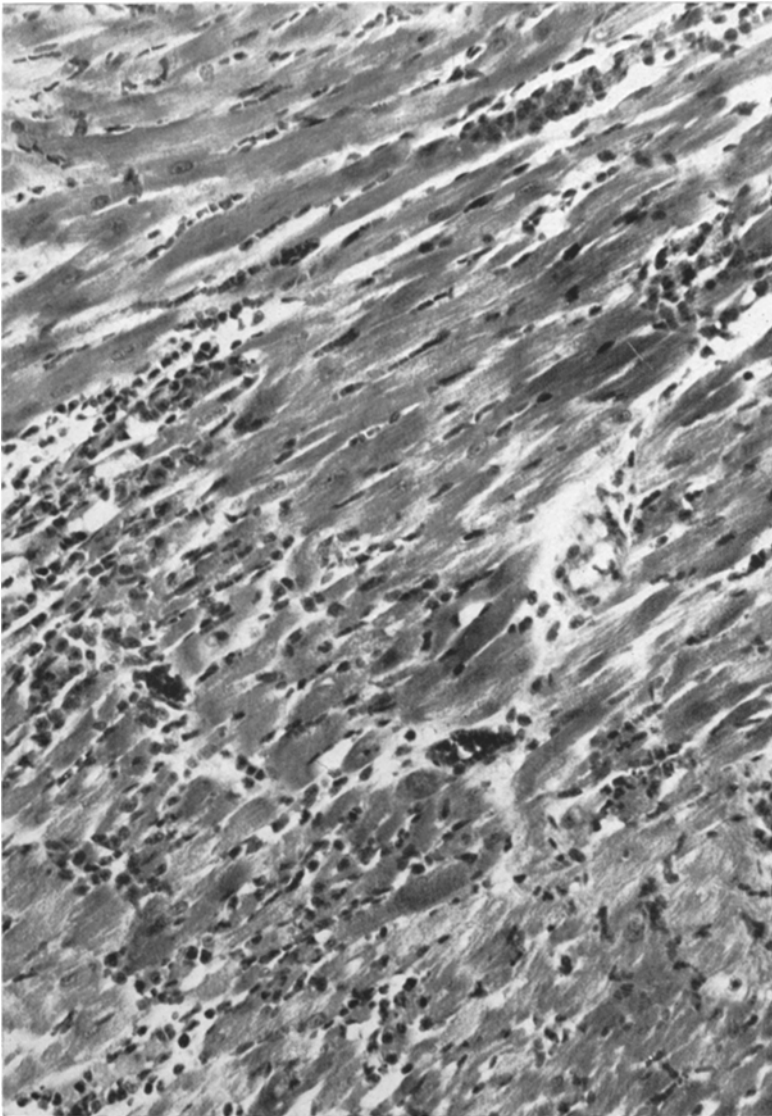


Abb. 1. Durch Noradrenalin induzierte Herzmuskelfasernekrosen am Rattenmyokard nach Strophanthin-Prämedikation. Lympho-histiocytäre und granulocytäre Abraumreaktion mit interstitiellem Ödem. (Vergrößerung: 1:160; Färbung: HE)

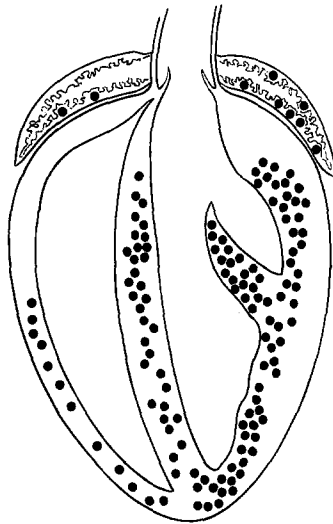


Abb. 2. Verteilungsmuster der durch Noradrenalin induzierten Herzmuskelfasernekrosen nach Strophanthin-Prämedikation

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden je Gruppe 2 Tiere in Chloralhydratnarkose (0,25 g/kg) bei schlagendem Herzen nach der Methode Forssmann (Forssmann, 1967) mit einem Druck von 75–85 mmHg retrograd über die Aorta perfundiert. Die Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie stammten vom linken Papillarmuskel und von der linken Kammerwand und wurden nach Passage durch Sörensen-Puffer, 1% gepufferter Osmiumtetroxydlösung und Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe in Araldit eingebettet. Nach Anfertigung von Semidünnschnitten (Ultramikrotom Reichert OMU 2) wurden die mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastierten Ultradünnschnitte im EM 9 der Firma Zeiss untersucht.

### Befunde

In den Kontrollgruppen I und II (reine Kochsalzinjektionen und Strophanthin-Kochsalzinjektionen) fanden sich keine Nekrosen. Hingegen fanden sich nach Arterenol-Medikation die typischen Fasernekrosen mit lympho-histiocytärer und vereinzelt granulocytärer Abräumreaktion, begleitet von einem unterschiedlich ausgeprägten Ödem (Abb. 1). Die herdförmigen Nekrosen lagen überwiegend spitzennahe, relativ häufig im Septumbereich, seltener in der rechten Herzkammerwand (Abb. 2).

Nach Strophanthin-Prämedikation und anschließenden Katecholamingaben nahm die Zahl der arterenolinduzierten Nekrosen statistisch signifikant zu (Abb. 3a–c). Sie lagen wiederum in den Innenschichten fast ausschließlich der linken Herzkammerwand. Eindeutige Änderungen in der Topographie der Nekrosen ließen sich nicht erkennen.

Elektronenmikroskopisch fanden wir eine mäßig ausgeprägte Fettvacuolenbildung mit Lokalisation nahe an den Mitochondrien, welche in der Frühphase gut erhalten sind. Eine oft beträchtliche Dilatation des sarkoplasmatischen Reticulum und sogen. Kontraktionsbänder wurden sichtbar (Abb. 4a und b).

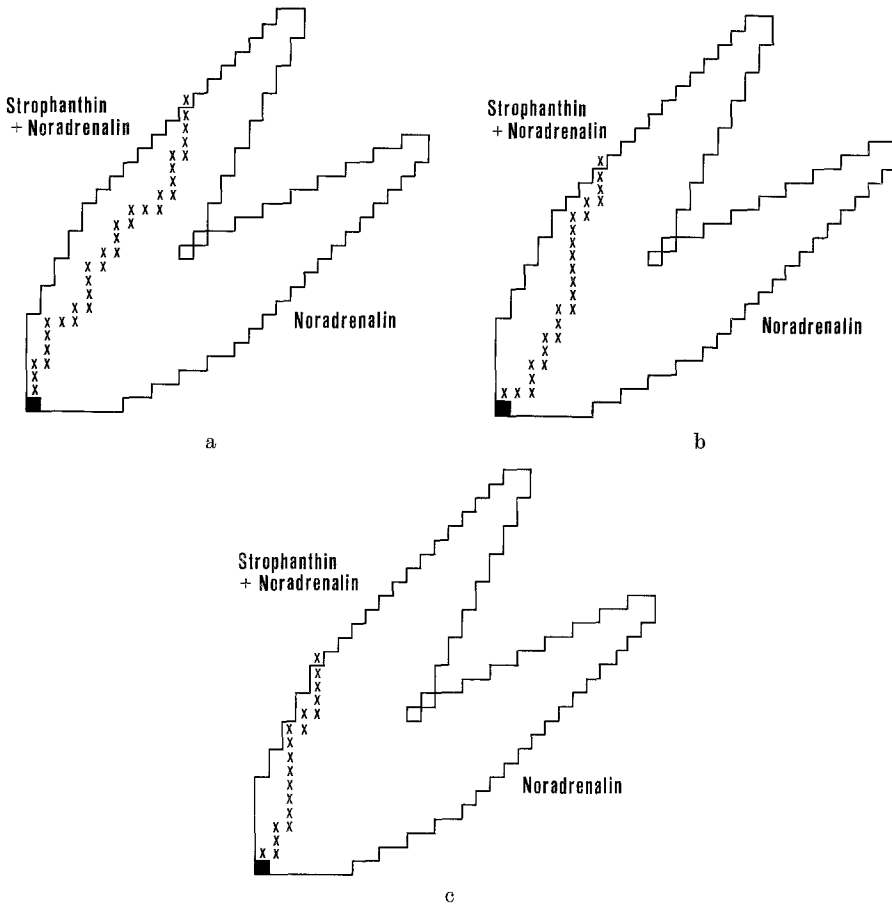


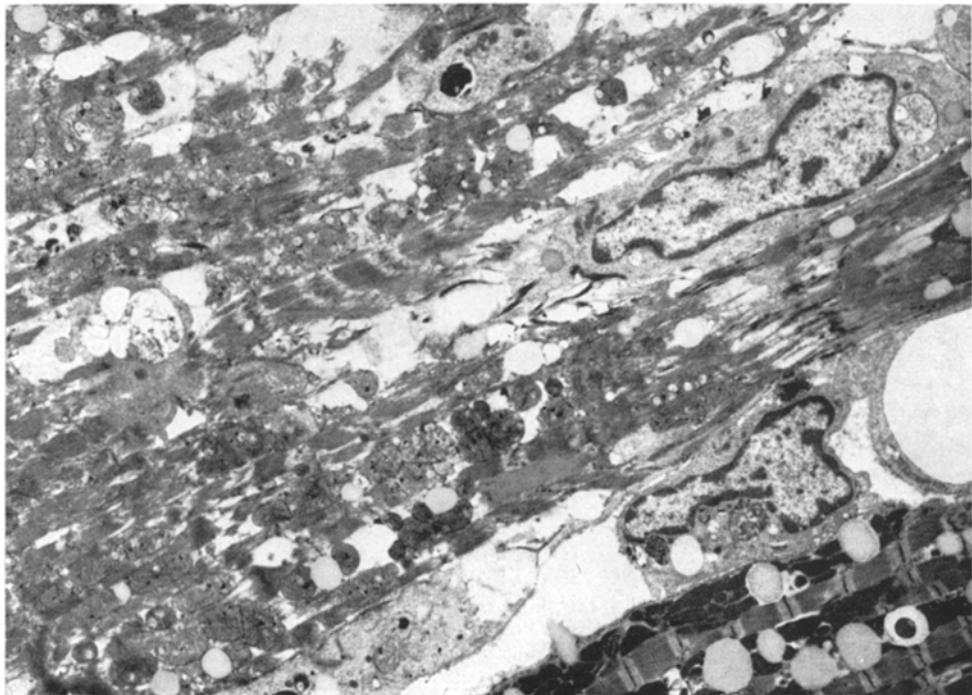
Abb. 3a—c. Graphische Darstellung der Sequenzanalyse. Eingezeichnet sind nur die informativen Paare  $\alpha = 0,05$  ( $1-\beta = 0,05$ ); (a) und (b) getrennt für die beiden Untersucher; (c) übereinstimmende informative Paare

Abb. 4. (a) Rattenherzmuskel links nach Noradrenalingaben. Disseminierte Verfettung und geringe Dilatation des sarkoplasmatischen Reticulum. Rechts oben im Bild beginnender Strukturverlust der Myofibrillen. (Vergrößerung: 1700fach; Nachvergrößerung  $3,3 \times$ ). (Foto: Derks)  
 (b) Rattenherzmuskel links nach Noradrenalingaben. Nekrosezonen mit Auflösung der Myofibrillen und Dissektion der Glanzstreifen. Mitochondrien mit erhaltenen Membranstrukturen. (Vergrößerung: 1700fach; Nachvergrößerung  $3,3 \times$ ) (Foto: Derks)

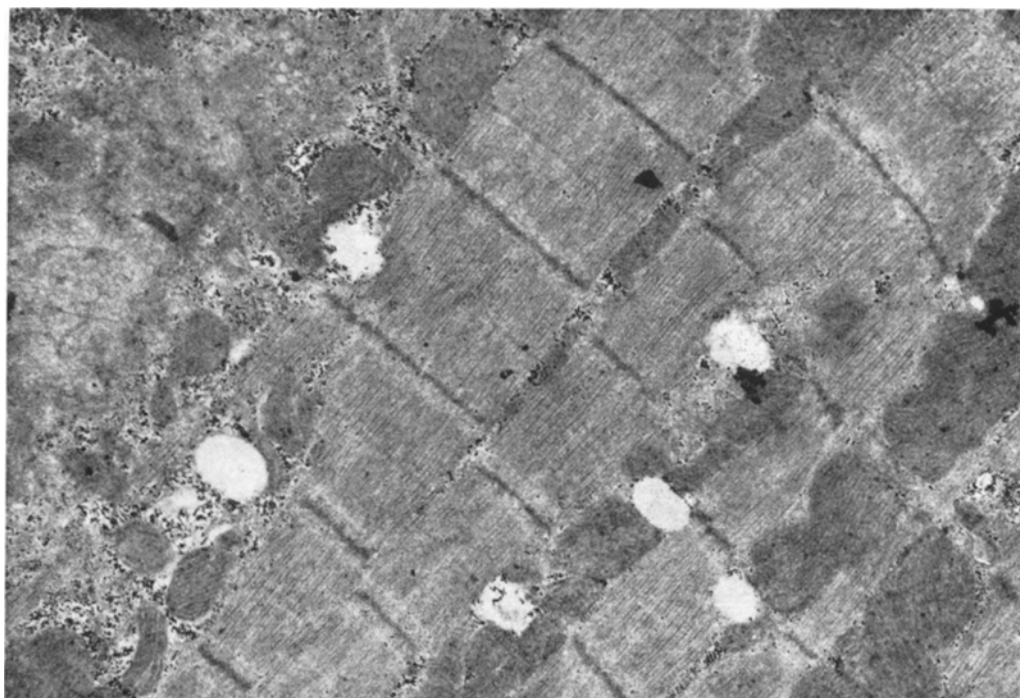
Abb. 5. (a) Rattenherzmuskel links nach Noradrenalingaben bei Strophanthin-Prämedikation. Rechte Bildhälfte erhaltene Muskelfasern mit geringer Dilatation des sarkoplasmatischen Reticulum und wenigen Fettvacuolen. Links oben im Bild beginnende Nekrose mit Strukturverlust der Myofibrillen bei erhaltenen Membranstrukturen der Mitochondrien. (Vergrößerung: 6200fach; Nachvergrößerung  $3 \times$ ) (Foto: Derks). (b) Fortgeschrittene Myocytolyse. Mitochondrien relativ gut erhalten bei völligem Verlust der Myofibrillenstruktur. (Vergrößerung: 3400fach; Nachvergrößerung  $3 \times$ ) Inset: Übersicht. Die abgerundeten Mitochondrien schwimmen in einer ausgedehnten Trümmerzone. Am oberen Bildrand die benachbarte Muskelfaser mit erhaltenen Myofibrillen. (Vergrößerung: 1700fach; Nachvergrößerung  $2,7 \times$ ) (Foto: Derks)



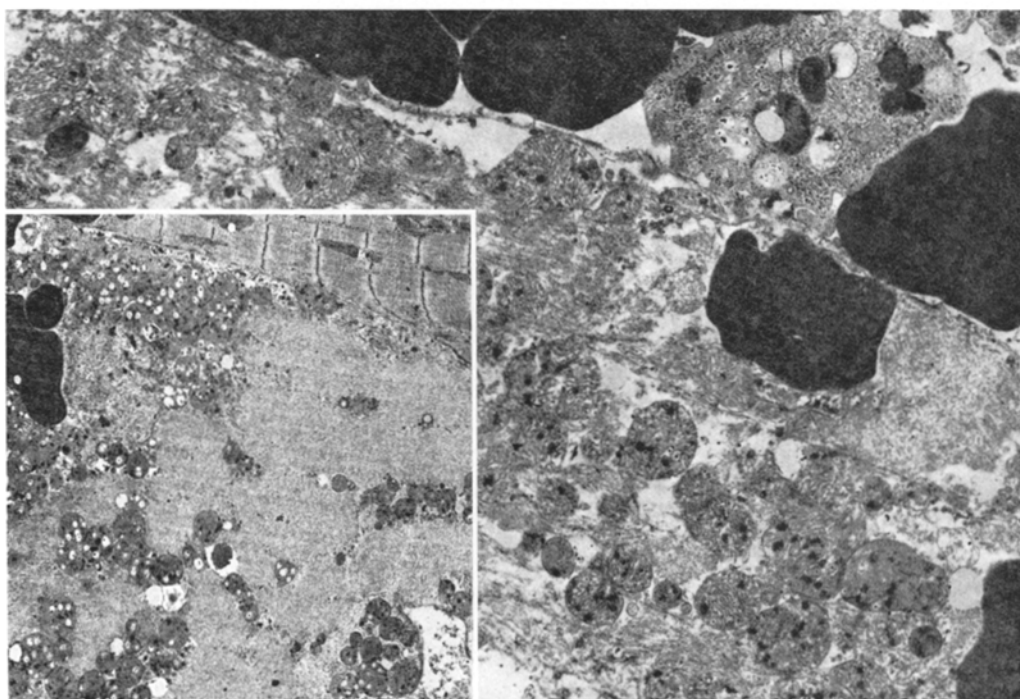
4 a



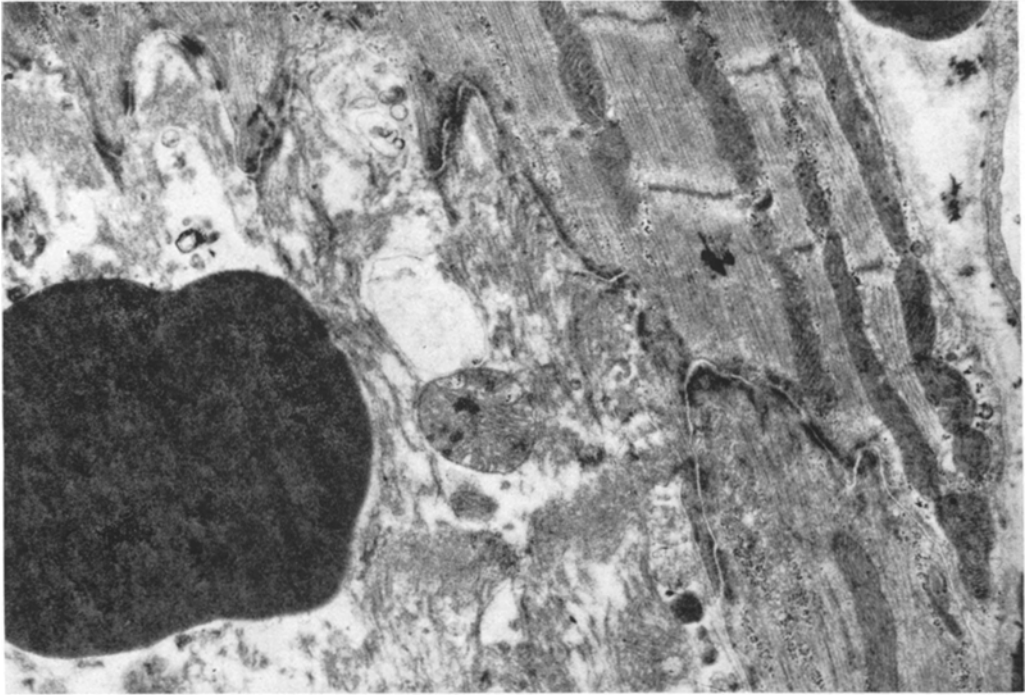
4 b



5a



5b



6a

Im Gegensatz zu den weitgehend intakten Mitochondrien imponiert eine oft fortgeschrittene Zerstörung der Myofibrillen (vgl. Bersch *et al.*, 1973).

Bei der Prämedikation mit Strophanthin konnten wir keine Änderung des Charakters der Nekrosen finden. Auch hier waren die Mitochondrien erst bei nahezu vollständiger Auflösung der Myofibrillen alteriert (Abb. 5 und 6). Mitochondrienverkalkungen, wie sie Fleckenstein (1972) nach alleiniger Arterenolgabe beschreibt, fanden wir nicht.

### Diskussion

Die vorliegenden experimentellen Untersuchungen an der Ratte zeigen zunächst, daß Herzmuskelfasernekrosen nach Katecholamingabe auch dann auftreten, wenn eine Prämedikation mit Herzglykosiden (Strophanthin) in therapeutischen Dosen erfolgt; es läßt sich sogar eine Verstärkung der myocytotoxischen Wirkung von Noradrenalin nach Strophanthin statistisch sichern, ohne daß Unterschiede in der Ultrastruktur der Nekrosen nachweisbar werden.

Die im Kreise der praktischen Medizin gelegentlich geäußerten Vorstellungen, daß Strophanthin eine euthetisierende Wirkung an der Herzmuskelzelle habe und somit als Prophylaxe bzw. Antidot gegen den myocytogen inszenierten Herzinfarkt wirke, können nach den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Damit ergibt sich die Frage nach dem additiven Wirkungsmechanismus.

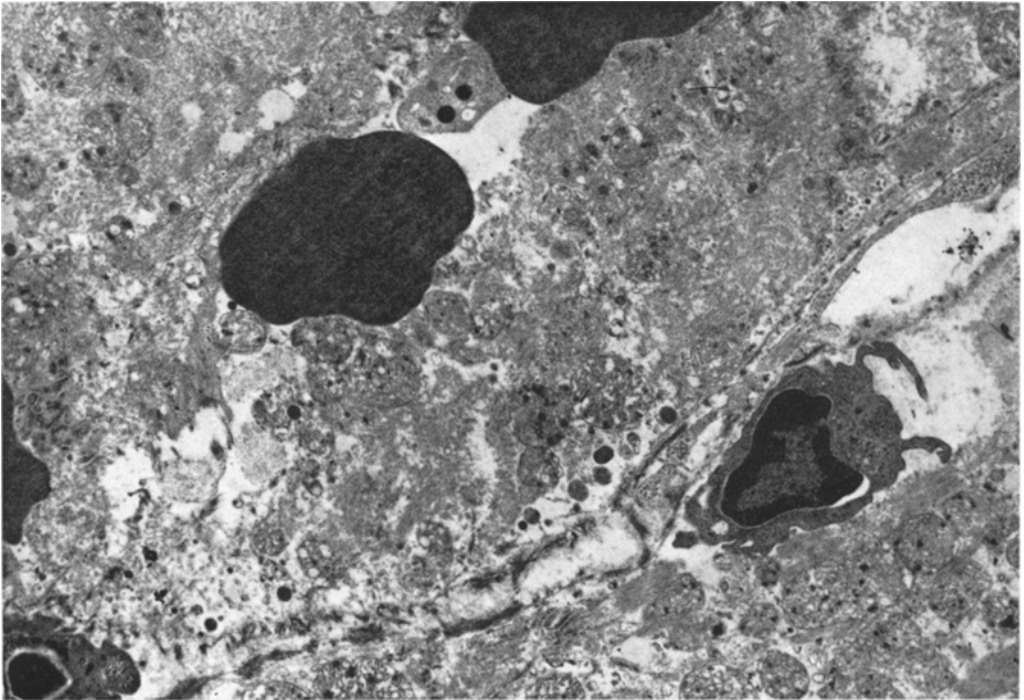


Abb. 6. (a) Rattenherzmuskel links nach Noradrenalingaben bei Strophanthin-Prämedikation. Von rechts nach links im Bild: noch intakte Muskulatur, dann Übergang in beginnende Myocytolyse mit partieller Dissektion des Glanzstreifens und fortschreitender Auflösung der Myofibrillen. In Bildmitte Mitochondrien mit erhaltenen Cristae mitochondriales. (Vergrößerung: 6200fach; Nachvergrößerung  $3\times$ ). (Foto: Derks). (b) Übersichtsaufnahme nekrotischer Herzmuskulatur. Aufgelöste Myofibrillen, Einblutung und dazwischen konturierte Mitochondrien. (Vergrößerung: 3400fach; Nachvergrößerung  $2,7\times$ ) (Foto: Derks)

Aus Untersuchungen von Bajusz (1964) und Raab (1969) läßt sich entnehmen, daß hohe Gaben von Katecholaminen nicht unmittelbar faserzerstörend wirken, sondern erst auf dem Umweg über eine excessive Förderung des transmembranären Calciumeinstromes in die Zelle. Es kommt zu verstärkter Aktivierung der calciumabhängigen Myofibrillen-ATP-ase und zum erhöhten ATP-Verbrauch, dem eine Verarmung der Myokardfasern an ATP und Kreatinphosphat folgt (Bachledova *et al.*, 1968). Schließlich kommt es zur Myokardfasernekrose auf Grund des Defizits an energiereichem Phosphat. Dabei ist es im Prinzip gleichgültig, ob Katecholamine injiziert werden, oder ob das Herz von aus körpereigenen Depots stammenden Katecholaminen (Stress) überschwemmt wird.

Andererseits führen offenbar auch Herzglykoside zu einer Erhöhung des intracellulär wirksamen Calciumspiegels. Repke (1964) und Greeff (1968, 1973) nehmen als Ursache eine Hemmung der Zellmembran-ATP-ase an. Nach Klaus und Krebs (1974) handelt es sich um eine erleichterte Entbindung und Rückbindung von Calcium an intracelluläre Phospholipide.

Beiden Substanzen — Katecholaminen und Herzglykosiden — ist also eine Erhöhung des freien oder mobilisierbaren intracellulären Calciumbestandes gemeinsam (Fleckenstein, 1971; Belz, 1971; Larbig, 1973).

Die Vermutung des Vorliegens eines additiven Effektes wird durch unsere morphologischen Befunde bestätigt. Die Zahl und das Ausmaß der arterienol-induzierten Nekrosen haben nach Strophanthin-Vorbehandlung statistisch signifikant zugenommen.

### Literatur

- Ardenne, v. M., Lippmann, H. G.: Zur Verringerung der Wirkungsschwankung nach oraler Gabe von g-Strophanthin. *Cardiologisches Bulletin-C Acta cardiol. H. 4/5*, 167—178 (1971)
- Bachledova, E., Gvozdiák, J., Niederland, T. R., Hocman, G.: The effect of norepinephrine on the energetic metabolism of heart muscle. *Exp. Med. Surg.* **26**, 15—20 (1968)
- Bajusz, E.: Elektrolyt-Verschiebungsmechanismus im Herzmuskel und seine Bedeutung für Pathogenese und Prophylaxe nekrotisierender Cardiopathien. *Arzneimittel-Forsch.* **14**, 1115—1128 (1964)
- Belz, G. G.: Die herzwirksamen Glykoside. München: J. F. Lehmann 1971
- Bersch, W., Bühler, F., Kreinsen, U.: Ein pathomorphologischer Beitrag zur Kenntnis der sogen. Epinephrin-Myokarditis. *Virchows Arch. Abt. A Path Anat.* **360**, 45—55 (1973)
- Büchner, F.: Herzmuskelnekrosen durch hohe Dosen von Digitalisglykosiden. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **176**, 59—64 (1934)
- Büsing, C. M., Kreinsen, U., Bühler, F., Bleyl, U.: Light and electron microscopic examinations of experimentally produced heart muscle necroses following normobaric hyperoxia. *Virchows Arch. A* **366**, 137—147 (1975)
- Cavalli-Sforza, L.: Biometrie. Stuttgart: G. Fischer 1969
- Doerr, W.: Morphologie der Myokarditis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **77**, 301 (1971)
- Fleckenstein, A.: Pathophysiologische Kausalfaktoren bei Myokardnekrosen und Infarkt. *Wien. Z. inn. Med.* **52**, H. 3, 133—143 (1971)
- Fleckenstein, A.: Physiologie und Pharmakologie der transmembranären Natrium-, Kalium- und Calcium-Bewegungen. *Arzneimittel-Forsch.* **22**, 2019—2028 (1972)
- Forssmann, W. G., Siegrist, G., Orci, L., Girardier, L., Pictet, P., Rouiller, Ch.: Fixation par perfusion pour la microscopie électronique. Essai de généralisation. *J. Microsc.* **6**, 279 (1967)
- Greeff, K.: Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer Glykoside. Darmstadt: Steinkopff 1968
- Greeff, K.: Pharmakologische Grundlagen der Digitalistherapie. *Med. Welt* **24**, 613—618 (1973)
- Klaus, W., Krebs, R.: Kinetische Analyse der Calcium-Komplimente im Meerschweinchenherzen unter Kontrollbedingungen und Strophanthineinwirkung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **283**, 277—292 (1974)
- Larbig, D.: Neues zur Digitalistherapie. *Physikalische Medizin und Rehabilitation. Z. allg. u. spez. Med.* **14**, H. 7 (1973)
- Lindner, E.: Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. *Z. Zellforsch.* **45**, 702—746 (1957)
- Raab, W.: Myocardial electrolyte derangement: Crucial feature of pluricausal, so-called coronary, heart disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **47**, Art. 17, 627—686 (1969)
- Repke, K.: Über den biochemischen Wirkungsmodus des Digitalis. *Klin. Wschr.* **42**, 157—165 (1964)
- Rona, G., Kahn, D. S.: The healing of cardiac necrosis as reflected by experimental studies. In: E. Bajusz and G. Jasmin, *Methods and achievements in experimental pathology*, vol. 3, p. 200. Basel-New York: S. Karger 1967

Schwiegk, H., Jahrmärker, H.: Therapie der Herzinsuffizienz. In: Handbuch der inneren Medizin 9, Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960

Szakaacs, J. W., Cannon, A.: 1-norepinephrine myocarditis. Amer. J. clin. Path. **30**, 425—434 (1958)

Dr. U. Kreinsen  
Dr. C. M. Büsing  
Pathologisches Institut  
der Universität Heidelberg  
D-6900 Heidelberg 1  
Im Neuenheimer Feld 220/221  
Bundesrepublik Deutschland