

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen a.N.

Ultramikroskopische Befunde bei Frühstadien der durch das Maul- und Klauenseuche-Virus verursachten Myokarditis

Von

ARTUR LÜBKE

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Mai 1960)

In einer früheren Mitteilung über die Pathogenese der durch das Maul- und Klauenseuche-(MKS-)Virus verursachten Myokarditis berichteten wir über die histologischen Befunde und ihre Beziehungen zur Virusvermehrung und zum Virusschwund (LÜBKE). Unter günstigen experimentellen Voraussetzungen treten die ersten lichtoptisch wahrnehmbaren Fibrillenveränderungen am 2. Tag post inf. auf. Es schließt sich eine zunächst zellige, schließlich fibröse Myokarditis an, die mit einem völligen Virusschwund einhergeht. Die Virusvermehrung eilt in gewissem Umfange der histologisch erkennbaren Fibrillenschädigung voraus. Es erschien deshalb wünschenswert, durch ultramikroskopische Untersuchungen den Beginn und die Beschaffenheit der ersten virusbedingten Veränderungen zu erfassen, also die infizierten Herzen am 1. und 2. Tag nach der Infektion zu untersuchen. Um eine starke Virusvermehrung und damit eine auch für elektronenmikroskopische Untersuchung quantitative ausreichende Myokardschädigung zu erzielen, benutzten wir nicht nur einen als besonders virulent bekannten Virusstamm, sondern auch Mäuse aus einer für das MKS-Virus hochempfindlichen Inzestzuchtlinie.

Material und Methodik¹

Neun weibliche Mäuse einer spontan für das MKS-Virus hochempfindlichen Inzestzuchtlinie im Alter von 39 Tagen und von etwa 21 g K. Gewicht wurden mit dem für erwachsene Mäuse relativ stark virulenten C1-Stamm des MKS-Virus [0,5 ml einer Verdünnung von 10^{-2} (Titer $10^{-5,5}$) pro Maus] i.p. infiziert. Drei Tiere wurden einen Tag, 4 Tiere 2 Tage nach der Infektion durch Dekapitation getötet (2 Impftiere starben am 2. Tage post inf. an der virusbedingten Myokardschädigung). Unmittelbar nach der Tötung wurden die noch schlagenden Herzen entnommen.

Zur elektronenoptischen Untersuchung wurden kleine Stücke der Herzspitzen von etwa 1 mm Kantenlänge sofort für 2 Std in 1%iger isotonischer, gepufferter Osmiumsäure (p_H 7,2) fixiert. Nach Waschung in isotonischer Kochsalzlösung und der üblichen Entwässerung in der Alkoholreihe Einbettung in einem Gemisch von Methyl- und Butyl-Methacrylat im Verhältnis 1:10. Die Blöcke wurden mit einem Porter-Blum-Mikrotom geschnitten. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung diente ein Siemens-Elmiskop 1.

Zur lichtoptischen Untersuchung wurden von jedem Herzen dünne Scheiben in 10%igem Formalin fixiert und Gefrierschnitte mit H. E. und Sudan III gefärbt.

Die übrige Herzmuskulatur wurde eingefroren und in der üblichen Weise an infantilen Mäusen austitriert.

¹ Die Schnitte und Aufnahmen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verdanke ich dem lebenswürdigen Entgegenkommen von Frau Dr. E. RECZKO, Leiterin des elektronenmikroskopischen Labors unserer Anstalt. Ich möchte Frau Dr. RECZKO hierfür meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Elektronenmikroskopisch untersucht wurden 2 Herzen nach eintägiger, 4 Herzen nach zweitägiger Infektionsdauer sowie 2 Herzen nicht infizierter Normalmäuse zur vergleichenden Kontrolle.

Befunde

1. Virusgehalt. Schon am 1. Tage post inf. bestand eine starke Virusvermehrung im Herzmuskel mit Titern von $10^{-3,5}$. Am 2. Tage post inf. war die Titerhöhe bei allen Herzen $10^{-5,5}$.

2. Lichtoptischer Befund. Am 1. Tage post inf. ließen sich keine spezifischen Veränderungen feststellen. Am 2. Tage waren alle Herzen stark diffus verfettet und von zahlreichen Fibrillennekrosen in multipler Verteilung durchsetzt.

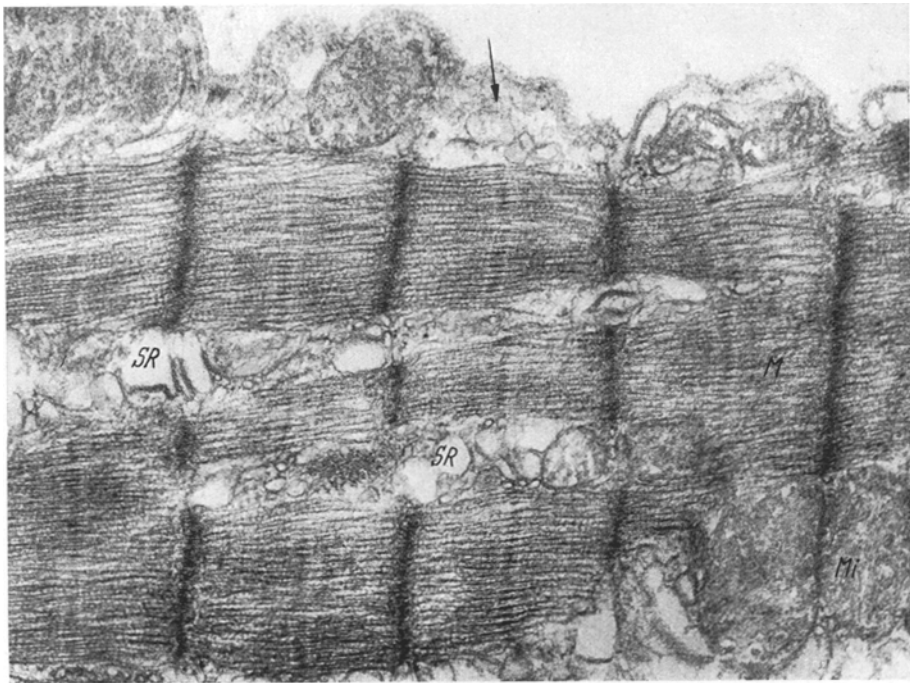


Abb. 1. Herz 1: 1 Tag nach MKS-Infektion. Virustiter im Herzmuskel $10^{-3,5}$. Histologischer Befund o.B. Ultramikroskopischer Befund: Sarkoplasmareticulum SR leicht ödematös aufgetrieben. Sarkolemm leicht ödematös aufgelockert ↓. Mitochondrien Mi und Myofibrillen M o.B. Z-Streifen, M-Linien und Subfibrillen deutlich. Elektronenoptisch: 10 000:1; Endvergrößerung: 30 000:1

3. Ultramikroskopischer Befund. a) 1 Tag nach der Virusinfektion. Herz 1 zeigt einen weitgehend normalen Befund. Die unveränderten Myofibrillen lassen Z-Streifen, M-Linien und Subfibrillen sehr schön erkennen. Die dicht gelagerten Mitochondrien sind normal groß und klar gezeichnet. Nur das Sarkoplasmareticulum erscheint bei einem Teil der untersuchten Fibrillen mäßig ödematös aufgetrieben. Auch im Bereich der Protomembran (Abb. 1) besteht dann eine leichte ödematöse Auflockerung. Endothelzellen o.B. Fetttropfen fehlen in den untersuchten Schnitten.

Herz 2 weist ein verstärktes Ödem auf. Das transversale Reticulum tritt durch eine vorwiegend klein- bis mittelblasige Auftreibung seiner Hohlräume relativ deutlich in Erscheinung. Am stärksten sind die subendothelialen Zell-

partien aufgelockert (Abb. 2). In Abb. 2 sind auch die unmittelbar der Protomembran anliegenden Myofibrillen feinblasig durchsetzt. In fast jeder Aufnahme findet man einzelne oder mehrere (Abb. 2) kompakte Fetttropfen, die zum Teil größer sind als die, die gelegentlich in normalen Herzen vorkommen. Sie schmiegen sich eng den anliegenden Mitochondrien an. Die Myofibrillen sind unverändert,

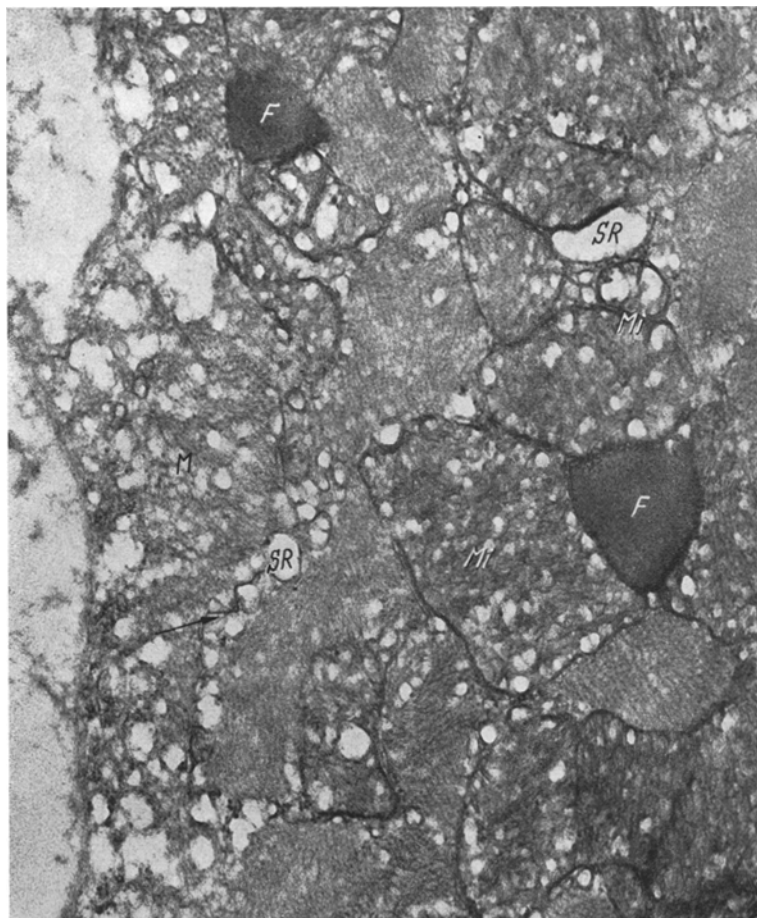


Abb. 2. Herz 2 (vgl. Abb. 2); 1 Tag nach MKS-Infektion. Virustiter $10^{-3,5}$. Ultramikroskopischer Befund: Kleinblasige, manchmal perlschnurähnliche \uparrow Auftreibung des transversalen Reticulums SR. Feinblasige ödematöse Auflockerung der subendothelialen Myofibrillen M. Fetttropfen F gegenüber der Norm vermehrt und vergrößert. Kleinfleckige Aufhellung der meisten Mitochondrien Mi. Elektronenoptisch: 10000:1; Endvergrößerung: 30000:1

auf den meisten Aufnahmen auch die Mitochondrien. Doch zeigen diese gelegentlich eine kleinfleckige Matrixaufhellung (Abb. 2). Die Endothelzellen sind, soweit untersucht, ohne Besonderheit.

b) 2 Tage nach der Virusinfektion. Die ultramikroskopischen Befunde der nach zweitägiger Infektionsdauer untersuchten Herzen gleichen einander weitgehend. Die meisten Fibrillen, welche den histologisch verfetteten Fasern entsprechen, zeigen folgenden Befund: Die Herzmuskelzellen sind gleichmäßig von zahlreichen Fetttropfen durchsetzt, die in bläschenförmigen Hohlräumen liegen,

ohne diese aber völlig auszufüllen (Abb. 3, 4). Diese blasigen Hohlräume, welche stets engen Kontakt mit Mitochondrien zeigen, enthalten also neben den Lipoiden Ödemflüssigkeit. Wir halten sie für ödematös erweiterte Zisternen des transversalen Reticulums. Die übrigen fettfreien Bläschen des Sarkoplasmareticulums sind eng, ebenso das longitudinale Reticulum. Das transversale Reticulum scheint also ungleich erweitert zu sein. Die meisten Mitochondrien erscheinen unverändert;

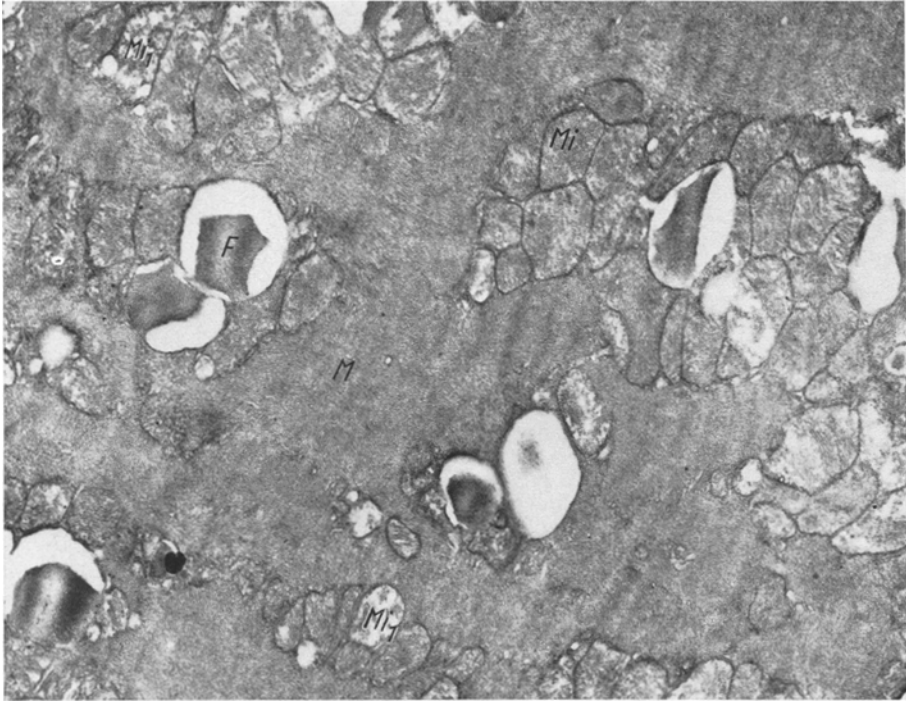


Abb. 3. Herz 3: 2 Tage nach MKS-Infektion. Virustiter im Herzmuskel $10^{-6,5}$. Histologischer Befund: starke diffuse Fibrillenverfettung. Multiple frische Einzelfasernekrosen. Ultramikroskopischer Befund: Starke diffuse Verfettung. Die gleichmäßig verteilten Fetttropfen *F* liegen einzeln, paarweise oder zu dritt jeweils in blasigen Hohlräumen. Die Bläschen haben eine dünne Membran und liegen dicht neben oder inmitten von Mitochondrienpaketen. Die Mitochondrien *Mi* sind z. T. fleckig aufgeheilt *Mi*₁. Die nicht veränderten Myofibrillen *M* lassen eine, wahrscheinlich infolge Schnittstauung enge Z-Streifung erkennen. Elektronenoptisch: 5000:1; Endvergrößerung: 15000:1

manche sind jedoch kleinfleckig oder größer aufgeheilt. Auch das Cytoplasma einzelner Capillarendothelien ist stellenweise blasig-ödematös aufgelockert, gelegentlich enthält es auch größere Fetttropfen. Myofibrillen o.B. Abb. 5 zeigt zwei benachbarte *Herzmuskelzellen mit stärkeren Veränderungen*. Das Sarkoplasmareticulum ist stellenweise so stark ödematös erweitert, daß seine überdehnten Zisternen konfluieren. Hier sind die Mitochondrien zwar auseinandergedrängt, trotzdem noch gut strukturiert, an anderer Stelle dagegen unter Lamellenzerfall partiell oder total aufgeheilt. Die Mitochondrien der linken Zelle zeigen Auflösungs- oder Verklumpungserscheinungen der inneren und äußeren Lamellen und zahlreiche osmiophile, feingranulierte Häufchen (Mitochondriengranula?). Wir vermuten, daß es sich bei diesen Granula um verklumpte und zerbröckelte Cristae handelt. Auch der in der rechten Zelle dargestellte Herzmuskelkern enthält mehrere feinkörnige osmiophile Granula (Chromatinver-

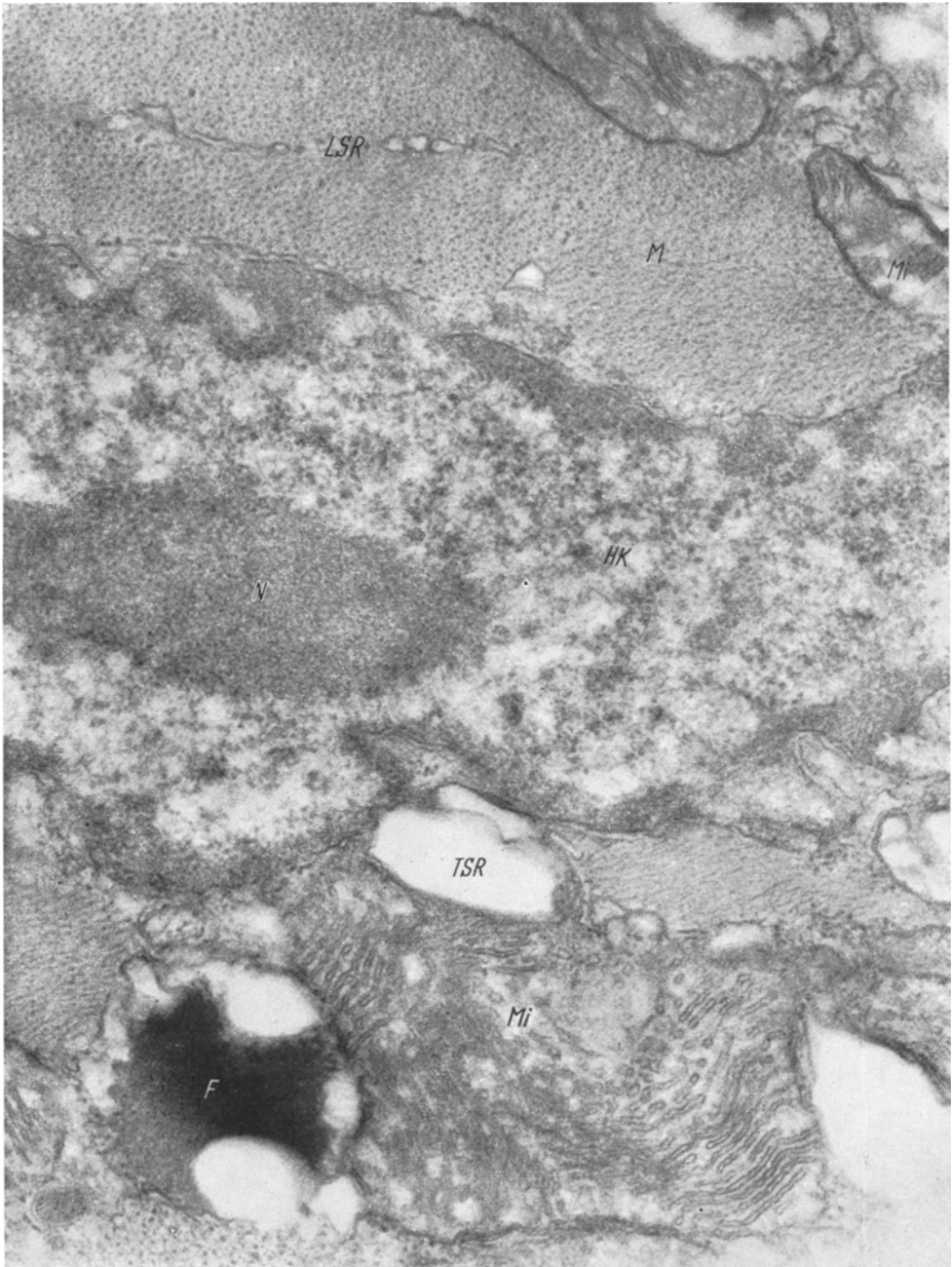


Abb. 4. Herz 4: 2 Tage nach MKS-Infektion. Virustiter $10^{-5,5}$. Ultramikroskopischer Befund: Transversales Sarkoplasmareticulum *TSR* erweitert. Einzelne Bläschen unvollständig mit Fetttropfen *F* angefüllt. Longitudiales Sarkoplasmareticulum *LSR* o.B. Herzmuskelkern *HK* mit großem Nucleolus *N* unverändert. Mitochondrien *Mi* kleinfleckig aufgehellt. Myofibrillen *M* o.B. Elektronenoptisch: 20000:1; Endvergrößerung: 60000:1

klumpungen?). Die in Abb. 5 angeschnittenen Myofibrillen sind verschieden stark aufgehellt oder schon nekrotisch.

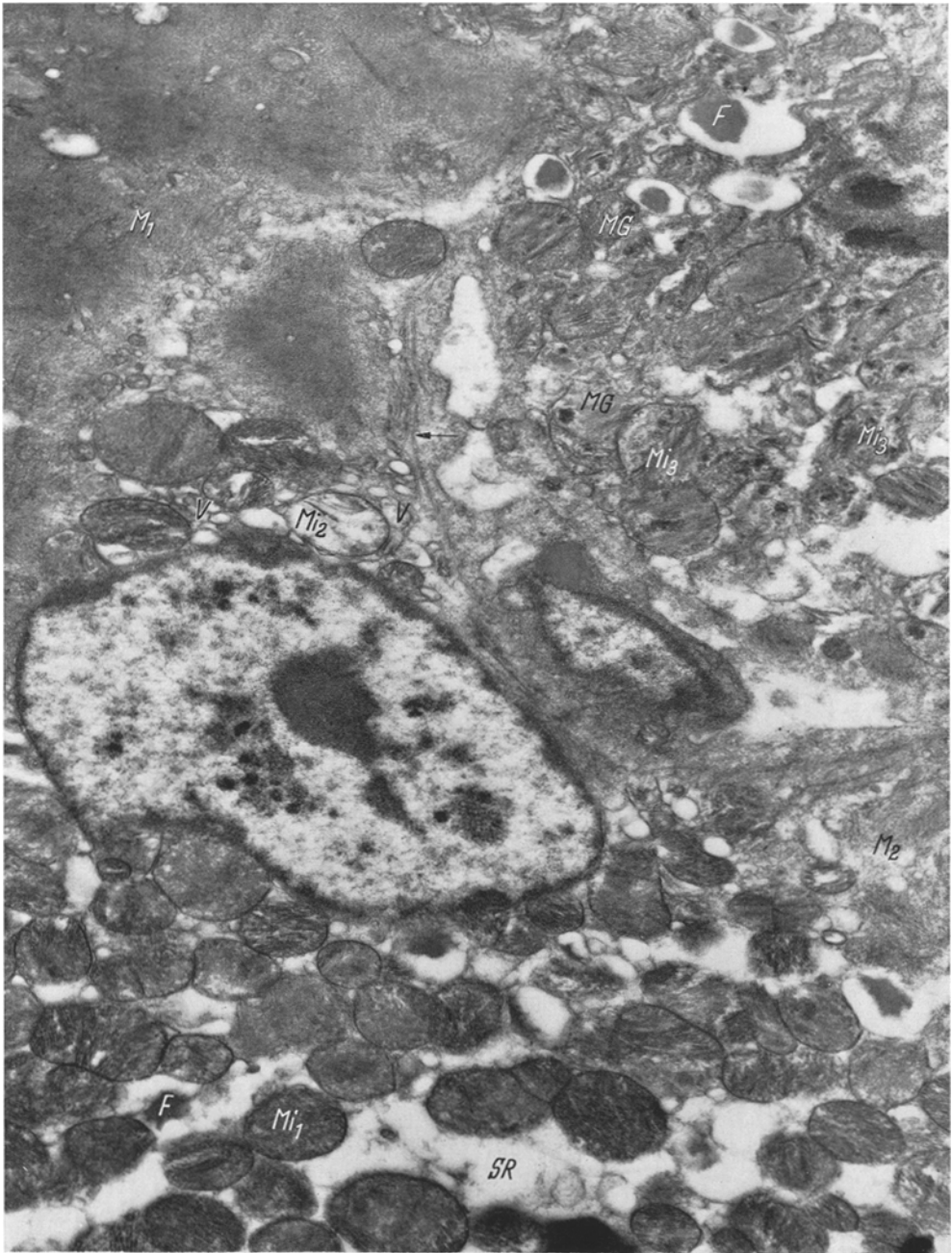


Abb. 5. Herz 3 (vgl. Abb. 3). Ultramikroskopischer Befund: 2 benachbarte Herzmuskelzellen. Zellgrenzen ↓ nur stellenweise erkennbar. In beiden Zellen stark ödematös erweitertes Sarkoplasmaticulum *SR*. Fetttropfen *F*. Mitochondrien *M_{i1}* durch das Ödem auseinandergedrängt. Mitochondrien *M_{i2}* in Kernnähe zum Teil aufgeheilt. Deutliche Vesiculation des perinucleären Raumes *V*. Mitochondrien der rechten Zelle *M_{i3}* zeigen Auflösung oder Verklumpung der Cristae, z. T. auch der Außenmembranen und enthalten häufig elektronendichte feingekörnte granulierte Verdichtungen *MG*. Myofibrillen leicht *M₁* oder stärker *M₂* aufgeheilt. Elektronenoptisch: 5000:1; Endvergrößerung: 15000:1

Beispiele für *frische Fasernekrosen*, die in den histologischen Schnitten multipel gehäuft vorkommen, sind in Abb. 6 dargestellt. Das ganze Sarkoplasma ist stark ödematös aufgelockert. Alle Mitochondrien sind aufgebläht oder bis zur Unkenntlichkeit zerfallen und aufgelöst. Die Myofibrillen sind zwar gerade noch erkennbar, aber aufgehellt und aufgetrieben, ihre Subfibrillen spinngewebsähnlich aufgelockert, nur noch schattenhaft erkennbar oder nicht mehr erhalten. Gelegentlich trifft man in den Nekrosen Reste der kompakteren Fetttropfen.

Besprechung

Die Myokardveränderungen *einen Tag nach der Infektion mit dem MKS-Virus* sind selbst nach ultrahistologischem Maßstab geringgradig. Dies ist insofern erstaunlich, weil bereits eine relativ starke Virusvermehrung eingetreten ist. Der Prozeß beginnt mit einem leichten Ödem, welches vornehmlich auf die präformierten Hohlräume des transversalen Sarkoplasmareticulums beschränkt ist. Gleichzeitig ist eine etwas vermehrte Anflutung von Fett bzw. seine verminderte Oxydation nachweisbar. Die in einigen Aufnahmen hervortretende kleinfleckige Matrixaufhellung dürfte auf eine beginnende Schädigung der betreffenden Mitochondrien hinweisen. Jedoch sind die meisten Mitochondrien intakt. Die Myofibrillen sind unverändert.

Am 2. Tag nach der Infektion sind die Befunde wesentlich markanter, was nicht überrascht, da neben hohen Virustitern schon lichtoptisch schwere Herzveränderungen nachweisbar sind. Wie in den histologischen Präparaten zeigen die ultramikroskopischen Aufnahmen neben Fibrillen, deren Strukturen verändert, aber nicht irreversibel geschädigt erscheinen, völlig destruierte, also nekrotische Fasern.

Die ersteren sind vor allem durch eine multiple Verfettung charakterisiert, die wir als *Fettanschoppung* bezeichnen möchten. Die Fetttropfen liegen in bläschenförmigen Hohlräumen, ohne sie aber auszufüllen. Anscheinend ist es zu einer Entmischung der Lipide innerhalb des wäßrigen Bläscheninhaltes gekommen. Die Bläschen selbst halten wir für erweiterte Zisternen des transversalen Sarkoplasmareticulums; man hat den Eindruck, daß sich die einströmende Ödemflüssigkeit ungleichmäßig in seinen Spalten verteilt. Immer stehen die fetthaltigen Bläschen in engstem Kontakt zu Mitochondrien, wie das auch bei Herzverfettung infolge anderer Ursachen (vgl. POCHE) der Fall ist. Manche Mitochondrien sind aufgequollen, aber nicht zerfallen, viele bleiben morphologisch intakt. Es kann uns deshalb die Vorstellung einer primären Mitochondrienschädigung als Ursache der ungenügenden Fettverbrennung nicht befriedigen. Für die Deutung der Fettanschoppung erscheint uns die Beobachtung wichtiger, daß die Lipide von einer „isolierenden“ Ödemschicht umgeben sind. Wir stellen uns vor, daß durch diese Kontaktbehinderung zwischen Mitochondrien und Lipiden die Oxydation der Fette beeinträchtigt wird. Bei nur eintägiger Infektionsdauer liegen dagegen die Fetttropfen den Mitochondrien eng an, da der Ödemmantel fehlt. Ebenso scheint es bei anderen, sonst ähnlichen Fibrillenverfettungen, etwa beim Siebenschläferherz (Abb. 11 in der Arbeit von POCHE) der Fall zu sein.

Die Ödembildung am 2. Infektionstag betrifft außer dem Sarkoplasmareticulum das Cytoplasma von Capillarendothelien und einen Teil der Mitochondrien.

Die Funktion der partiell oder total aufgequollenen Mitochondrien dürfte gehemmt sein. Allerdings sollen nach MILLER Veränderungen, bei denen die äußere Mitochondrienmembran intakt und Reste von Innenmembranen vorhanden sind, reversibel sein. Die Myofibrillen in diesen Herzmuskelzellen sind durchweg unverändert, wahrscheinlich, weil eine genügend große Zahl von Mitochondrien für den Energiestoffwechsel erhalten bleibt. Die Feststellung anderer

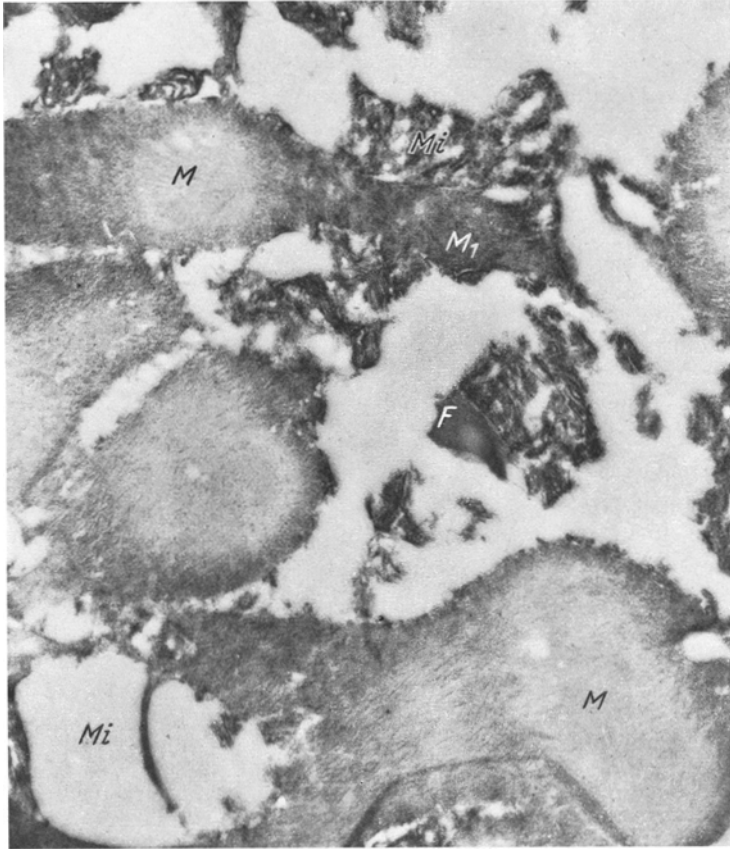


Abb. 6. Herz 3 (vgl. Abb. 3). Ultramikroskopischer Befund: Nekrose. Gewebe durch Ödem aufgeockert und vielleicht zusätzlich artefiziell auseinandergedrängt. Myofibrillen *M* nekrotisch aufgeheilt. Einzelne Myofibrillen *M*₁ lassen noch Aufbau aus Subfibrillen erkennen. Mitochondrien *Mi* zerfallen und aufgelöst. Bei *F* Rest eines Fetttropfens. Elektronenoptisch: 5000:1; Endvergrößerung: 15000:1

Autoren (z. B. BING), daß die Myofibrillen bzw. das Actomyosin von allen Strukturen der Herzzellen am unempfindlichsten sind, stimmt mit unseren Befunden überein. Allgemein vermitteln die ultrahistologischen Bilder den Eindruck, daß die Herzmuskelzellen in diesem Stadium nur reversibel geschädigt sind.

Die *Fibrillennekrosen* sind ultramikroskopisch durch eine totale oder subtotale Zerstörung aller Fibrillenbestandteile gekennzeichnet. Allem Anschein nach kommt es in diesen Fasern zu einem ungehemmten Einstrom von Ödemflüssigkeit, dadurch zur völligen Zerstörung des Hohlraumsystems des Sarkoplasmareticulums und zur hochgradigen, zerstörenden Aufquellung sämtlicher Mitochondrien. Manche Mitochondrien sind an ihren Lamellenstümpfen gerade noch, andere

nicht mehr sicher zu erkennen. An ihrem Funktionsausfall dürfte kein Zweifel sein. Jetzt sind auch die Myofibrillen durch Aufquellung und Zerfall der Subfibrillen in den Zerstörungsprozeß einbezogen. Anscheinend lösen sich die Myofibrillen im nekrotischen Bezirk erst als Folge des durch den Mitochondrienuntergang verursachten Enzymausfalls auf. *Die Nekrosen treten also ultramikroskopisch nicht wie im lichtoptischen Bild als Verdichtung (Koagulation), sondern als eine durch massives Ödem entstandene Aufweichung (Kolliquation) in Erscheinung.*

Wir vermuten, daß es Übergangsstadien zwischen den reversibel und irreversibel geschädigten Fibrillen gibt. Aus technischen Gründen mußten wir es uns versagen, ihnen eingehend nachzuspüren. Wahrscheinlich deutet die Abb. 5 ein solches Zwischenstadium an. Da nach lichtoptischen Befunden die Fibrillennekrosen in kürzester Zeit entstehen, sind vermutlich Übergangsbilder nicht allzu häufig, zumal damit zu rechnen ist, daß der Prozeß oft im Stadium der Fibrillenverfettung gestoppt wird.

Wir schließen aus unseren ultramikroskopischen Befunden, daß die durch das MKS-Virus verursachte Myokardschädigung primär durch einen vermehrten Einstrom von Blutflüssigkeit in das Sarkoplasma der Herzmuskelzellen hervorgerufen wird. Das Ödem breitet sich zunächst verstärkt im Hohlraumsystem des transversalen Reticulums aus, bringt einen Teil der Mitochondrien zur Aufquellung und behindert durch Kontakterschwerung die Oxydation der eingeschleusten Lipide. Bei starker Überflutung kommt es durch Zerstörung der Mitochondrien zum Funktionsausfall ihres Multienzymapparates, infolgedessen mangels Energieausbildung und -bereitstellung zur Aufquellung und zum Zerfall der Myofibrillen, d. h. zur völligen Nekrose der Herzmuskelzelle. Die Ödembildung in der Herzmuskelzelle wird vermutlich durch eine Erhöhung des osmotischen Druckes infolge Ansammlung intracellulärer Zwischenprodukte bei der Virusproduktion induziert. Eine primäre virusbedingte Schädigung der Mitochondrien läßt sich aus den ultrahistologischen Bildern nicht ableiten.

Das MKS-Virus scheint im Organismus primär einen einheitlichen pathogenetischen Vorgang, der zur Bildung eines intracellulären Ödems führt, auszulösen. Er führt im Schleimhautepithel zur Aphthenbildung, in der Herzmuskulatur zur Entstehung von Fasernekrosen.

Zusammenfassung

Zur Ergänzung lichtoptischer Befunde bei experimenteller Maul- und Klauenseuche-Myokarditis wurden Mäuseherzen im Frühstadium, also am 1. und 2. Tage nach der Virusinfektion ultramikroskopisch untersucht. Am 1. Tage waren trotz deutlicher Virusvermehrung histologisch keine, ultramikroskopisch relativ unbedeutende Befunde (beginnendes Faserödem, leichte Verfettung) feststellbar. Am 2. Tage post inf. mit hohem Virusgehalt der Herzmuskulatur waren die ultramikroskopischen Befunde entsprechend den schon lichtoptisch starken Veränderungen deutlich ausgeprägt. Die histologisch verfetteten Fasern zeigen elektronenoptisch außer einer starken Fettanschoppung ein ausgeprägtes Ödem. Da ein Teil der Mitochondrien und dementsprechend die Myofibrillen intakt bleiben, dürfte es sich um eine reversible Schädigung handeln.

Die histologisch als Koagulationsnekrosen imponierenden Fasern stellen ultra-mikroskopisch Kolliquationsnekrosen dar, die als Folge eines massiven Ödems durch Auflösung sämtlicher Mitochondrien und Myofibrillen gekennzeichnet sind. Es wird aus den Befunden geschlossen, daß die intracelluläre Ödembildung das primäre pathogenetische Prinzip bei der Infektion mit dem MKS-Virus darzustellen scheint, nicht nur bei der Bildung von Virusbläschen im Epithel der Haut und Schleimhaut, sondern auch bei der Entstehung der Fasernekrosen in der Herzmuskulatur.

Summary

As a supplement to studies with the light microscope of experimental foot and mouth disease the hearts of mice were examined electron-microscopically during the early phases; that is, on the 1st and 2nd days after the virus infection. On the 1st day, despite an obvious increase in the virus, relative insignificant changes were made out electron-microscopically (beginning edema of the muscle fibers, mild fatty change). On the 2nd day with a heavy viral infection of the myocardium the submicroscopic studies showed severe changes corresponding with those seen with the light microscope.

Besides the histologically evident fatty change of the muscle fibers, there was electronmicroscopically an engorgement with fat and a severe edema. Since a portion of the mitochondria and accordingly the myofibrils remained intact, the changes probably represent a reversible damage.

The fibers seeming to have undergone coagulative necrosis histologically gave electronmicroscopically the appearance of liquefactive necrosis. This was the result of a massive edema and was characterized by dissolution of all mitochondria and myofibrils. From the results it has been concluded that the intracellular edema appears to represent the primary pathogenetic principal in the infection with the foot and mouth disease virus. This held true not only for the formation of vesicles in the epithelium of the skin and mucosa, but also for the development of the necrosis in the myocardial fibers.

Literatur

- BING, R. J.: Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiete des Herzmuskelstoffwechsels. In: Struktur und Stoffwechsel des Herzmuskels. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- LÜBKE, A.: Die Pathogenese der durch das Maul- und Klauenseuche-Virus verursachten Myokarditis (experimentelle Untersuchungen an der erwachsenen Maus). Virchows Arch. path. Anat. **332**, 170—180 (1959).
- MEESSEN, H.: Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. In: Struktur und Stoffwechsel des Herzmuskels. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- MILLER, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. Verh. Dtsch. Ges. für Path., 42. Tagg 1959, S. 261—331. Stuttgart: Gustav Fischer.
- POCHE, R.: Submikroskopische Beiträge zur Pathologie der Herzmuskelzelle bei Phosphorvergiftung, Hypertrophie, Atrophie und Kaliummangel. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 165—248 (1958).
- POCHE, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Herzmuskels vom Siebenschläfer während des aktiven und des lethargischen Zustandes. Z. Zellforsch. **50**, 332—360 (1959).

Priv.-Dozent Dr. ARTUR LÜBKE
 Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
 Tübingen a. N., Waldhäuser Höhe