

## **Elektronenmikroskopische Befunde am Herzmuskel der Ratte bei experimentell induzierten Elektrolytveränderungen**

U. Raute-Kreinsen, H. Berlet, F. Bühler und P. Rixner

Pathologisches Institut Mannheim (Universität Heidelberg) (Direktor: Prof. Dr. U. Bleyl),  
Institut für Pathochemie der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Quadbeck),  
I. Medizinische Klinik Mannheim (Universität Heidelberg) (Direktor: Prof. Dr. W. Hoffmeister)

### **Electronmicroscopic Findings in Experimentally Induced Electrolyte Alterations in Rat Cardiac Muscle**

**Summary.** Changes in certain tissue electrolytes brought about by injecting rats with noradrenalin (NA), angiotensin or dihydrotachysterol (DHT) were compared with the concomitant ultrastructural alterations of cardiac muscle. High doses of NA or angiotensin given singly or together with ouabain were found to lower the overall myocardial calcium concentration without accompanying structural lesions.

When calcium was increased more than tenfold by the administration of DHT, electronmicroscopy revealed altered myofibrils and mitochondria. Giving DHT along with NA or angiotensin not only preserved their calcium-lowering effect, but resulted in a massive increase in tissue calcium, with magnesium levels also rising, whilst the tissue content of potassium remained almost unchanged. Following NA administration the necrotic areas, known to be confined to the inner endocardial layer after catecholamine administration, pervaded the entire cardiac muscle mass.

Ouabain prevented the massive rises of tissue calcium induced by DHT given together with angiotensin but was ineffective when added to the combination of DHT and NA. In either case, both myofibrils and mitochondria displayed ultrastructural alterations although distinctive features were lacking.

The data suggests that DHT acts on cellular calcium, not only by mobilising calcium from osseous structures but also by interacting with intracellular calcium homeostasis. In addition to overstimulating contractile elements, calcium is thought to exert its noxious effect in a more general way, e.g. by binding to surface membranes, thus affecting the normal functioning and eventually the structure of mitochondria and other organelles besides myofibrils.

**Key words:** Catecholamine – Angiotensin – Ouabain – Dihydrotachysterol – Rat heart – Myocardial necrosis – Electrolyte concentration – Electron microscopy.

**Zusammenfassung.** Noradrenalin und Angiotensin in hohen Dosen allein oder in Kombination mit Strophanthin appliziert, führen bei der Ratte zu einer Erniedrigung des Gesamtcalciumgehaltes des Myocard.

Dihydratichysterol (DHT) erhöht den Calciumgehalt und zeigt elektronenmikroskopisch Schädigungen an Mitochondrien und Myofibrillen. Die kombinierte Gabe von DHT und Noradrenalin bzw. Angiotensin potenziert den Calciumwert, erhöht das Magnesium und läßt Kalium nahezu unverändert. Die im Bereich der linksventrikulären Innenschichten ausgebildeten „Catecholaminnekrosen“ finden sich nach DHT-Prämedikation ubiquitär.

Strophanthin verhindert den massiven, durch DHT- und Angiotensinmedikation induzierten Calciumstieg, während es bei der kombinierten Gabe von DHT und Noradrenalin keine Wirkung entfaltet. Myofibrillen und Mitochondrien sind verändert, Calciumablagerungen sind nachweisbar, charakteristische Unterschiede fehlen.

Katecholamine können in hohen Dosen bei Mensch und Tier Herzmuskelnekrosen erzeugen, die über eine Mobilisierung oder Zunahme des intracellulären Calciumgehaltes ausgelöst werden sollen (Rona et al., 1967; Doerr, 1971; Fleckenstein et al., 1971, 1973, 1975; Gavras et al., 1975). In früheren Untersuchungen haben wir festgestellt, daß Noradrenalin und auch Angiotensin Nekrosen am Rattenmyokard hervorrufen, die sich jedoch elektronenmikroskopisch differenzieren lassen (Bühler et al., 1974; Kreinsen und Büsing, 1975). Eine Prämedikation mit Strophanthin veränderte sowohl Anzahl und Ausmaß der Fasernekrosen, als auch das elektronenmikroskopische Bild (Raute-Kreinsen et al., 1976).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Frage geprüft, ob diesen morphologischen Unterschieden bei den verschiedenen Medikationen unterschiedliche, möglicherweise typische Veränderungen im Gesamtgehalt des Herzmuskels an Calcium und anderen Kationen zugeordnet werden können. Dabei wurde versucht, den Calciumgehalt im Herzmuskel durch Gabe von Dihydratichysterol (DHT) direkt zu beeinflussen.

## Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 102 männliche Wistar-Ratten, 180–200 g schwer, die auf 11 Gruppen verteilt wurden (Tabelle 1). DHT, 3 mg/kg/die, wurde mit einer Schlundsonde 3 Tage lang verfüttert, Noradrenalin, Angiotensin und Strophanthin wurden nach dem angegebenen Schema (Tabelle 2) verabreicht. Die Injektionen von Noradrenalin und Angiotensin erfolgten in 12stündigem Abstand nach der ersten prämedizierten Strophanthindosis, zusammen mit der zweiten Strophanthingabe. 12 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere in leichter Äthernarkose getötet, indem der Thorax eröffnet und die noch schlagenden Herzen entnommen wurden.

Für die chemischen Bestimmungen wurden aus jeder Tiergruppe die Herzen von je 6–8 Tieren wie oben beschrieben entnommen. Die Vorhöfe einschl. des Anulus fibrosus wurden abgetrennt, die Kammeranteile in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung kurz gespült und nach sofortiger Bestimmung des Frischgewichtes eingefroren. Der Wassergehalt der Proben wurde aus dem Gewichtsverlust nach 48stündigem Gefriertrocknen ermittelt. Der Gesamtgehalt der Proben an Calcium, Kalium und Magnesium wurde mittels der Atomabsorptionsspektrophotometrie nach Säureaufschluß des Gewebes gemessen. Dazu wurde das Gewebe mit 1,5 ml Aqu.bid., 0,5 ml konz.  $\text{HNO}_3$

Tabelle 1

| Tiergruppe | DHT<br>3 mg/kg/die<br>oral über 3 Tage | k-Strophanthin<br>2 × im Abstand<br>12 h | l-Noradrenalin    | Angiotensin   | NaCl 0,9% |
|------------|--|--|-------------------|---|-----------|
| I          | —                                      | —  | 2,5 mg/kg<br>s.c. | —   | —         |
| II         | —                                      | —  | —                 | 75 mg/kg<br>$\frac{1}{2}$ s.c. + $\frac{1}{2}$ i.p. | —         |
| III        | —                                      | $2 \times 10^{-2}$ mg/kg<br>i.p.         | 2,5 mg/kg<br>s.c. | —   | —         |
| IV         | —                                      | $2 \times 10^{-2}$ mg/kg<br>i.p.         | —                 | 75 mg/kg<br>$\frac{1}{2}$ s.c. + $\frac{1}{2}$ i.p. | —         |
| V          | +                                      | —  | 2,5 mg/kg         | —   | —         |
| VI         | +                                      | —  | s.c.              | 75 mg/kg<br>$\frac{1}{2}$ s.c. + $\frac{1}{2}$ i.p. | —         |
| VII        | +                                      | $2 \times 10^{-2}$ mg/kg<br>i.p.         | 2,5 mg/kg<br>s.c. | —   | —         |
| VIII       | +                                      | $2 \times 10^{-2}$ mg/kg<br>i.p.         | —                 | 75 mg/kg<br>$\frac{1}{2}$ s.c. + $\frac{1}{2}$ i.p. | —         |
| IX         | +                                      | $2 \times 10^{-2}$ mg/kg<br>i.p.         | —                 | —   | —         |
| X          | +                                      | —  | —                 | —   | —         |
| XI         | —                                      | —  | —                 | —   | +         |

Tabelle 2

|        |      |   |
|--------|------|---|
| Gruppe | I    | l-Noradrenalin (Arterenol, Hoechst)                       |
|        | II   | Angiotensin (Hypertensin, Ciba <sup>a</sup> )             |
|        | III  | Strophanthin (Kombetin, Boehringer-Mhm.) + l-Noradrenalin |
|        | IV   | Strophanthin + Angiotensin                                |
|        | V    | Dihydrotachysterol = DHT (AT 10, Bayer) + l-Noradrenalin  |
|        | VI   | DHT + Angiotensin   |
|        | VII  | DHT + Strophanthin + l-Noradrenalin                       |
|        | VIII | DHT + Strophanthin + Angiotensin                          |
|        | IX   | DHT + Strophanthin  |
|        | X    | DHT   |
|        | XI   | NaCl 0,9%   |

<sup>a</sup> Wir möchten der Firma Ciba an dieser Stelle für die großzügige Überlassung von Hypertensin danken

und 0,5 ml konz.  $\text{HClO}_4$  versetzt und nach Zugabe einiger Glasperlen bis zur völligen Auflösung der Probe vorsichtig zum Sieden gebracht. Die klare Lösung wurde sofort in ein 20 ml Meßkölbchen überführt, mit 0,2 ml einer 10%-igen Lösung von  $\text{LaCl}_3$  versetzt und mit Aqu.bid. aufgefüllt. Die Messungen von Ca, K und Mg erfolgten nach entsprechender Verdünnung in Anlehnung an Standardvorschriften.

Jeweils 2 Herzen aus jeder Tiergruppe wurden histologisch bzw. elektronenmikroskopisch untersucht. Für die Lichtmikroskopie wurde das Herz nach der Entnahme in Formalin fixiert, die durch das Kammerseptum flach aufgeschnittenen Herzen in Paraffin eingebettet und die 6  $\mu$  starken Schnitte HE gefärbt. Die Nekrosefelder wurden in Hinblick auf Lokalisation und Ausdehnung sowie Schweregrad beurteilt.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte in Narkose bei schlagendem Herzen über die Aorta eine retrograde Perfusionsfixation mit Glutaraldehyd (Forssmann et al., 1967). Die

Excisate der linken Papillarmuskelgruppe wurden nach typischer Fixierung (Sörensen-Puffer, 1%-ige gepufferte Osmiumtetroxydlösung und Dehydratation) in Araldit eingebettet und semidünn sowie ultradünn geschnitten. Nach der Kontrastierung in Uranylacetat und Bleicitrat untersuchten wir die Präparate mit dem EM 10 der Firma Zeiss.

## Befunde

Alle Tiere der Gruppen II, III, IV, IX, X und XI überlebten bis zum Versuchsende. In den Gruppen V, VI, VII und VIII starben jeweils mehrere Tiere wenige Stunden nach der letzten Injektion. Auffallend ist, daß bis auf eines alle spontan gestorbenen Tiere zu den Gruppen gehörten die DHT und Katecholamin bzw. Angiotensin in Kombination bekommen hatten. Ein Einfluß von Strophanthin auf die Überlebensrate war nicht zu erkennen.

## Biochemische Ergebnisse

Unter den gemessenen Kationen zeigte Calcium die stärksten Abweichungen von den Kontrollwerten (Tabelle 3). Noradrenalin und Angiotensin, einzeln verabreicht, verursachten eine deutliche Abnahme, DHT eine Zunahme des Calciumgehaltes im Gewebe um mehr als das Sechsfache der Norm. Noradrenalin

**Tabelle 3.** Veränderungen der Konzentrationen von Calcium, Kalium und Magnesium im Herzmuskel der Ratte unter der Gabe von Dihydrotachysterol (DHT), Strophanthin, Noradrenalin und Angiotensin allein oder in Kombination

| Versuchstiergruppen             | Wassergehalt <sup>b</sup><br>in % | Kationen $\mu\text{Mol/g}$ Feuchtigkeit |                     |                        |
|---------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------|------------------------|
|                                 |                                   | Calcium                                 | Kalium <sup>a</sup> | Magnesium <sup>b</sup> |
| XI Kontrolle (6)                | 75,3 $\pm$ 1,2                    | 2,05 $\pm$ 1,14                         | 67,2 $\pm$ 6,2      | 6,57 $\pm$ 1,39        |
| I Noradrenalin (8)<br>(NA)      | 73,1 $\pm$ 2,9                    | 0,50 $\pm$ 0,39                         | 69,8 $\pm$ 9,5      | 6,86 $\pm$ 1,16        |
| II Angiotensin (8)<br>(ANG)     | 73,4 $\pm$ 0,7                    | 0,24 $\pm$ 0,10                         | 71,0 $\pm$ 10,7     | 7,15 $\pm$ 1,27        |
| X DHT (5)                       | 76,1 $\pm$ 0,7                    | 13,44 $\pm$ 9,20                        | 70,6 $\pm$ 5,1      | 7,11 $\pm$ 0,40        |
| III Stroph. + NA (8)            | 73,3 $\pm$ 0,3                    | 0,38 $\pm$ 0,07                         | 74,7 $\pm$ 12,2     | 7,29 $\pm$ 0,64        |
| IV Stroph. + ANG (7)            | 75,8 $\pm$ 1,1                    | 0,27 $\pm$ 0,10                         | 69,4 $\pm$ 9,1      | 6,77 $\pm$ 0,46        |
| V DHT + NA (6)                  | 72,7 $\pm$ 3,3                    | 47,04 $\pm$ 21,56                       | 65,8 $\pm$ 9,4      | 12,52 $\pm$ 3,16       |
| VI DHT + ANG (5)                | 73,9 $\pm$ 3,1                    | 59,17 $\pm$ 25,93                       | 66,2 $\pm$ 8,7      | 11,74 $\pm$ 1,79       |
| IX DHT + Stroph. (7)            | 75,8 $\pm$ 1,1                    | 14,11 $\pm$ 18,18                       | 62,9 $\pm$ 10,2     | 7,69 $\pm$ 1,06        |
| VII DHT + Stroph.<br>+ NA (7)   | 76,1 $\pm$ 1,3                    | 48,77 $\pm$ 34,07                       | 55,9 $\pm$ 10,4     | 10,47 $\pm$ 4,20       |
| VIII DHT + Stroph.<br>+ ANG (7) | 76,1 $\pm$ 0,5                    | 16,34 $\pm$ 14,01                       | 69,1 $\pm$ 10,3     | 7,55 $\pm$ 1,64        |

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar, die Zahl der Einzelwerte je Gruppe ist in Klammern angegeben

Die Werte wurden mit Ausnahme von Calcium mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse und des Scheffé-Testes für lineare Kontraste überprüft

<sup>a</sup> Nicht signifikant

<sup>b</sup>  $P < 0,01$ , jedoch lineare Kontraste zwischen Kontrollen und einzelnen Gruppen nicht signifikant

verstärkte die Wirkung auf den Calciumgehalt (Gruppe V) und führte zu einer exzessiven Calciumeinlagerung im Gewebe, die bereits von Fleckenstein et al. (1971) und anderen wiederholt als Folge einer Katecholamingabe beobachtet worden war. Noch ausgeprägter war jedoch die Potenzierung der Wirkung von DHT und Angiotensin (Gruppe VI).

Strophanthin in Kombination mit Noradrenalin bzw. Angiotensin bzw. DHT hatte keinen Einfluß auf die Wirkung der 3 Einzelsubstanzen (Gruppe I/III und II/IV sowie X/IX). Ein Vergleich der Gruppen, die mit DHT und Angiotensin (Gruppe VI) oder aber DHT zusammen mit Angiotensin und Strophanthin behandelt wurden (Gruppe VIII) zeigte jedoch, daß Strophanthin die massive Calciumerhöhung unter DHT mit Angiotensin verhinderte, nicht jedoch die durch Noradrenalin herbeigeführte Potenzierung der Wirkung von DHT (Gruppe VII). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, daß die synergistische Wirkung von Noradrenalin bzw. Angiotensin mit DHT auf unterschiedlichen zellulären Angriffspunkten beruht.

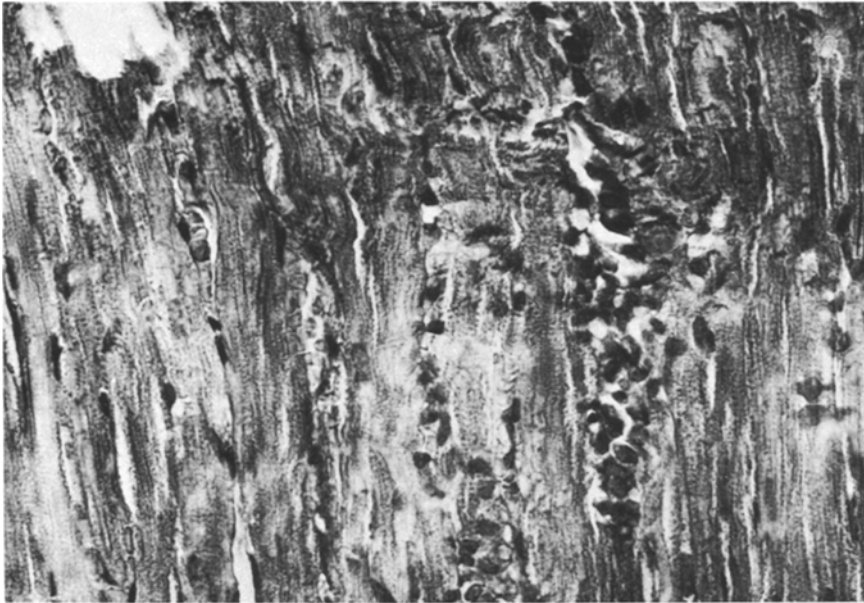
In den einzelnen Versuchstiergruppen fällt im übrigen eine sehr große Streuung der Einzelwerte auf, die nicht allein methodisch bedingt ist. Hier könnten eine unterschiedliche Ansprechbarkeit einzelner Versuchstiere oder auch toxische Sekundäreffekte der Medikationen die Ursache sein.

Für Kalium ergab die statistische Prüfung trotz einiger größerer Abweichungen von der Norm in den Gruppen III und VII keine gesicherten Unterschiede. Das gleiche gilt für die Abweichung des Magnesiumgehaltes in einzelnen Versuchstiergruppen, obwohl die Ergebnisse der einfachen Varianzanalyse eine zufällige Streuung ausschlossen. Die Magnesiumwerte waren unter der kombinierten Behandlung von DHT/Noradrenalin und DHT/Angiotensin gegenüber den Kontrollen nahezu verdoppelt, bei der Kombination von DHT/Noradrenalin/Strophanthin deutlich erhöht.

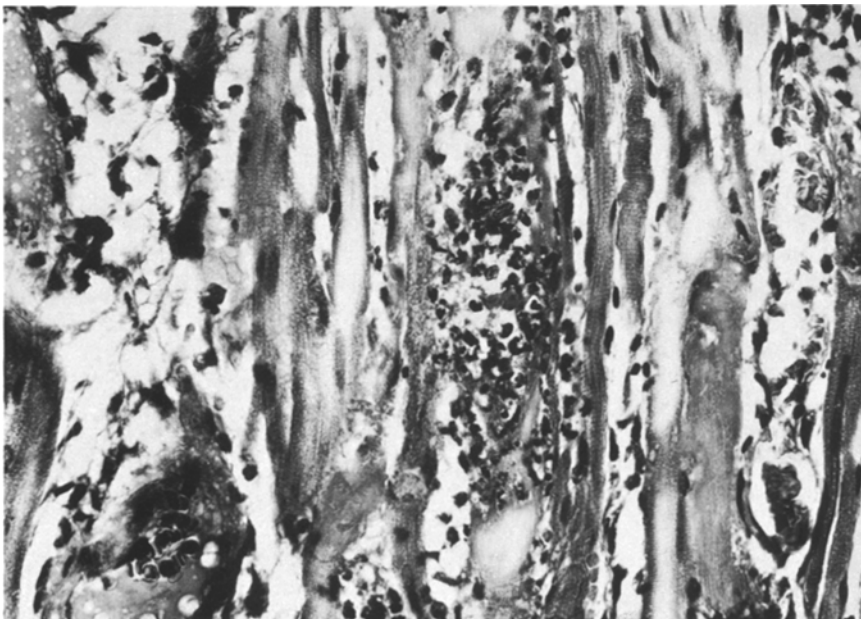
Betrachtet man das Kationen-Ionogramm insgesamt, so fällt auf, daß in den Gruppen mit massiver Calciumeinlagerung, deren elektrochemische Aktivität ( $\text{Calcium}^{2+}$ , mval/kg) die der Kaliumionen um fast das Doppelte übersteigt, *keine* kompensatorische Abnahme der Kalium- oder Magnesiumionen sichtbar ist. Im Gegenteil, parallel zur Calciumerhöhung nahm auch die Konzentration der Magnesiumionen zu. Der Wassergehalt läßt nicht erkennen, ob die Calciumeinlagerung zusammen mit Magnesium osmotisch wirksam gewesen ist. Dagegen war in einigen Gruppen (II, III, V, VI) sogar eine Tendenz zum Wasserverlust vorhanden. Auch von dieser Seite ist jedoch ein Zusammenhang mit den Elektrolytveränderungen nicht zu erkennen. Es bleibt zu bedenken, daß eine Abnahme der Natriumionenkonzentration im Gewebe, die nicht gemessen wurde, die Einlagerung anderer Kationen ausgeglichen hat.

### Lichtmikroskopische Befunde

Lichtmikroskopisch fanden sich bei den Tieren, die Noradrenalin oder Angiotensin ohne bzw. mit Strophanthin bekommen hatten, disseminierte Herzmuskelfasernekrosen mit zellulärer Abraumreaktion, wie wir sie bereits in vorausgegangenen Arbeiten beschrieben haben. Wiederum waren die linksventrikulären Innen-



**Abb. 1a.** Herzmuskelnekrosen mit zellulärer Abraumreaktion in den linksventrikulären Innenschichten des Rattenherzens nach l-Noradrenalininjektion. (HE-Färbung; Vergrößerung:  $20 \times 9,6$ ; Nachvergrößerung: 0,64mal)



**Abb. 1b.** Kalkherde und Nekrosezonen im Rattenherzen nach Gabe von DHT und l-Noradrenalin. (HE-Färbung; Vergrößerung:  $20 \times 9,6$ ; Nachvergrößerung: 0,4mal)

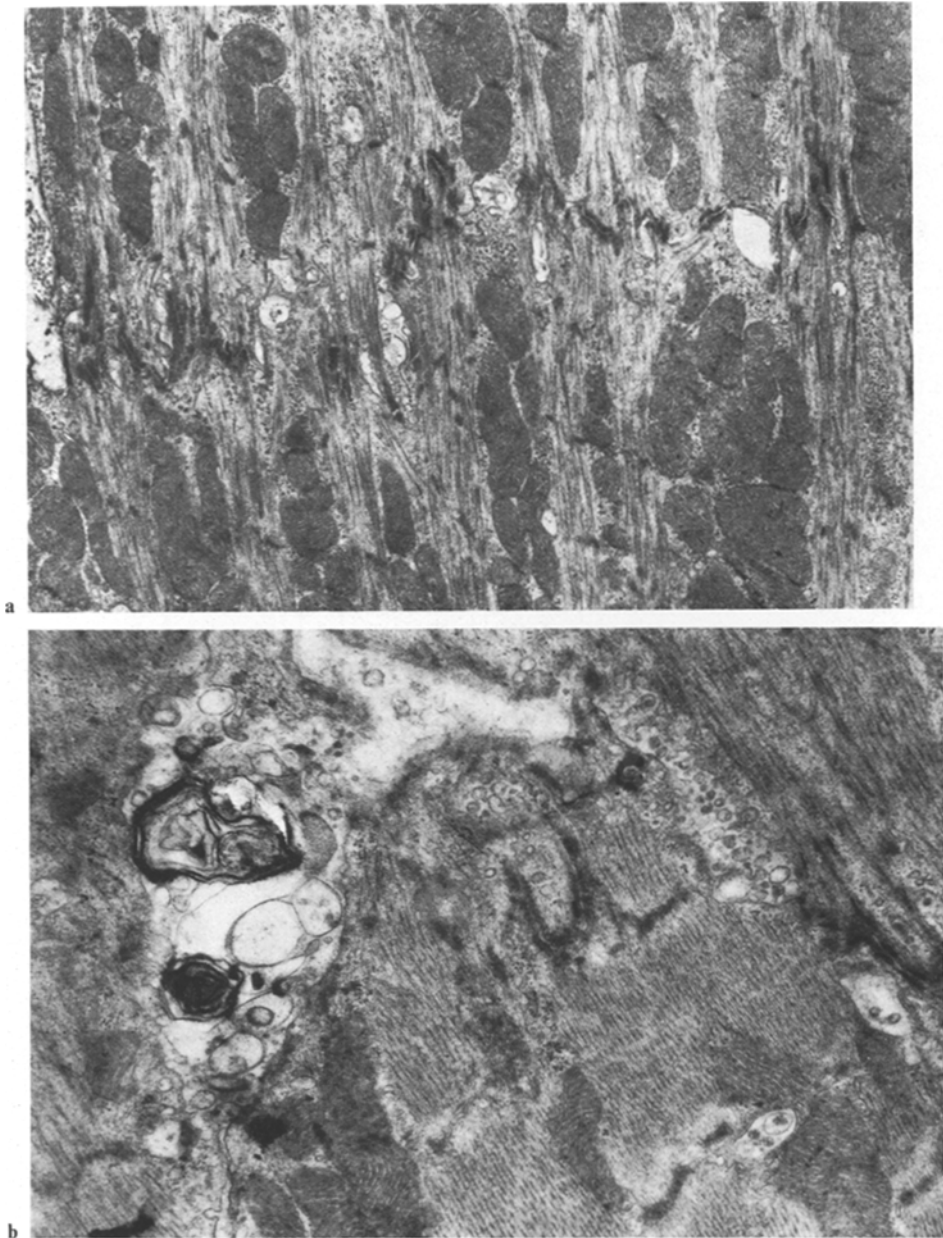
schichten — und hier besonders im Bereich der Papillarmuskelgruppen — betroffen. Bei diesen 4 Tiergruppen fand sich biochemisch eine Abnahme des Calciumgehaltes (Gruppe I, II, III, IV).

Die Prämedikation mit DHT bewirkte bereits im lichtmikroskopischen Bild eine Änderung des Schädigungsmusters (Abb. 1a und b). Die Gabe von DHT allein oder in Kombination mit Noradrenalin bzw. Angiotensin führte zu teilweise konfluierenden Nekrosen sowie zur Ausbildung von Verkalkungsherden. Diese Verkalkung, die die Muskelfasern schollig umwandelte, bildete sich häufig perivaskulär aus und bezog die Gefäßwände in diesen Prozeß mit ein. Betroffen waren nicht nur kleine Kapillaren, sondern auch die Wände größerer Gefäße. Häufig zeigten die Kalkherde keinerlei zelluläre Randinfiltration; sie schienen reaktionslos innerhalb intakter Herzmuskelpartien zu liegen. Die durch DHT allein oder in Kombination mit Noradrenalin bzw. Angiotensin hervorgerufenen Nekrosen und Verkalkungsherde zeigten *keinen* überwiegenden Befall der linksventrikulären Innenschichten. Sie waren vielmehr häufig transmural zu finden, vielfach flächenhaft subepikardial von der Herzbasis bis zur Herzspitze ausgebreitet und wurden nicht selten von einer deutlichen epikarditischen Reizung begleitet. Betroffen waren linke und rechte Kammer gleichermaßen. Auch die beiden Vorhöfe zeigten disseminierte Fasernekrosen sowie häufig ausgedehnte Abscheidungsthromben. Bei diesen Tieren der Gruppen X, V, VI fanden wir eine insgesamt erhebliche, bei einigen sogar eine ganz exzessive Calciumerhöhung.

### Elektronenmikroskopische Befunde

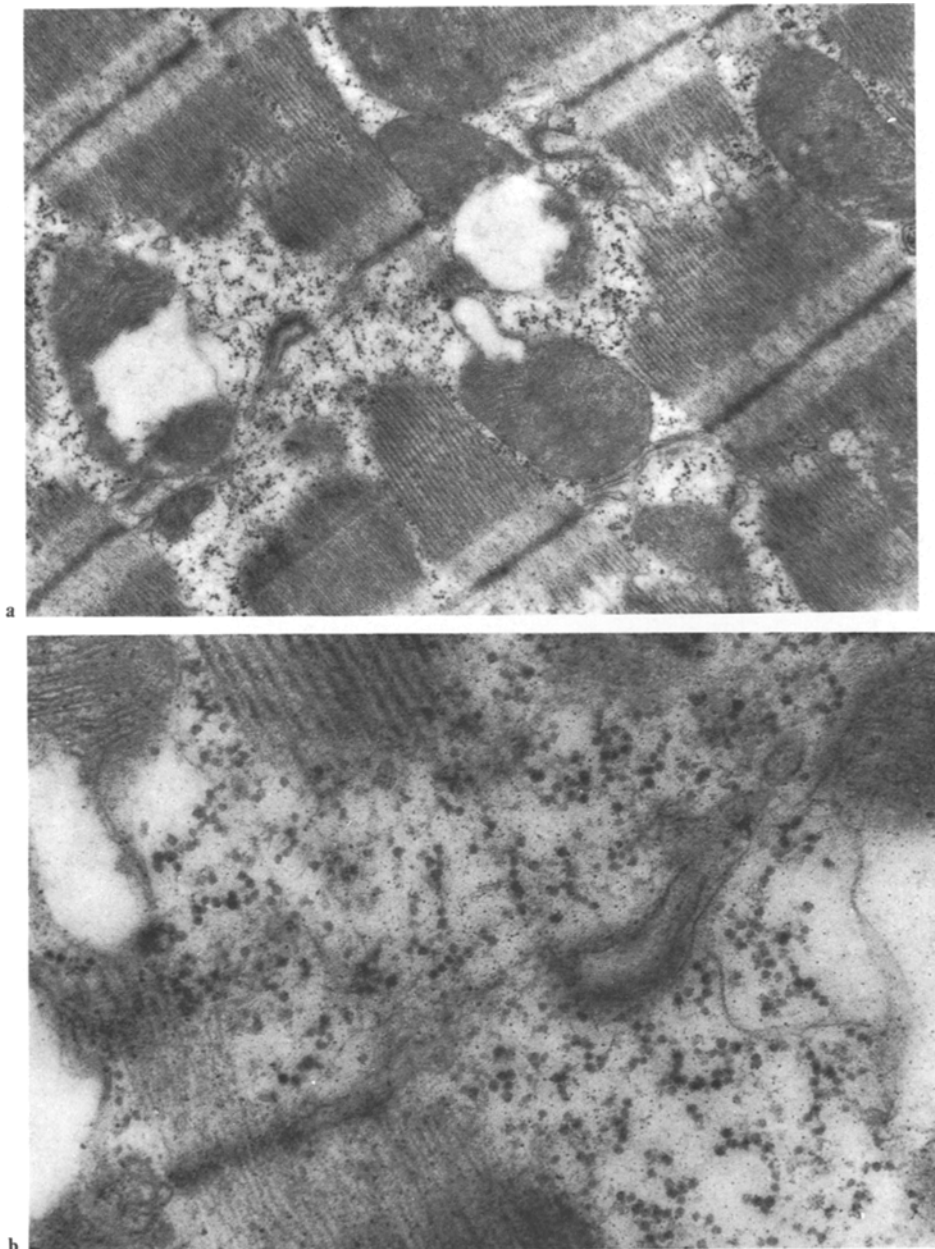
Im elektronenmikroskopischen Bild zeigten die Tiere, die Noradrenalin mit oder ohne Strophanthinprämedikation oder aber Angiotensin und Strophanthin erhalten hatten (Gruppe I, III, IV) — also Tiere, die einen gegenüber der Kontrolle erniedrigten Calciumgehalt aufwiesen — herdförmige Veränderungen mit überwiegender Schädigung der Myofibrillen. Dabei fanden sich ein interfibrilläres Ödem mit Schwund der metameren Gliederung sowie teilweise erhebliche Dehiszenzen im Bereich der Glanzstreifen (Abb. 2a und b). Gelegentlich sahen wir Fettvacuolen. Die Mitochondrien waren insgesamt kaum alteriert und auch im Bereich stärkerer Myofibrillenveränderungen kamen in ihrer Struktur erhaltene Mitochondrien ohne Vacuolisation zur Darstellung. Bei alleiniger Angiotensingabe, die gleichfalls eine Erniedrigung des Gesamtcalciumgehaltes bewirkte, fanden wir dagegen Mitochondrienvacuolisationen, eine Dilatation des tubulären Systems und kaum veränderte Myofibrillen.

Nach alleiniger DHT-Medikation (Gruppe X), die zu einer sechsfachen Erhöhung des Gesamtcalciumgehaltes führte, sahen wir große, ganz gleichmäßig aussehende Herde, in denen alle Mitochondrien eine erhebliche Vacuolisation und Cristolyse zeigten. Die Myofibrillen endeten in diesen Bereichen gleichsam abrupt „im Leeren“ ohne Kontraktionsbänder, ohne Ödem und ohne durchgehenden Verlust der metameren Gliederung (Abb. 3a und b). Erst bei fortgeschrittener Schädigung ging die straffe myofibrilläre Gliederung verloren. Zwischen den aufgelösten Myofibrillen waren reichlich Glykogengranula auszumachen.

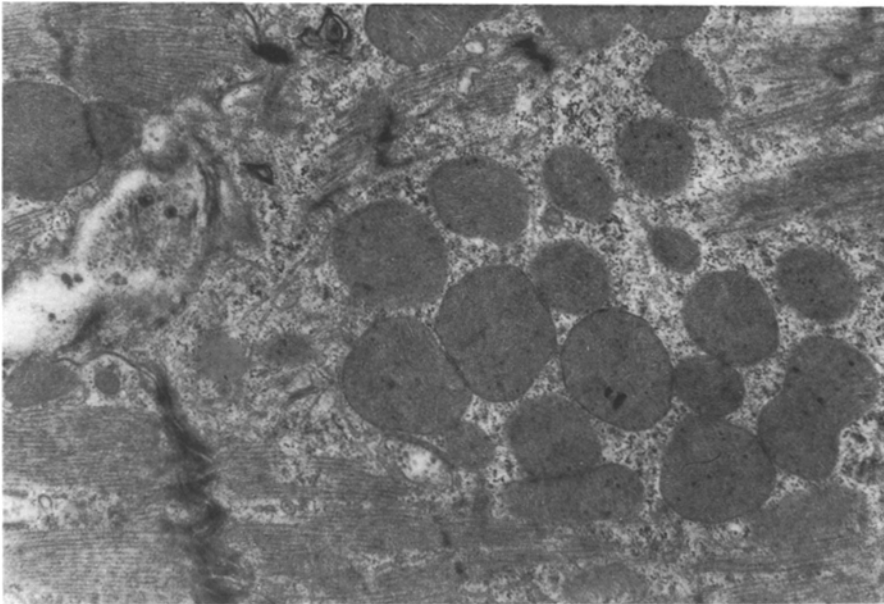


**Abb. 2a und b.** Strophanthin- und Angiotensinmedikation. **a** Herzmuskelzelle mit interfibrillärem Ödem und Strukturverlust der Myofibrillen. Weitgehend erhaltene Mitochondrien. (Vergrößerung: 3700; Nachvergrößerung: 2,0mal.) **b** Glanzstreifen mit erheblicher Dehiszenz; Dilatation des tubulären Systems und Ausbildung sog. Myelinfiguren. (Vergrößerung: 7700; Nachvergrößerung: 2,0mal)





**Abb. 3a und b.** Kombinierte Gabe von DHT, Strophanthin und Angiotensin. **a** Herzmuskelfaser mit vakuolisierten Mitochondrien, herdförmiger Auflösung der Myofibrillen bei insgesamt noch erkennbarer metamerer Gliederung und Ablagerung von Glykogen. (Vergrößerung: 7820; Nachvergrößerung: 2,0mal.) **b** Oben beschriebene Veränderungen in höherer Auflösung. (Vergrößerung 23200; Nachvergrößerung: 2,0mal)



**Abb. 4.** Kombinierte Gabe von DHT, Strophanthin und l-Noradrenalin. Herzmuskelfaser mit subtotaler Auflösung der Myofibrillen und reichlich Ablagerung von Glykogen. Mitochondrien mit erhaltenen Cristae mitochondriales. (Vergrößerung: 7820; Nachvergrößerung: 2,0mal)

Auffallend waren zahlreiche Endothelzellen mit einem ausgedehnt vacuolisierten Cytoplasma.

Gleichartige Veränderungen zeigten auch die Tiere, die DHT in Kombination mit Angiotensin und Noradrenalin mit oder ohne Strophanthinprämedikation erhalten hatten. Immer wieder waren in den Mitochondrien, aber auch interstitiell kleine, kugelige, elektronendichte Ablagerungen zu sehen. Wir fanden jedoch auch Herde, in denen die Myofibrillen aufgelöst, die Mitochondrien dagegen erhalten geblieben waren (Abb. 4).

Die oben beschriebenen Befunde – abrupt endende Myofibrillen mit überwiegend erhaltener metamerer Gliederung, reichlich Glykogengranula und elektronendichte Substanzen in den Mitochondrien bei gleichzeitiger Cristolyse – fanden wir ausschließlich bei den Tieren, die DHT allein oder mit den anderen Substanzen kombiniert verabreicht bekommen hatten.

## Diskussion

In Fortführung unserer früheren Untersuchungen an der Feinstruktur der durch Noradrenalin (Kreinsen und Büsing, 1975) und Angiotensin (Raute-Kreinsen et al., 1976) induzierten Muskelfasernekrosen am Rattenherzen haben wir jetzt den Versuch unternommen, die möglicherweise zentrale Rolle des intrazellulären

freien Calciums für die Nekrosen-Entstehung, das lichtmikroskopische Verteilungs- und das elektronenmikroskopische Schädigungsmuster näher zu charakterisieren. Zu den bereits früher verwendeten Pharmaka Noradrenalin, Angiotensin und Strophanthin haben wir Dihydrotachysterol (DHT) allein oder in Kombination mit den anderen Pharmaka (Tabelle 1) hinzugefügt. Es sollte geprüft werden, ob DHT allein keine Herzmuskelnekrosen verursacht wie von Fleckenstein et al. (1971) beschrieben wurde und weiterhin, welche Bedeutung die durch DHT ausgelöste Calciummobilisation aus den Körperdepots für die kardiomyotoxische Wirkung der anderen Pharmaka hat. Diese Fragestellung machte neben der quantitativen Analyse von Kalium und Magnesium, vor allem die des Calciumgehaltes im Herzmuskel erforderlich.

Die unter der Gabe von Noradrenalin und Angiotensin ohne DHT beobachteten strukturellen Schäden entsprachen im wesentlichen dem früher beschriebenen Bild. *Elektronenmikroskopisch* sahen wir bei Noradrenalin mit und ohne Strophanthinprämedikation und nach Angiotensininjektion in Kombination mit Strophanthin kleine Herde mit bevorzugter Schädigung der Myofibrillen in Form von interfibrillärem Ödem und Verlust der Querstreifung, Veränderungen, wie sie in der Literatur – nicht unwidersprochen – als vergleichsweise typische Schädigung nach hohen Katecholamindosen beschrieben werden (Ferrans et al., 1964; David et al., 1968; Hatt und Moravec, 1971/1972). Die Mitochondrien waren wenig alteriert. Nach alleiniger Angiotensingabe (Gruppe II) waren Herde mit vacuolisierten Mitochondrien und relativ wenig veränderten Myofibrillen auszumachen. Strophanthin hatte somit wiederum – wie in vorausgegangenen Arbeiten bereits beschrieben (Kreinsen und Büsing, 1975; Raute-Kreinsen et al., 1976) – zu einem Wechsel des Schädigungsmusters von Zellorganellen und Metaplasma geführt. Der Gesamtcalciumgehalt war bei den Tieren dieser Gruppen (I, II, III und IV) gegenüber der Norm erniedrigt. Eine Wirkung des Strophanthin auf den Calciumspiegel war nicht zu erkennen. Allerdings wurde hier nicht geprüft, ob Strophanthin allein den Calciumgehalt im Herzmuskel beeinflusst.

Unser Befund einer Calciumerniedrigung unter Noradrenalin und Angiotensin steht in scheinbarem Widerspruch zu dem in zahlreichen Experimenten nachgewiesenen erhöhten transmembranären Calciumeinstrom in die Zelle sowie der erleichterten intracellulären Calciumfreisetzung unter Katecholaminen und Herzglykosiden (Peach und Ford, 1968; Repke, 1964; Greff, 1973; Klaus und Krebs, 1974). Es muß jedoch die hier verwendete Aufschlußmethode des Gewebes bedacht werden, die eine Aussage darüber, ob das gemessene Calcium extracellulär oder intracellulären Ursprungs oder aber in freier Form als Ionen oder gebunden vorlag, nicht zuläßt. Zudem müssen Ergebnisse kinetischer Untersuchungen mit Hilfe von  $^{45}\text{Ca}$  und die einer globalen Bestimmung des Calciumgehaltes im Gewebe unterschiedlich interpretiert werden. So erhöhte z.B. Isoproterenol zwar den Calciumaustausch im Herzmuskel um ein Vielfaches, ohne gleichzeitig den Gesamtcalciumgehalt im Gewebe zu steigern (Fleckenstein et al., 1971). Eine Erniedrigung des cellulären Calcium bei gleichzeitig gesteigertem Calciumaustausch wäre deshalb mit einer intracellulären Mobilisation und erhöhten Abgabe von Calcium durch die Zellmembran, die an die Natrium-, Kalium-ATPase gekoppelt ist, zu erklären. Da der Einstrom von Calcium durch die Plasmamem-

bran über eine passive Diffusion nicht Schritt hält, resultiert in längerfristigen Experimenten schließlich eine intracelluläre Calciumsenkung, während die katecholamin-induzierte Mobilisation primär einen erhöhten Austausch zur Folge hat. Im Hinblick auf die morphologischen Veränderungen müßte diese Mobilisation mit einer Freisetzung von Calciumionen im tubulären System und einer Aktivierung der Myofibrillen-ATPase gleichbedeutend sein.

In unseren Untersuchungen zog die Gabe von DHT allein eine deutliche Erhöhung des Calciumgehaltes im Herzmuskel nach sich. Morphologisch waren nach DHT-Fütterung Nekrosen und Kalkherde transmural in beiden Ventriceln – häufig auch in den Vorhöfen – ausgebreitet und nicht selten von einer epikarditischen Reizung begleitet. Die ubiquitäre Ausbreitung der katecholamin- und angiotensin-induzierten Nekrosen *nach* DHT Prämedikation steht im Gegensatz zur streng linksventriculären und vorwiegend auf die Innenschichten des Herzmuskels bezogene Lokalisation der Nekrosen *ohne* vorherige DHT-Fütterung. Es ist zu überlegen, ob dieser Wechsel ausschließlich auf den massiven Unterschieden im Gesamtcalciumgehalt des Herzmuskels beruht.

*Elektronenmikroskopisch* waren große Herde mit gleichmäßig vacuolisierten Mitochondrien und abrupt endenden Myofibrillen bei grundsätzlich erhaltener metamerer Gliederung für alle mit DHT gefütterten Tiere recht typisch (Abb. 3a und b). Charakteristisch waren zudem intracellulär und interstitiell ausgebildete Kalkschollen, elektronendichte Kalk- bzw. Calciumablagerungen in den Mitochondrien und hochgradig vacuolisierte Endothelzellen, wie sie auch Dropmann (1966) beschrieben hat.

Bei der Kombination von DHT mit Noradrenalin und Strophanthin fanden wir zusätzlich Herde, in denen die Myofibrillen teils aufgelöst, teils wie vernarbt aussahen. Typische Kontraktionsbänder, wie sie bei Calciumüberladung der Zelle nach Katecholamingaben beschrieben werden (Hecht, 1970), haben wir nicht ausmachen können. Die Mitochondrien waren in ihrer Struktur erhalten.

Das gleiche Bild trat als Folge der kombinierten Gabe von DHT und Angiotensin mit Strophanthinprämedikation auf, *obwohl* Strophanthin hier den mit Noradrenalin/DHT beobachteten Calciumanstieg verhinderte.

Dihydrotachysterol setzt zum einen Calcium aus dem Knochen frei und erhöht zum anderen die intestinale Resorption von Calcium (Ehrhart und Ruschig, 1972). Daraus resultiert ein Anstieg des Calciumspiegels im Blut und ein vermehrter Einstrom von Calcium in den Extracellulärraum und in das Zellinnere. Dieser Mechanismus allein dürfte jedoch die besonders unter DHT/Noradrenalin bzw. DHT/Angiotensin eingetretenen massiven Calciumeinlagerungen nicht hinreichend erklären. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Potenzierung auf einer Wechselwirkung dieser Pharmaka mit cellulären Steuerungsmechanismen beruht. Welche Faktoren daran beteiligt sind, ist nicht klar.

Nach heutiger Auffassung wirkt eine Überschwemmung der Muskelzelle mit Calcium primär schädigend über eine anhaltende Stimulierung der Ca-ATPase des Actomyosins mit schließlicher Erschöpfung der Vorräte an energiereichen Phosphaten und deren Bildungsstätten. Bei einem hohen Überschuß an Calcium in der Zelle muß man darüber hinaus in Betracht ziehen, daß Eiweiße und Phospholipide und damit auch Membranoberflächen Calcium kovalent binden können. In dieser Konfiguration bilden divalente Kationen ihrerseits

mit primär löslichen Zellproteinen membranständige Komplexe mit der Folge, daß die Eigenschaften von Grenzflächen für den Stoffaustausch oder die katalytische Aktivität von gebundenen Enzymproteinen (Masters, 1977) verändert werden. Ein Anschwellen der Mitochondrien als Ausdruck einer Stoffwechselschädigung wurde bei Calciumüberladung der Herzmuskelzelle beobachtet (Fleckenstein, 1975). Allerdings weisen die Kalkablagerungen in den Zellen, die hier beobachtet wurden, darauf hin, daß ein beträchtlicher Anteil des Calcium in Form von Salzen ausgefallen war und daher nicht mehr als freies Ion reagieren konnte.

In bezug auf vorausgegangene Arbeiten und der eingangs aufgeworfenen Fragen stellen wir nach den vorliegenden Ergebnissen fest:

1. Strophanthin *erhöht* die Zahl der durch Noradrenalin und *senkt* die Zahl der durch Angiotensin ausgelösten Herzmuskelfasernekrosen; Strophanthin ändert darüber hinaus das elektronenmikroskopische Schädigungsmuster von Angiotensin. Bei diesen Tiergruppen (I, II, III, IV) fanden wir eine Senkung des Gesamtcalciumgehaltes des Herzmuskels. Der Calciumspiegel kann somit als Ursache für diesen unterschiedlichen Effekt nicht in Frage kommen.

2. DHT allein verabreicht führt zu einer Erhöhung des Gesamtcalciumgehaltes im Myokard und zeigt morphologisch Kalkherde und Nekrosen mit Befall *aller* Herzkammerwandanteile sowie ein elektronenmikroskopisch einigermaßen typisches Schädigungsmuster.

3. Strophanthin zeigt in Kombination mit DHT und Noradrenalin einerseits und mit DHT und Angiotensin andererseits eine unterschiedliche Wechselwirkung: Strophanthin *verhindert* die durch DHT/Angiotensin ausgelöste Potenzierung des Calciumgehaltes, während die calciuminhibitorische Komponente in der Verbindung DHT/Noradrenalin nicht zum Tragen kommt. Elektronenmikroskopisch konnten keine sicheren Unterschiede im Schädigungsmuster gefunden werden, wobei möglicherweise bei so exzessiver Calciumerhöhung feinere Differenzen verwischt werden.

## Literatur

- Bühler, F., Bersch, W., Kreinsen, U.: Zur Pathomorphologie der sogen. Epinephrin-Myokarditis nach Gabe von Hypertensin. *Virchows Arch. A* **363**, 249–258 (1974)
- David, H., Hecht, A., Uerlings, J.: Noradrenalinbedingte Feinstrukturveränderungen des Herzmuskels der Ratte. *Beitr. path. Anat.* **137**, 1–18 (1968)
- Doerr, W.: Morphologie der Myokarditis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **77**, 301–303 (1971)
- Dropmann, K.: Feingewebliche Umwandlung in der Aorta des Kaninchens nach AT 10-Fütterung und ihre Auswirkungen auf die Funktion der Gefäßwand. *Zeitschrift für Kreislaufforschg.* Bd. **55**, 1203–1218 (1966)
- Ehrhart, G., Ruschig, H.: *Arzneimittel. Entwicklung-Wirkung-Darstellung* Bd. 3 Weinheim: Verlag Chemie 1972
- Ferrans, J.V., Hibbs, R.G., Black, W.C., Weilbaecher, D.G.: Isoprotenerol-induced myocardial necrosis. A histochemical and electron microscopic study. *Amer. Heart. J.* **68**, 71–90 (1964)
- Fleckenstein, A., Janke, J., Döring, H.J., Leder, O.: Die intracelluläre Überladung mit Kalzium als entscheidender Kausalfaktor bei der Entstehung nichtcoronarogener Myokard-Nekrosen. Sonderdruck aus: *Verhandl. Dtsch. Ges. Kreislaufforschg.* Bd. 37. Das gesunde und kranke Herz bei körperlicher Belastung. Darmstadt: Steinkopff 1971
- Fleckenstein, A.: Physiologie und Pharmakologie der transmembranären Natrium-, Kalium- und Calcium-Bewegungen. *Arzneimittel-Forsch.* **22**, 2019–2028 (1972)

- Fleckenstein, A., Döring, H.J., Janke, J., Byon, Y.K.: Basis actions of ions and drugs on myocardial high-energy phosphate metabolism and contractility. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie Vol. XVI, 3, S. 345–405, New York-Berlin-Heidelberg: Springer 1975
- 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)
- Gavras, H., Kremer, D., Brown, J.J., Gray, B., Lever, A.F., Mac Adam, R.F., Medina, A., Morton, J.J., Robertson, J.I.S.: Angiotensin- and norepinephrineinduced myocardial lesions: experimental and clinical studies in rabbits and man. *Amer. Heart J.* **89**, 321–332 (1975)
- Greff, K.: Pharmakologische Grundlagen der Digitalistherapie. *Med. Welt* **24**, 613–618 (1973)
- Hatt, P.Y., Moravec, J.: Acute Hypoxia of the Myocardium Ultrastructural Changes. *Cardiology* **56**, 73–84 (1971/72)
- Hecht, A.: Einführung in experimentelle Grundlagen moderner Herzmuskelpathologie. Jena: VEB G. Fischer 1970
- Klaus, W., Krebs, R.: Kinetische Analyse der Calcium-Kompartimente im Meerschweinchenherzen unter Kontrollbedingungen und Strophanthineinwirkung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **283**, 277–292 (1974)
- Kreinsen, U., Büsing, C.M.: Experimentelle Herzmuskelnekrosen bei der Ratte nach Gabe von 1-Noradrenalin und Strophanthin. *Virchows Arch. A* **367**, 47–57 (1975)
- Masters, C.J.: Metabolic regulation and the microenvironment. *Trends Biochem. Sci.* **2**, 66–68 (1977)
- Peach, M.J., Ford, G.D.: The actions of angiotensin II on canine myocardial and plasma catecholamines. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **162**, 92–100 (1968)
- Raute-Kreinsen, U., Döhnert, G., Büsing, C.M.: Experimentell induzierte Herzmuskelfasernekrosen nach Praemedikation mit Strophanthin. *Virchows Arch. A* **370**, 141–150 (1976)
- 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

*Eingegangen am 9. Mai 1977*