

Stereologische Quantifizierung isoproterenolinduzierter Myokardnekrosen

O. Leder

Anatomisches und Physiologisches Institut der Universität Freiburg i. Brsg.

Zur quantitativen Bestimmung von experimentellen Myokardfasernekrosen wird eine Methode beschrieben. Sie verwendet das Prinzip der Punktzählung. Das Verfahren wird an zwei Beispielen erläutert, wobei das letztere die nekroseverhütende Wirkung des anorganischen Kalziumantagonisten Mg^{++} demonstriert.

Die Zerstörung der Myokardfasern infolge eines Defizits an chemischer Energie kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Vorgänge zurückgeführt werden [1]:

1. auf eine ungenügende Synthese von energiereichen Phosphatverbindungen und
2. auf eine zu starke Aktivierung des Myokards, wobei es zu einem Zusammenbruch der energiereichen Phosphatfraktionen kommt.

Dieser zweite Mechanismus liegt der isoproterenolbedingten Myokardnekrotisierung zugrunde. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die Überladung des Myokards mit Ca^{++} -Ionen, die den Kontraktionsablauf nicht nur auslösen, sondern auch quantitativ bestimmen [2].

Da der Begriff „Nekrose“ in erster Linie morphologisch zu definieren ist, liefen morphologische Studien im Arbeitskreis von Fleckenstein von Anfang an den pathophysiologischen und pharmakologischen Untersuchungen zum Problem der isoproterenolinduzierten Herzmuskelschädigung parallel. Hierbei ergab sich sehr bald die Notwendigkeit, ein objektives, quantitatives Verfahren zur Bestimmung des Ausmaßes des Myokardschadens an kleinen Laboratoriumstieren wie Ratten zu entwickeln. Über unsere stereologische, d. h. auf dem Prinzip der geometrischen Wahrscheinlichkeit beruhende Methode soll an dieser Stelle berichtet werden, da sie unseres Wissens das erste und einzige Verfahren ist, das eine objektive, der Größenordnung nach richtige Schätzung der Nekrosehäufigkeit ermöglicht. Das Verfahren ist deshalb wie kein anderes geeignet, das Ausmaß einer experimentellen Myokardschädigung durch Isoproterenol und die Wirkung von Schutzstoffen zu erfassen.

Material und Methodik

Für die quantitative Bestimmung von Myokardfasernekrosen im Rattenherzen kurz (6 Stunden) nach der subkutanen Injektion von Isoproterenolsulfat (Aludrin) werden unfixierte Gefrierschnitte in einer Dicke von 10 μm hergestellt. Die Herzen werden in Formol oder

Bouinscher Lösung fixiert und in Paraffin oder Paraplast eingebettet, wenn die Ratten erst 24 Stunden nach der Isoproterenolgabe getötet werden. Das eingebettete Material wird 4 bzw. 5 μm dick aufgeschnitten. In jedem Fall liegt die Schnittfläche parallel einer von der Herzbasis zur Herzspitze durch beide Mantelkanten ziehenden Ebene. Die für die quantitative Analyse benötigten Schnitte werden entweder gezielt aus der Mitte jedes Herzens oder als einfache bzw. als modifizierte Wahrscheinlichkeitsstichprobe entnommen. Die Schnitte werden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Die Auswertung erfolgt durch Punktzählung: Die Schnitte werden unter dem Mikroskop (Objektiv 10 bzw. 16, Revolverokular 10 \times der Fa. Carl Zeiss mit Integrationsplatte Nr. I – quadratisches Netz mit 25 Punkten –) lückenlos nach Myokardfasern und Myokardfasernekrosen durchmustert. Sämtliche Punkte werden gezählt, die auf Myokardfasern zu liegen kommen. Davon getrennt werden noch einmal diejenigen Myokardfasern, die nekrotisch sind, registriert. Die Häufigkeit von Myokardfasernekrosen wird in Prozent sämtlicher Myokardfasern angegeben.

Zur verfahrenstechnischen Definition der Myokardfasernekrosen werden folgende morphologische Veränderungen herangezogen:

1. Zeichen der Nekrotisierung an den Myokardfasern: wolkenartige Desintegration der Myokardfasern mit Verlust der Ordnung von Längs- und Querstreifung (insbesondere am unfixierten Gefrierschnitt feststellbar); kräftig mit Eosin gefärbte Myokardfasern, homogenisierte (milchglasartig) erscheinende Myokardfasern. Myokardfasern mit stark durch Hämatoxylin gefärbten (hyperchromatotischen) und mit geschrumpften (pyknotischen) Kernen sowie mit zertrümmerten Kernen (Karyorrhexis). Schollig und körnig zerfallene Myokardfasern.
 2. Strukturen anstelle von nekrotischen Myokardfasern: leere Sarkolemmschläuche, mit Phagozyten angefüllte Sarkolemmschläuche; Phagozyten innerhalb nekrotischen Materials.
 3. Herde aus Bindegewebe und eingewanderten Zellen, in denen nur noch wenige Bruchstücke von Myokardfasern vorhanden sind und die ehemalige Lage der Myokardfasern nicht mehr feststellbar ist. Solche Herde finden sich 24 Stunden, jedoch nicht 6 Stunden nach der Isoproterenolinjektion.
- Die Berechnung der Mittelwerte und der mittleren Ab-

weichung vom Mittelwert erfolgt bei den gezielten Stichproben von 1 Schnitt pro Herz als ungewogenes Mittel mit

$$p = 100 \frac{\sum (y_i/x_i)}{n} \text{ und } s_p = 100 \sqrt{\frac{\sum (p_i - p)^2}{n(n-1)}}$$

Bei einfachen Wahrscheinlichkeitsstichproben wird für die Berechnung der Nekrosehäufigkeit und ihrer Streuung innerhalb und zwischen den Tieren eine Verhältnisschätzung vorgenommen mit

$$p = 100 \frac{\sum y_i}{\sum x_i} \text{ und } s_p = 100 \sqrt{\frac{\sum (y_i - 0,01 p x_i)^2}{n \bar{x}^2 (n-1)}}$$

Bei Wahrscheinlichkeitsstichproben mit nur einem Schnitt pro Tier kann nach beiden Verfahren gerechnet werden. Die Abweichung vom Erwartungswert kann in beiden Fällen groß sein.

Ergebnisse

In Tabelle 1 ist zunächst die Abhängigkeit der Myokardnekrotisierung von der Isoproterenoldosis in einem Bereich von 3 bis 300 mg/kg Körpergewicht wiedergegeben. Die Häufigkeit der Nekrosen beträgt im gesamten Dosisbereich allenfalls einige Prozent. Ist die Annahme richtig, daß eine Überladung des Myokards mit Kalzium für die Entstehung von Nekrosen nach der Applikation von Isoproterenol entscheidend ist, so müssen alle kalziumantagonistischen Substanzen das Ausmaß der Nekrotisierung verringern. Dies ist bei den anorganischen Kalziumantagonisten wie z. B. Verapamil (Isoptin) ebenso der Fall [2] wie bei den anorganischen Kalziumantagonisten K^+ und Mg^{++} (vgl. Tab. 2).

Besprechung

In der von uns angewendeten Methode werden die Myokardfasernekrosen auf die Gesamtheit der Myokardfasern bezogen, d. h., die Schätzung erfolgt mit Hilfe von 2 Variablen. Dieses Vorgehen ist nicht nur der pathologisch-physiologischen Fragestellung angepaßt, sondern hält auch diejenigen Fehler klein, die durch die endliche Schnittdicke und das Auflösungsvermögen des Mikroskops bedingt sind [3]. Soweit mehrere Schnitte pro Herz in einer einfachen Wahrscheinlichkeitsstichprobe untersucht werden, ist die Anwendung der Formeln für Verhältnisschätzungen wegen der ungleich großen Stichprobeneinheiten (Myokardfasern pro Schnitt) angebracht; denn diese Schätzung zeigt keine schwerwiegende Verzerrung bei Auswertung zahlreicher Stichprobeneinheiten und ist konsistent in dem Sinne, daß der Populationswert mit Vermehrung der Stichprobeneinheiten immer besser angenähert wird, während dies für das ungewogene Mittel in einem solchen Falle nicht gilt. Bei einer Wahrscheinlichkeitsstichprobe mit nur einem Schnitt pro Herz kann die unterschiedliche Größe der Stichprobeneinheiten ebenfalls mit dieser Methode berücksichtigt werden (vgl. Tab. 1). Bei einer gezielten Stichprobe sind weder Verzerrungsfreiheit noch Konsistenz gewährleistet. Dafür ist jedoch die Variabilität in der Größe der Stichprobeneinheiten gering. In diesem Falle ist der Ein-

Tabelle 1 Volumenprozentiger Anteil der Myokardfasernekrosen an der Gesamtheit der Myokardfasern beider Ventrikel 24 Stunden nach subkutaner Applikation von Isoproterenolsulfat. Männliche Wistar-Ratten, Körpergewicht 175 bis 250 g. 4 μ m dicke Paraplastschnitte. Auswertung bei 160facher Mikroskopvergrößerung. Anzahl der Herzen pro Versuchsgruppe $n = 10$. Wahrscheinlichkeitsstichprobe von 1 Schnitt pro Herz. Berechnung des Mittelwerts und der mittleren Abweichung vom Mittelwert als Verhältnisschätzung

Isoproterenolsulfat (mg/kg)	Myokardfasernekrosen (%)
3	0,5 \pm 0,1
30	0,6 \pm 0,0
100	1,5 \pm 0,2
200	1,8 \pm 0,4
300	2,8 \pm 0,7

Tabelle 2 Hemmeffekt von gleichzeitig peroral appliziertem KCl, $MgCl_2$ oder KCl + $MgCl_2$ auf die isoproterenolbedingte Myokardnekrotisierung. Männliche Siv-50-Ratten. Untersuchung 6 Stunden nach der subkutanen Gabe von Isoproterenol und der Verabreichung der genannten Salze. Unfixierte, 10 μ m dicke Gefrierschnitte. Gezielte Stichprobe eines Schnittes pro Herz aus der Mitte eines jeden Herzens. Auswertung bei 100facher Mikroskopvergrößerung. Berechnung als ungewogenes Mittel. Prüfung auf Unterschiede in der Nekrosehäufigkeit mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (zweiseitig) ergibt für die mit KCl und die mit KCl + $MgCl_2$ behandelten Tiere im Vergleich mit der Isoproterenolgruppe eine exakte Wahrscheinlichkeit von $p = 0,000$ unter der Hypothese (H_0), daß die verglichenen Tiergruppen zur gleichen Verteilung gehören. Der entsprechende Wert von p in bezug auf die mit $MgCl_2$ behandelten Tiere beträgt 0,002

Behandlung	Ratten	Nekrosen (%)
30 mg/kg Isoproterenolsulfat (I)	8	2,7 \pm 0,6
30 mg/kg I + 10 mM KCl/kg	7	0,4 \pm 0,1
30 mg/kg I + 10 mM $MgCl_2$ /kg	7	0,7 \pm 0,3
30 mg/kg I + 5 mM KCl/kg + 5 mM $MgCl_2$ /kg	7	0,7 \pm 0,1

fachheit halber die übliche Berechnung vom Mittelwert und Streuung vorzuziehen. Tabelle 2 demonstriert die Brauchbarkeit dieses Verfahrens zu Vergleichszwecken. Das Ergebnis zeigt beispielhaft die Schutzwirkung kalziumantagonistischer Substanzen.

Literatur

- [1] Fleckenstein A.: Myokardstoffwechsel und Nekrose. In: L. Heilmeyer, H.-J. Holtmeier (Hrsg.): VI. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Fortschritte auf dem Gebiet der Inneren Medizin über Herzinfarkt und Schock, Freiburg i. Br., Nov. 1968. Thieme, Stuttgart 1968, S. 94–109
- [2] Fleckenstein A., H.-J. Döring, J. Janke, Y. K. Byon: Basic actions on myocardial high-energy phosphate metabolism and contractility. In: J. Schmier, O. Eichler (Hrsg.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie. New Series, Vol. XVI/3. Springer, Berlin – Heidelberg – New York 1975
- [3] Leder O.: Verhältnisschätzung der Häufigkeit Isoproterenol-induzierter Nekrosen im Rattenherzen durch Punktzählung. Verh. Anat. Ges. 70, 761–768 (1976)

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. O. Leder, Anatomisches und Physiologisches Institut der Universität, 7800 Freiburg i. Brsg.