

## Histochemische, fluoreszenzmikroskopische und experimentelle Untersuchungen am Reizleitungssystem von Goldhamster, Maus und Ratte

R. GOSSRAU

Anatomisches Institut der Universität Würzburg  
(Lehrstuhl: Prof. Dr. T. H. Schiebler)

Eingegangen am 25. Januar 1971

### Histochemical Fluorescence Microscopical and Experimental Investigations on the Impulse Conducting System of Golden Hamsters, Mice and Rats

*Summary.* In the impulse conducting system (ICS) of golden hamsters, mice and rats the activities of glycolytic as well as of oxidative enzymes are lower than in the myocardium. However, in the ICS the glycolytic pathway is relatively more active in comparison with the oxidative metabolism. On the contrary, glucose-6-phosphate dehydrogenase and the lysosomal enzymes activities are higher in the ICS than in the ordinary cardiac muscle. The lactate dehydrogenase isoenzyme pattern is nearly the same in both heart muscle tissues. In agreement with the lowered glycolytic and oxidative metabolism a reduced capillarisation is found in the ICS. The activities of enzymes involved in glycogen metabolism are related to the amount of glycogen in the impulse conducting tissue and working muscle. Within the ICS clear species-dependent and regional metabolic differences have not been observed.

A dense cholinergic innervation occurs in all parts of the ICS of golden hamsters and mice. An overall rich adrenergic innervation is typical only for the ICS of golden hamsters. In the mouse heart, however, the adrenergic nerve fibers prefer the sinatrial node.

In the AV system of rats glycogen decreases following hypoxia, catecholamine application and hunger. In the same ICS-region of golden hamsters a marked loss of glycogen can only be produced by hypoxia and treatment with catecholamines.

*Zusammenfassung.* Im Reizleitungssystem (RLS) von Goldhamster, Maus und Ratte sind nicht nur die oxidativen sondern auch die glykolytischen Enzymaktivitäten geringer als in der Arbeitsmuskulatur. Innerhalb der Reizleitungsmuskulatur überwiegt die Glykolyse. Demgegenüber besitzen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und lysosomale Enzyme im RLS höhere Aktivitäten als im Myokard. Die Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme verhalten sich in beiden Muskelgeweben weitgehend gleich. Entsprechend dem reduzierten glykolytischen und oxidativen Stoffwechsel ist die Kapillardichte im RLS gering. Die Aktivitäten der Enzyme des Glykogenstoffwechsels laufen in RLS und Myokard in etwa dem Glykogengehalt parallel. Klare artspezifische und regionale Stoffwechselunterschiede fehlen innerhalb der Reizleitungsmuskulatur.

Durch hohe cholinerge Nervenfaserdichte zeichnen sich alle Teile des RLS von Goldhamster und Maus aus. Eine dichte adrenerge Innervation ist nur beim Goldhamster im gesamten RLS anzutreffen. Im Mäuserherzen bevorzugen die adrenergen Fasern den Sinusknoten.

Im AV-System von Ratten nimmt das Glykogen nach Hypoxie, Katecholamingaben und Hunger ab. Beim Goldhamster tritt überzeugender Glykogenverlust im AV-System nur nach Sauerstoffmangel und Katecholaminapplikation ein.

### Einleitung

Alle bisherigen histochemischen Untersuchungen am Reizleitungssystem (RLS) des Säugerherzen stellen übereinstimmend fest, daß der oxidative Stoffwechsel im

Reizleitungsgewebe mit geringerer Aktivität als in der Arbeitsmuskulatur abläuft (Schiebler, 1962; Schiebler und Doerr, 1963, Lit., Alcini et al., 1965; Berchev und Rhadanov, 1965; Morales und Fine, 1965; Otsuka et al., 1967; Toth und Schiebler, 1967; Isaacson und Boucek, 1968). Weniger klar ist dagegen die Glykolyserate der spezifischen Herzmuskulatur. Diese wird entweder der des Myokards gleichgestellt oder als höher angegeben (u. a. Schiebler und Doerr, 1963, Lit., v. Mohrenschild, 1964; Alcini et al., 1965; Otsuka et al., 1967).

Im Gegensatz zu den relativ zahlreichen Mitteilungen zum glykolytischen und oxidativen Stoffwechsel liegen über den Fett- und Glykogenmetabolismus sowie den Hexosemonophosphat-Shunt nur lückenhafte und teilweise widersprüchliche Angaben vor (Carbonell, 1955; Schiebler, 1962; v. Mohrenschild, 1964; Alcini et al., 1965). Ähnlich verhält es sich mit der Frage nach den lysosomalen Enzymaktivitäten in der spezifischen Muskulatur des Säugerherzens (vgl. Carbonell, 1956; Schiebler und Doerr, 1963, Lit.; Hegab und Ferrans, 1966; Otsuka et al., 1967).

Deshalb haben wir erneut mit histochemischer Technik die *Stoffwechseleigentümlichkeiten einschließlich der Vaskularisation des Reizleitungsgewebes* von Goldhamster, Maus und Ratte im Vergleich zur Triebmuskulatur untersucht. Hierzu werden z. T. nachweislich verbesserte und neue Verfahren benutzt, wie z. B. die Darstellung zahlreicher Enzyme an gefriergetrockneten Kryostatschnitten (vgl. auch Winckler, 1970 b). Im Mittelpunkt wird dabei das Studium der Glykolyse stehen, von deren repräsentativen Enzymen wir außer Lactat-Dehydrogenase die direkt und ausschließlich im Durchlauf des Embden-Meyerhof-Weges arbeitenden Fermente Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase nachgewiesen haben.

Darüberhinaus beschäftigen wir uns mit der cholinergen und adrenergen *Innervation* des RLS von Goldhamster und Maus, da diese bislang nur bei der Maus mit unterschiedlichen Ergebnissen bearbeitet wurde (vgl. Nomura, 1952; Ehinger et al., 1968; Thaemert, 1970). — Mit zunächst mehr orientierenden *experimentellen Untersuchungen* hoffen wir, weiteren Einblick in das Verhalten von Stoffwechsel und Glykogen im RLS zu bekommen (vgl. Schiebler, 1955).

### Material und Methoden

Untersucht wurden 50 Goldhamster (*Mesocricetus auratus*, Durchschnittsgewicht 70 g), 60 Hausmäuse (*Mus musculus*, Durchschnittsgewicht 25 g), 10 Feldmäuse (*Microtus arvalis*, Durchschnittsgewicht 25 g), 4 Zwergmäuse (*Micromys minutus*, Durchschnittsgewicht 7 g) und 15 Ratten (*Rattus norvegicus*, Durchschnittsgewicht 250 g) beiderlei Geschlechts. Sämtliche Tiere waren 3—4 Monate alt. Die Feldmäuse, Goldhamster und Zwergmäuse stammten aus zoologischen Handlungen, die Hausmäuse (NMRI-Albinomäuse) und Ratten (Wistar-Albinoratten) aus eigener Zucht. Haltung in Macrolon-Käfigen mit Holzspäneinstreu bei Stalltemperatur von  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  und 12stündigem künstlichem Licht-Dunkel-Wechsel. Atromin-Standarddiät und Trinkwasser ad libitum.

Innerhalb von 2,5 min (in der Regel zwischen 8 und 9 Uhr vormittags) Entnahme der Herzen in leichter Äthernarkose und Einfrieren des stets noch schlagenden Organs in Kohlen-säureschnee ( $-60$  bis  $70^\circ \text{C}$ ), flüssigem  $\text{N}_2$  oder in mit  $\text{N}_2$  auf ca.  $-160^\circ \text{C}$  gekühltem Propan (vgl. Winckler, 1970 a). Einfrieren z. T. auch ganzer Goldhamster und Mäuse in  $\text{N}_2$ -Propan mit Präparation der Herzen im Kryostaten bei  $-28^\circ \text{C}$  und anschließender Montage auf mit nassem Filterpapier bedeckten Objektellern durch nochmaliges Einbringen in flüssigem  $\text{N}_2$ . Sofort danach Kryostatschneiden der zuvor auf ca.  $3 \text{ mm}^2$  zugeschnittenen Blöcken (Aus-

nahme: fluoreszenzmikroskopischer Katecholaminnachweis, wofür ganze oder halbierte Herzen verwendet wurden) bei  $-30$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$  (für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen niemals unter  $-23^{\circ}\text{C}$ ; vgl. Heene, 1968).

Für Nachweise an nativem Gewebe kurzes Antauen der Schnitte an vorgekühlte Objektträger und Deckgläsern. Für Gefriertrocknung Sammeln der Schnitte in vorgekühlten Plexiglasblöcken mit 6—9 Bohrungen oder in Aluminiumhaltern nach Lowry (1953) zur getrennten Aufnahme von Schnitten verschiedener RLS-Regionen und Spezies. Außerdem teilweise Anfertigung von Stufen- und Totalserien. Bis zur Weiterverarbeitung (spätestens 120 min post mortem) Aufbewahrung der Schnitte in einer Tiefkühltruhe bei ca.  $-50^{\circ}\text{C}$ . Schnittdicke je nach den Erfordernissen 6, 8, 10, 12, 16 und 20  $\mu$ .

*Färbungen.* Methylenblau (Henningsen, 1969) und H. E. (Romeis, 1948) an Kryostat-schnitten zur Lokalisation der spezifischen Muskulatur.

*Histochemische Nachweise* (soweit nicht besonders angegeben nach Barka und Anderson, 1963). *Enzymnachweise an nativen Kryostatschnitten:* *Aldolase* (ALD, 4.1.2.13, 5—45 min) nach Abe und Shimizu (1964), Simon et al. (1966), Arnold et al. (1967, 1968) sowie in eigener Modifikation nach Simon et al. (1966) mit 1,5 mM NAD und 8 U/ml Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. *Adenosintriphosphatase* (ATPase, 15—30 min) nach Wachstein und Meisel. *Acetylcholinesterase* (AChE, 3.1.1.7, 45 min) und *Butyrylcholinesterase* (BChE, 45 min) mit und ohne Methylenblau- und H. E.-Gegenfärbung nach Karnovsky und Roots (1964) nach Acetonfixierung (10 min,  $+4^{\circ}\text{C}$ ); Spezifitätskontrollen durch 0,1 und 0,01 mM Physostigmin (Eserin), 1, 0,1 und 0,01 mM Tetraisopropylpyrophosphoramid (iso-OMPA) sowie 1, 0,1 und 0,01 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP). *Cytochromoxidase* (CO, 1.9.3.1, 45 min) mit Hemmung durch 1 mM KCN. *Unspezifische Esterasen* (uE, 3.1.1.1, 15 min) nach Burstone mit Differenzierung durch 1 und 0,01 mM E 600. *Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase* (GP-DH, 1.1.1.8, 45 min). *3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase* (3-HBDH, 1.1.1.30, 30 min) mit NAD und NADP. *Isocitrat-Dehydrogenase* (ICDH, NAD-abhängig, 1.1.1.41, 30 min; NADP-abhängig, 1.1.1.42, 45 min) mit Isocitronensäurelacton und Na-D,L-Isocitrat. *Malat-Dehydrogenase* (MDH, NAD-abhängig, 1.1.1.37, 30 min; NADP-abhängig, 1.1.1.40, 60 min). *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase* (G6P-DH, 1.1.1.49, 45 min) nach Altmann und Chayen (1965). *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (GAP-DH, 1.2.1.12, 5 bis 30 min) nach Himmelhoch und Karnovsky (1961) mit modif. D, L-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal-Hydrolyse, nach Fiske-Subbarow abgewandelter Phosphat-Messung zur Bestimmung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Konzentration (Spektralphotometer Zeiss M 4 Q, 660nm, Schichtdicke 1 cm), Entfernung des Alkohols im Hydrolysat durch Vakuumdestillation und Spezifitätskontrollen durch Jodessigsäure und Jodacetamid (je 1 mM). *Lactat-Dehydrogenase* (LDH, 1.1.1.27, 1—30 min) mit und ohne Phenazinmethosulfat (PMS, 0,33 mM) sowie Polyvinylalkohol (PVA, 150 mg/ml); außerdem Gelinkubation nach Fahimi und Amarasingham (1964) sowie nach Jacobsen (1969) mit verschiedenen Li- und Na-L-Lactat- (5—1000 mM), NAD- (0,01—10 mM) und NBT-Konzentrationen (0,05—5 mM); Isoenzymdifferenzierung durch Harnstoff (1—4 M) und Na-Pyruvat (0,1—10 mM). *NADH<sub>2</sub>- und NADPH<sub>2</sub>-Dehydrogenase* (Diaphorasen, NADH<sub>2</sub>- und NADPH<sub>2</sub>-DH, 15—30 min). *Succinat-Dehydrogenase* (SDH, 1.3.99.1, 5—30 min) mit verschiedenen Na-D, L-Succinat-Konzentrationen (0,1—500 mM), unterschiedlichen Fixierungszeiten in Aceton ( $+4^{\circ}\text{C}$ , 5—60 min) und Spezifitätskontrolle durch 1 mM Na-Malonat. *Saure Phosphatase* (sP, 3.1.3.2, 60 min) nach Burstone modif. nach Barka und Anderson (1963). *Alkalische Phosphatase* (aP, 3.1.3.1, 60 min) nach Gomori modif. nach Pearse. *Phosphorylase* (2.4.1.1, 180 min). *Glycogensynthetase* (UDPGGT, 2.4.1.11, 180 min) nach Sasse (1966) mit und ohne 10%ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Transglucosidase* (2.4.1.18, 180 min) mit Glykogen-Nachweis in allen Fällen durch PAS-Reaktion (s.u.).

*Enzymnachweise an gefriergetrockneten Kryostatschnitten.* Gefriertrocknung nach Lowry (1953) über Nacht (ca. 14 Std) in Lyophilisierungsbehältern (evacuation and storage tubes) im Hochvakuum ( $10^{-3}$  Torr) bei  $-25$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten. Aufbewahrung der evakuierten tubes bei  $-30^{\circ}\text{C}$  bis zu 4 Wochen. Außerdem Schnittrocknung in offenen Plexiglasbehältern (s.o.) im Speedivac-Pearse Tissue-Dryer Model 1 (Trocknungszeit 60 min,  $10^{-3}$  Torr,  $-45^{\circ}\text{C}$ ) sowie in einer Gefriertrockenanlage Leybold-Heraeus GT 001 (80 min, unter  $10^{-2}$  Torr,  $-45^{\circ}\text{C}$ ) mit unmittelbarer Weiterverarbeitung der Schnitte. Montage der Schnitte mit zimmerwarmem Aceton auf albuminisierten und kurz luftgetrockneten Objektträgern (vgl. Winckler, 1970b) zum Nachweis von AChE, uE, 3-HBDH, GAP-DH, ICDH, LDH, NADH<sub>2</sub>-DH,

*NADPH<sub>2</sub>-DH*, *aP*, *sP* und *SDH*. Weiterhin Aufziehen von Schnitten mit Celloidin (Winckler, 1970b) zur Reaktion auf uE und sP. Alkoholreihe, Entellan. — *Flottierend* auf Objektträgern oder in Plexiglasblöcken (s. o.) wurden dargestellt: *AChE*, *ALD*, *ATPase*, *GAP-DH*, *Glutamat-Dehydrogenase*, *LDH*, *Leucinaminopeptidase*, *Phosphorylase*, *Transglucosidase* und *UDPGGT*. Danach Spülen in Aqua dest. oder Ringer und Eindecken in Glycerin-Gelatine. Z. T. auch Präparation einzelner Sinus- (SK) und AV-Knoten (AVK) sowie von AV-Bündeln (AVB, Durchmesser ca. 250  $\mu$ ) und etwa gleich große Stücke Arbeitsmuskulatur (vgl. Lowry, 1964) zur getrennten Inkubation beider Herzmuskelgewebe. Parallel wurden zur Kontrolle bei allen Nachweisen native Kryostatschnitte mitgeführt.

Bevorzugter Elektronenakzeptor war Nitro BT und in einigen Fällen Tetra-Nitro BT. Die angegebenen Molaritäten sind Endkonzentrationen. Inkubation bei 37° C in feuchter Kammer (Ausnahmen: uE und G6P-DH bei Zimmertemperatur). Inkubationsvolumen pro Schnitt 0,5—1 ml. Regelmäßig mitinkubierte Referenzorgane waren Gewebe vom gleichen Tier mit bekannt hoher Enzymaktivität, z. B. Leber, Niere, Gehirn und Skelettmuskulatur. Spezifitätskontrollen durch Inkubation ohne Substrat oder Coenzym und ohne andere für normalen Reaktionsablauf notwendige Substanzen sowie durch vorhergehendes Erhitzen der Schnitte für 10 min im Wasserbad bei 100° C.

*Glykogen*. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS; 10 min Perjodsäure, 1% ig; kurzes Spülen in Aqua dest.; 45 min Schiffches Reagens; kräftiges Spülen in Leitungswasser; Alkoholreihe, Entellan) an nativen Kryostatschnitten nach Äthanolfixierung (100% ig; 10 min, +4° C) und Lufttrocknen sowie an gefriergetrockneten Kryostatschnitten nach Dampffixierung (Aufziehen mit Äthanol, 100% ig; 60 min Paraformaldehyd bei Zimmertemperatur; Pearse 1968; Winckler, 1970b). Kontrollen mit Diastase sowie  $\alpha$ - (pH 7,0) und  $\beta$ -Amylase.

*Katecholamine*. Fluoreszenzmikroskopisch nach Heene (1968). Gefriertrockenanlagen: Speedivac-Pearse (Trockenzeit 60 min, -45° C, 10<sup>-3</sup> Torr) und Leybold-Heraeus (70 min, -45° C, unter 10<sup>-2</sup> Torr). Spezifitätskontrollen durch unbedampfte Kryostatschnitte. Zeiss-Fluoreszenzmikroskop mit Belichtungsautomatik. Erregerfilter II; Sperrfilter 50.

*Experimente*. *Hypoxie* durch Aufenthalt in luftdicht abgeschlossenem Glasgefäß (Höhe und Durchmesser je 120 mm) bis zu 60 min (Ratten) und bis zu 130 min (Goldhamster, Mäuse) oder bis zum Exitus durch Asphyxie. Außerdem Einbringen von Goldhamstern und Mäusen in kleinervolumige Lyophilisierungsbehälter mit gerade noch tolerierter Expositionszeit von 15 min. — *Adrenalin*, s. c., 0,5 mg/kg (Goldhamster) und 4 mg/kg (Ratten); *Noradrenalin*, s. c., 1 mg/kg (Goldhamster) und 8 mg/kg (Ratten) *Isoproterenol*, s. c., 50 mg/kg (Goldhamster) und 200 mg/kg (Ratten). Tötung nach 15, 30 und 45 min. — *Hunger* über 17 Tage (Ratten) und 21 Tage (Goldhamster) bei Trinkwasser ad libitum. Folgende Nachweise schlossen sich regelmäßig an: *AChE*, *CO*, *GAP-DH*, *3-HBDH*, *LDH*, *Katecholamine*, *NADH<sub>2</sub>-DH*, *Phosphorylase*, *SDH*, *Transglucosidase*, *UDPGGT* und *Glykogen*. Zur Kontrolle wurden stets unbehandelte Tiere etwa gleichen Gewichtes sowie gleichen Alters und Geschlechtes mitgeführt.

## Befunde

Wegen der übereinstimmenden Resultate für die an nativen und gefriergetrockneten Kryostatschnitten nachgewiesenen Enzymaktivitäten bleibt größtenteils unerwähnt, mit welchen Verfahren die jeweiligen Ergebnisse erzielt wurden. Dabei haben wir stets Sinusknoten und oberes Atrioventriculärsystem (AVS) untersucht, die aber nur im Falle regionaler Unterschiede extra aufgeführt werden. Über die Endausbreitungen des AVS können wir infolge der starken Aufästelung sowie der häufig artefiziell stärkeren Reaktion kammerlumennaher Herzmuskelabschnitte keine sicheren Aussagen machen.

### 1. Glykolyse

Mitunter kann der Eindruck fast gleich hoher glykolytischer Enzymaktivitäten in RLS und Arbeitsmuskulatur entstehen. Klarer treten die Differenzen im glykolytischen Enzymbestand zwischen Reizleitungsgewebe und Myokard bei

getrennter Inkubation einzelner gefriergetrockneter SK, AVK, AVB und gleich großer Stücke Arbeitsmuskulatur hervor. Dann zeigt sich nach 30 min Inkubation deutliche Blaufärbung durch Enzym- und Reaktionsprodukt diffusion nur in Inkubationsmedien mit Myokard. Dies bestätigt die Untersuchung nativer Kryostatschnitte nach verschiedenen langen Inkubationszeiten. 5, 10 und 15 min nach Inkubationsbeginn bleibt die Aktivität der glykolytischen Enzyme im RLS zunächst hinter der in der Arbeitsmuskulatur zurück. Mit beginnender Blaufärbung des Inkubationsmediums durch Enzym- und Formazanverlust des Myokards nach ca. 20 min verringern sich die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Muskelgeweben zusehends.

*ALD* (Abb. 1) reagiert im RLS von Goldhamster, Maus und Ratte wenig schwächer als in der Vorhofsmuskulatur, jedoch weit geringer als im Kammermyokard. Zusatz von PVA (Arnold et al., 1968) oder Erhöhung der NAD-Molarität und der GAP-DH-Einheiten gegenüber den von Simon et al. (1966) angegebenen Konzentrationen verkürzen die Reaktionszeit bei gleichzeitig stärkerer Enzymaktivität. Höhere NAD-Konzentration (1,5 mM) allein und kombiniert mit größerer NBT-Molarität (5 mM) liefern der Originalmethode vergleichbare Ergebnisse. Vorbehandlung des Hilfsenzymes GAP-DH mit Aceton bis zu 10 min bei Zimmertemperatur wird praktisch ohne Aktivitätsminderung toleriert. Unbefriedigende Ergebnisse liefert die Methode nach Abe und Shimizu (1964).

*GAP-DH* (Abb. 2) ist zwar in Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur aller drei Nager aktiver als *ALD*, zeigt aber die gleichen Intensitätsdifferenzen. 1 mM Jodessigsäure hemmt das Enzym völlig, 1 mM Jodacetat nur partiell. Optimal für beide Herzmuskelarten ist eine Substratkonzentration von 40 mM. Auch Er-

Abb. 1. Nachweis von Aldolase nach Simon et al. (1966). bei der Maus am gefriergetrockneten Kryostatschnitt mit eigener Modifikation. Die Bifurkation (*B*) reagiert schwächer als das Kammerseptum (*Ks*). Inkubationszeit 45 min. Objektiv 2,5fach

Abb. 2. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion beim Goldhamster am gefriergetrockneten Kryostatschnitt 15 min nach Inkubationsbeginn mit geringerer Aktivität in der Bifurkation (*B*) als im Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 2,5fach

Abb. 3. Lactat-Dehydrogenase-Nachweis bei der Feldmaus am nativen Kryostatschnitt nach Fahimi und Amarasingham (1964). Die Vorhofsmuskulatur (*Vm*) ist aktiver als der Sinusknoten (*Sk*). *Sa* Sinusknotenarterie. Inkubationszeit 5 min. Objektiv 10fach

Abb. 4. Darstellung der H-Fraktion der Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme beim Goldhamster mit 3 M Harnstoff am gefriergetrockneten Kryostatschnitt. Die Bifurkation (*B*) reagiert kräftiger als das Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 10fach

Abb. 5. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion beim Goldhamster am nativen Kryostatschnitt mit geringerer Aktivität in der Bifurkation (*B*) als im Kammerseptum (*Ks*) nach 45 min Inkubation. Objektiv 4fach

Abb. 6. Succinat-Dehydrogenase-Nachweis im Mäuseherzen am nativen Kryostatschnitt 30 min nach Acetonfixierung. Der Atrioventricularknoten (*Avk*) reagiert schwächer als das Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 10fach

Abb. 7. Darstellung der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase am gefriergetrockneten Kryostatschnitt beim Goldhamster mit geringerer Aktivität in der Bifurkation (*B*) als im Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 4fach

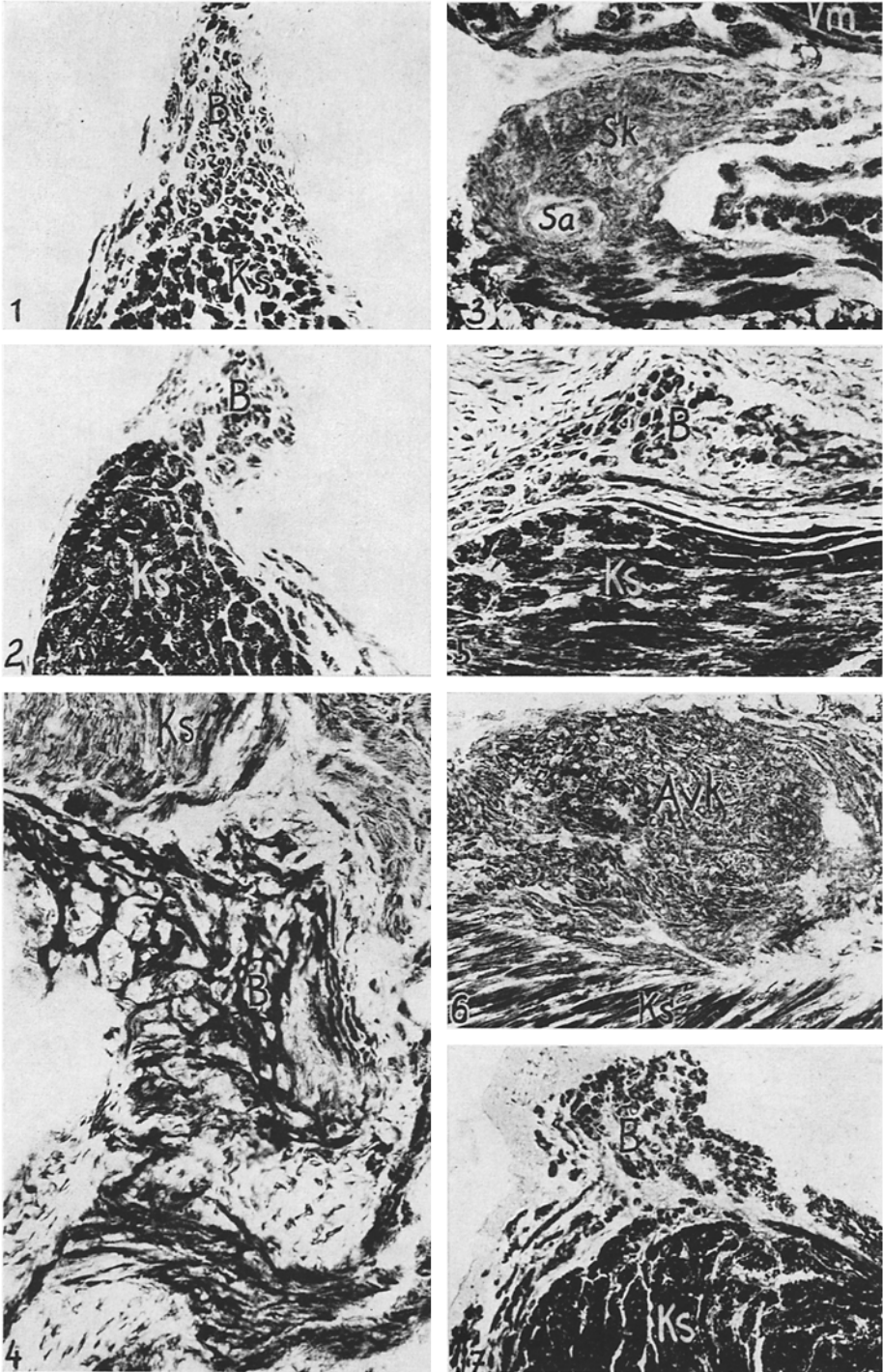


Abb. 1—7

niedrigung bis 15 mM führt noch zu befriedigenden Resultaten bei etwas protrahierter Inkubationszeit (30 min gegenüber 15 bis 20 min bei 40 mM. Substratkonzentrationen über 50 mM und unter 10 mM schwächen die Reaktion ab. Die Acetonfixierung kürzten wir ohne Aktivitäts- und Lokalisationsänderungen auf 10 min ab und verzichteten auf das Spülen in physiologischer NaCl vor und nach der Inkubation. Wegen der besseren Lokalisation verglichen mit unbehandelten Schnitten wurde die Postfixation in Baker's Formol beibehalten.

Die *LDH*-Aktivität (Abb. 3) entspricht etwa der von *GAP-DH* in RLS und Myokard. Auf Steigerung der Substratkonzentration von 50 mM (Konzentration von L-Lactat als eigentliches Substrat) auf 100 mM reagiert das Enzym nach 30 min mit unveränderter Formazanproduktion. 500 mM Na- oder Li-Lactat erhöhen die Geschwindigkeit der *LDH*-Reaktion und führen schon nach 15 min zum Reaktionsmaximum. Mit Gelinkubation (Gelatine, PVA) sowie 0,33 mM PMS, 1,5 mM NAD (normal 0,75 mM) und 5 mM NBT (normal 1,2 mM) läßt sich die Reaktionszeit weiter verkürzen, z.B. bei Verwendung von Gelatine nach Fahimi und Amarasingham (1964) auf ca. 3 min, wobei die Gelinkubation die Diffusion von Enzym- und Reaktionsprodukt lediglich abschwächt, aber nicht aufhebt. Immer erhalten bleiben wie bei allen Modifikationen des *ALD*- und *GAP-DH*-Nachweises die Aktivitätsdifferenzen zwischen RLS und Arbeitsmuskulatur. Abnahme der Intensität der *LDH*-Reaktion tritt zwar in beiden Herzmuskulaturen mit 20 mM und noch deutlicher mit 5 mM Substratkonzentration auf, macht sich aber gelegentlich im Myokard etwas stärker als im AVS bemerkbar. Erniedrigung der NAD-Konzentration unter 0,015 mM sowie der NBT-Molarität unter 0,05 mM führt ebenfalls zu Aktivitätsminderung der *LDH*.

Zum Nachweis der *LDH*-Isozyme bewährt sich in beiden Muskelgeweben für die H-Fraktion 3 M Harnstoff und für die M-Fraktion 0,1 mM Pyruvat. Die Isoenzyme selbst verhalten sich in RLS und Myokard weitgehend gleich: der Nachweis der H-Fraktion fällt kräftig aus und kann in der Bifurkation beim Goldhamster sogar aktiver als im Kammerseptum sein (Abb. 4); die M-Fraktion fehlt. In Leber und *M. gastrocnemius* der Ratte (Überwiegen der M-Fraktion; von Wijhe et al. 1964; Buta et al., 1966) hemmt 3 M Harnstoff deutlich. Die Wände der Herzmuskelgefäße reagieren nach Harnstoff-Zusatz weiter positiv und werden durch 0,1 mM Pyruvat inhibiert. 10 mM Pyruvat erbringt auch in Leber und Skelettmuskel negative Resultate.

Schwächer als die direkt im glykolytischen Durchlauf arbeitenden Enzyme und *LDH* reagiert *GP-DH* (Abb. 5) und zwar im Reizleitungs-gewebe mit geringerer Aktivität als in der Arbeitsmuskulatur.

*Zusammenfassend* zeigt sich, daß im RLS die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme geringer als im Myokard sind.

## 2. Citronensäurezyklus und Atmungskette

NADP-abhängige *ICDH* mit Isocitrat als Substrat produziert im RLS von Goldhamster und Maus weniger Formazan als im Myokard, das in den Kammern aktiver als im Vorhofsbereich ist. Mit NAD und Isocitronensäurelacton oder Isocitrat arbeitet das Enzym in Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur schwach. — NAD-abhängige *MDH* und *SDH* (Abb. 6) mit 20 mM Succinat gleichen bei Goldhamster und Ratte im Reaktionsergebnis der NADP-gebundenen *ICDH*. Im

AVS der Maus kann die Aktivität dieser Enzyme wie die von CO fast die der Atrien erreichen. Mit NADP als Coenzym ist die MDH-Intensität in beiden Herzmuskelsystemen gering. 200 mM Succinat und 0,33 mM PMS können die SDH-Reaktion bis auf 5 min (üblich 30 min) abkürzen bei unveränderter Aktivitätsdifferenz zwischen RLS und Myokard. 10,5 und 1 mM Succinat führen bei etwas längerer Inkubation in beiden Muskelgeweben zum gleichen Reaktionsergebnis wie 20 mM Substratkonzentration. 0,5 mM Succinat verringert die SDH-Aktivität, wovon bei der Maus die Arbeitsmuskulatur etwas stärker als das AVS betroffen sein kann. *Aceton-Fixierung* bei +4° C erniedrigt die Formazanproduktion geringgradig, führt jedoch wie bei den meisten anderen Dehydrogenasen zu besserer Lokalisation (3-HBDH, GP-DH, GAP-DH, LDH, ICDH, MDH, NADH<sub>2</sub>- und NADPH<sub>2</sub>-DH). Ausdehnung der Fixierungszeit von 5 auf 60 min beeinflusst die SDH-Reaktion kaum. — CO und ATPase gleichen im Reaktionsergebnis den Krebszyklus-Enzymen. — Aktiver als die bisher genannten Enzyme sind die *Diaphorasen* — NADH<sub>2</sub>-DH mehr als NADPH<sub>2</sub>-DH — in Reizleitungsgewebe und Myokard, das im Kammergebiet stärker als in den Vorhöfen reagiert.

### 3. Fettsäureoxidation

NAD-gebundene 3-HBDH (Abb. 7) als indirektes Leitenzym für die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren besitzt im RLS geringere Aktivität als im Arbeitsmuskel, dessen regionale Intensitätsunterschiede denen der glykolytischen und übrigen oxidativen Enzyme entsprechen. Allerdings fällt der 3-HBDH-Nachweis bei der Maus in Reizleitungsgewebe und Vorhofsmyokard schwächer als beim Goldhamster aus. Mit NADP reagiert 3-HBDH in beiden Herzmuskelarten praktisch negativ.

*Insgesamt* ist auch die Aktivität der Enzyme des Citronensäurecyclus, der Atmungskette und der Fettsäureoxidation in der spezifischen Muskulatur geringer als in der Arbeitsmuskulatur.

### 4. Hexosemonophosphat-Shunt

G6P-DH ist zwar in Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur schwach aktiv, färbt aber das Reizleitungsgewebe etwas mehr an.

### 5. Glykogen, Glykogenolyse und Glykoneogenese

Das RLS von Goldhamster und Ratte (Abb. 12) ist *glykogenreicher* als die Arbeitsmuskulatur, wobei das Reizleitungsgewebe der Ratte über die höchste Glykogenmenge verfügt. Innerhalb des spezifischen Gewebes besitzt das AVS mehr Glykogen als der SK. Im Myokardbereich sind die Vorhöfe am glykogenreichsten. Glykogenärmer als im Goldhamster- und Rattenherzen sind Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur der Maus. Methodenabhängige Differenzen im Glykogenbestand fehlen. Nach Diastase- und  $\alpha$ -Amylase-Kontrolle fällt der Glykogen-Nachweis negativ aus, während  $\beta$ -Amylase das Glykogen nicht angreift. Das Glykogen selbst ist bei Goldhamster und Ratte in RLS und Myokard ungleichmäßig verteilt. Vor allem im AVS des Goldhamsters wechseln glykogenreiche Zellen mit mehr oder weniger glykogenarmen oder sogar negativen ab. Weniger ausgeprägt ist dies auch in der Triebmuskulatur beider Spezies der Fall.



Glykogenverteilungsmuster und Verhalten der glykogenolytischen und glykoneogenetischen Enzymaktivitäten gehen in etwa parallel: glykogenreiche Fasern besitzen in beiden Herzmuskelsystemen die höchste Phosphorylase- (Abb. 8a), Transglucosidase- und UDPGGT-Intensität (Abb. 8b). Alle nachgewiesenen Enzyme des Glykogenstoffwechsels sind bei Goldhamster und Ratte im RLS am aktivsten, gefolgt von der Vorhofsmuskulatur. Schwächer reagiert das Kammermyokard. Geringer ist der Enzymbestand im Herzen der Maus, wo die Aktivität des Reizleitungsgewebes die der Arbeitsmuskulatur nur wenig übertrifft. Behandlung der Schnitte nach der Inkubation mit 10%iger  $H_2SO_4$  zur spezifischen Darstellung der UDPGGT löst in beiden Herzmuskulaturen praeeistentes und neusynthetisiertes Glykogen heraus. Dagegen tritt in der Leber beim gleichen Verfahren das typische Reaktionsmuster mit vorwiegend perizentraler Aktivität auf (vgl. Sasse, 1966).

### 6. Lysosomale Enzyme

*Cytoplasmatische Esterase* (E 600 sensitiv) kommt im RLS von Goldhamster und Maus in höherer Aktivität vor als im Arbeitsmuskel. *Lysosomale Esterase* (E 600 resistent) und *sP* gleichen sich im Reaktionsergebnis und sind im Reizleitungsgewebe etwas aktiver als im Myokard.

### 7. Vaskularisation

Die Kapillardichte ist in allen Anteilen des RLS geringer als in der Arbeitsmuskulatur, die in den Vorhöfen kapillarärmer als im Kammergebiet ist. Während im Reizleitungsgewebe ganze Zellaggregate kapillarfrei sind, hat im Ventrikelmyokard jede Muskelfaser innigen Kapillarkontakt. Relativ gut ist der AVK der Maus vaskularisiert.

Abb. 8. a Nachweis der Phosphorylase beim Goldhamster am gefriergetrockneten Kryostat-schnitt mit starker Reaktion in der Bifurkation (*B*). Schwächer reagieren Vorhofsmuskulatur (*Vm*) und Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 10fach. b Kräftigerer Ausfall der Glykogen-synthetase-Reaktion am gefriergetrockneten Kryostat-schnitt im Atrioventricularbündel (*Avb*) als im Kammerseptum (*Ks*) des Goldhamsterherzens. Objektiv 2,5fach

Abb. 9. Acetylcholinesterase-Nachweis am nativen Kryostat-schnitt nach Acetonfixierung beim Goldhamster. Der Sinusknoten (*Sk*) verfügt über ein dichtes cholinerges Nervenfasernetz. *G* Ganglion. Objektiv 4fach

Abb. 10. Hochaktiver und dichter cholinerges Faserplexus im Atrioventricular-knoten (*Avk*) der Maus. Die Vorhofsmuskulatur (*Vm*) besitzt mehr cholinerge Nervenfasern als das Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 4fach

Abb. 11. Katecholamin-Nachweis beim Goldhamster. Der Atrioventricular-knoten (*Avk*) wird von zahllosen adrenergen Fasern versorgt. Objektiv 10fach

Abb. 12. Glykogen-Darstellung im unbehandelten Rattenherzen. Das Atrioventricularbündel (*Avb*) ist glykogenreicher als das Kammerseptum (*Ks*). Objektiv 4fach

Abb. 13. Deutliche Glykogenabnahme im Atrioventricularbündel (*Avb*) der Ratte 45 min nach Isoproterenol-Applikation beim Nachweis am gefriergetrockneten Kryostat-schnitt nach Dampffixierung. *Ks* Kammerseptum. Objektiv 10fach

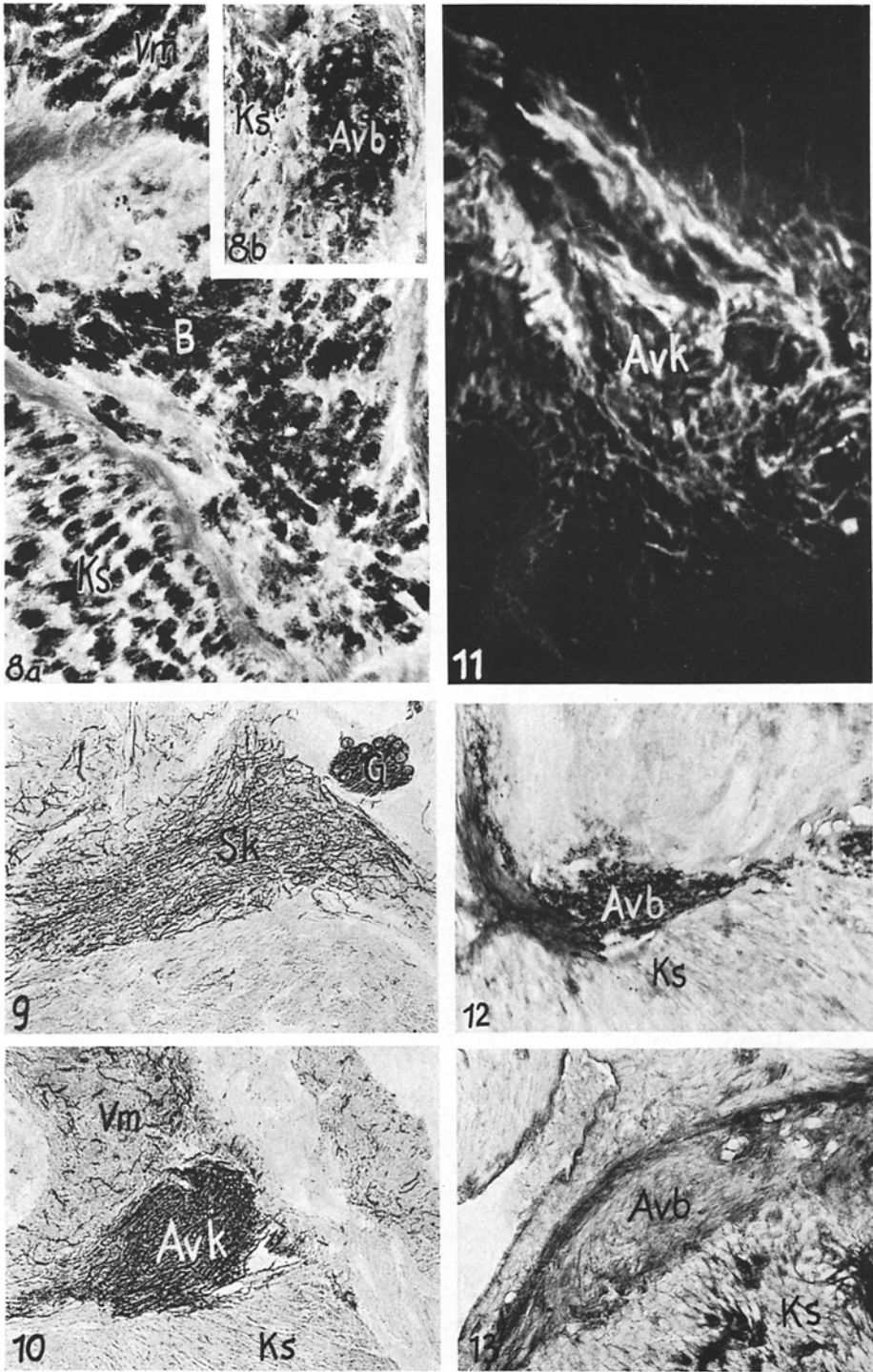


Abb. 8—13

### 8. Innervation

Mit ACh und BCh als Substraten resultieren im RLS etwa gleiche Reaktionsmuster.  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M iso-OMPA vermindern hier geringgradig die AChE- und BChE-Aktivität bei praktisch gleichbleibender Nervenfasernzahl.  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M Eserin sowie  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M DFP hemmen die Reaktion in allen Nervenfasern. Mit iso-OMPA noch darstellbare Enzymaktivität wird als spezifische Cholinesterase gewertet.

Im RLS von Goldhamster und Maus besitzt der AVK (Abb. 10) in der Regel die höchste *cholinerge Nervenfaserdichte*, gefolgt von AVB, SK und AV-Schenkeln; doch färben sich beim AChE-Nachweis im SK aller untersuchten Mäusespezies stets weniger Fasern als beim Goldhamster (Abb. 9) an. In sämtlichen Anteilen des Reizleitungsgewebes können cholinerge Fasern in die Arbeitsmuskulatur übergehen, deren Faserbestand immer weit geringer als im RLS ist. Dabei fällt innerhalb des Myokards auf, daß die Kammern beim Goldhamster über wesentlich mehr cholinerge Fasern als bei der Maus verfügen. Besonders innig ist im Goldhamsterherzen der nervöse Kontakt zwischen AVK und Ventrikelseptum. — Dichte und Verteilungsmuster der *adrenergen Fasern* gleichen nur im Reizleitungsgewebe des Goldhamsters den cholinergen Innervationsverhältnissen, wobei vor allem das AVS (Abb. 11) durch Faser- und Varikositätenreichtum auffällt. Dies gestattet sicherer als mit enzymhistochemischer Technik die Darstellung weiter peripher gelegener RLS-Anteile, ohne allerdings die Endausbreitungen quantitativ zu erfassen. Arm an aminergen Nervenfasern ist mit Ausnahme des SK die Reizleitungsmuskulatur im Herzen von Haus- und Feldmaus, die kaum mehr spezifische Fluoreszenz bietet als das Myokard.

### 9. Experimente

*Längere Hypoxie* führt bei Goldhamster, Maus und Ratte in AVS und Arbeitsmuskulatur zu Glykogenabnahme. Gegenüber Kontrolltieren kommen im AVS weniger glykogenreiche aber mehr glykogenarme und glykogenfreie Fasern vor. Im Myokard — in den Ventrikeln ausgeprägter als in den Vorhöfen — vergrößern sich die glykogenfreien Felder. Parallel dem Glykogenbestand nimmt nach Sauerstoffmangel die Phosphorylaseaktivität ab. Geringer als beim Phosphorylase-Nachweis ist der Aktivitätsverlust von Transglukosidase und UDPGGT. Hypoxie mit Exitus durch Asphyxie verstärkt die Befunde nach Sauerstoffmangel. Unverändert reagieren nach Hypoxie AChE, CO, 3-HBDH, GAP-DH, LDH, NADH<sub>2</sub>-DH und SDH. *Kurzfristiger Sauerstoffmangel* bei Goldhamster und Maus reduziert nur im Arbeitsmuskel Glykogenbestand und Phosphorylaseaktivität geringgradig. Im AVS ist keine sichere Glykogenabnahme zu beobachten. — Bei Ratten fallen nach 17tägigem *Hunger* Glykogen- und Phosphorylasenachweis im Kammermyokard negativ und in Vorhofsmuskulatur sowie AVS schwächer als bei Normaltieren aus. Weniger eindrucksvoll ist dies auch beim Goldhamster der Fall. Alle übrigen Enzyme reagieren unverändert mit Ausnahme diskreter Aktivitätsverluste von Transglukosidase und UDPGGT. — Bereits 15 min nach Applikation von *Adrenalin*, *Noradrenalin* und *Isoproterenol* können in Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur von Goldhamster und Ratte Glykogenmenge und Phosphorylaseaktivität vermindert sein. Zuverlässig treten Verluste von Glykogen und Phosphorylase in beiden Herzmuskelarten aber erst nach 30 min auf. Nach 45 min

gelingen Glykogen- und Phosphorylase-Darstellung in der Ventrikelmuskulatur häufig nicht mehr und sind im Vorhofsmyokard sowie im AVS deutlich abgeschwächt (Abb. 13). Die stärkste Wirkung aller Katecholamine auf das Reizleitungssystem besitzt Isoproterenol gefolgt von Adrenalin. Etwas geringer sind die Veränderungen nach Noradrenalingabe. Beim Katecholaminnachweis ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität ohne Zunahme der Faserzahl nach Applikation von Adrenalin und Noradrenalin zu verzeichnen. Die übrigen Enzyme verhalten sich wie bei Normaltieren. Sicher nachweisbare Nekrosen fehlen im AVS von Goldhamster und Ratten. Festzustellen ist allerdings, daß trotz gleicher Versuchsbedingungen die Glykogenabnahme bei allen Experimenten individuellen Schwankungen unterliegt.

### Diskussion

Unsere Untersuchung zeigt, daß im RLS von Goldhamster, Maus und Ratte nicht nur die oxidativen sondern auch die glykolytischen Enzymaktivitäten geringer sind als in der Arbeitsmuskulatur bei relativ stärkerer Glykolyse im RLS. Dies widerspricht der bisherigen Vorstellung, wonach im Reizleitungsgewebe der Säugetiere die glykolytische Stoffwechselaktivität die im Myokard erreicht oder sogar übertrifft (Schiebler, 1962; Schiebler und Doerr, 1963, Lit.; v. Mohrenschild, 1964; Alcini et al., 1965; Berchev und Rhadanov, 1965; Morales und Fine, 1965; Otsuka et al., 1967; Toth und Schiebler, 1967; Isaacson und Boucek, 1968). Möglicherweise sind methodische Gründe und eventuell auch speziesgebundene Variationen für die differierenden Angaben über die glykolytische Durchlaufgröße im Reizleitungsgewebe verantwortlich. So zeigt sich die geringe Glykolyseaktivität im RLS von Goldhamster, Maus und Ratte deutlicher erst bei abgekürzten Inkubationszeiten. Bei längerer Inkubation gleichen sich durch bevorzugte Diffusion von ALD, GAP-DH und LDH (vgl. auch Fahimi und Amarasingham, 1964; Lojda, 1965; Kunze, 1967; Arnold et al., 1968; Jacobsen, 1969) aus dem Myokard die glykolytischen Stoffwechselaktivitäten in beiden Herzmuskulaturen weitgehend an. Unklar bleibt, warum aus dem Myokard mehr Enzym und Reaktionsprodukt diffundiert als aus dem Reizleitungsgewebe. Die Aktivität der diaphoraseabhängigen glykolytischen Dehydrogenasen dürfte in etwa den wirklichen Verhältnissen entsprechen, da auch PMS als zusätzlicher Elektronenakzeptor zur Ausschaltung der limitierenden  $\text{NADH}_2$ - und  $\text{NADPH}_2$ -DH (u.a. Farber et al., 1956; v. Wijhe et al., 1963; Brandau und Pette, 1966; Reiss, 1967) die Aktivitätsunterschiede zwischen Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur aufrecht erhält.

Besser stimmen unsere Resultate mit enzymhistochemischen Befunden am RLS der Vögel (Gossrau, 1968a, b; vgl. aber Michel und Junge, 1970) und am AVS von Hund, Kalb und Schwein (Snijder und Meijer, 1970) sowie mit biochemischen Messungen an AV-Schenkeln von Rind und Kalb überein (Kübler et al., 1969). Nach diesen Untersuchungen ist auch der glykolytische Durchlauf im Reizleitungsgewebe geringer als im Myokard. Allerdings überwiegt im AVS großer Säuger die Glykolyserate im Vergleich zum oxidativen Stoffwechsel stärker als im Vogelherzen. Geringer sind die Differenzen zwischen glykolytischen und oxidativen Enzymaktivitäten innerhalb des RLS und gegenüber der Arbeitsmuskulatur bei den von uns untersuchten Goldhamstern und Mäusen. Vielleicht ähnelt die Reizleitungsmuskulatur nicht nur histologisch (Schiebler, 1955; Goss-

rau und Dryden, 1971, in Vorbereitung) sondern auch enzymhistochemisch vor allem dem Vorhofsmyokard umso mehr, je kleiner die Tiere sind. Die relativ schwache GP-DH-Aktivität im RLS aller drei Nager deutet darauf hin, daß das Reizleitungsgewebe (Kübler et al., 1969) ähnlich wie die Arbeitsmuskulatur (Lee und Lardy, 1965; Opie, 1969, Lit.) vermutlich bei der NAD-Regeneration andere Wege geht als die Skelettmuskulatur (Boxer und Devlin, 1961; Blanchaer, 1964). — Entsprechend dem herabgesetzten Energiebedarf bzw. Substrat- und Sauerstoffverbrauch genügt der Reizleitungsmuskulatur eine geringere Kapillardichte als dem Myokard (u. a. Schiebler, 1955; Gallo, 1956; Schiebler und Doerr, 1963, Lit., Pape et al., 1969).

Auf Grund des weitgehend identischen LDH-Isozymmusters in beiden Herzmuskelsystemen mit hochaktiver H-Form bei fehlender M-Fraktion (vgl. Kübler et al., 1969) wäre das RLS weniger unter die Gewebe mit dominierender Glykolyse einzureihen, als vielmehr wie das Myokard und die roten Fasern der Skelettmuskulatur (Kunze, 1967; Opie, 1968, Lit.; vgl. aber Snijder und Meijer, 1970) eher zu solchen mit überwiegend oxidativer Stoffwechsellage zu zählen (Pfleiderer und Wachsmuth, 1961; Cahn et al., 1962; Wilson et al., 1963; Kaplan und Goodfriend, 1964). Auch wegen der geringen Aktivitätsunterschiede zwischen glykolytischen und oxidativen Enzymaktivitäten sowie der gleichen Reaktion auf Änderungen der Substrat- und Coenzymkonzentration beim LDH- und SDH-Nachweis möchten wir stoffwechselftypmäßig das Reizleitungsgewebe von Goldhamster und Maus in die Nähe der Arbeitsmuskulatur rücken.

Zusammengenommen haben wir hinsichtlich der glykolytischen und oxidativen Stoffwechseleigentümlichkeiten des RLS den Eindruck, daß unabhängig von möglichen tierartlichen Unterschieden zwischen schnitthistochemischen und biochemischen Ergebnissen auch weiterhin gewisse Diskrepanzen bestehen. Hierfür können methodische Gründe verantwortlich sein. Beispielsweise sind die von Kübler et al. (1969) im Kammermyokard gemessenen glykolytischen Enzymaktivitäten etwa doppelt so hoch wie in den AV-Schenkeln, während unsere Unterschiede in der Glykolyserate zwischen Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur wesentlich diskreter sind. Dabei haftet histochemischen Verfahren der Nachteil an, nur beschränkt quantifizieren zu können. Aber auch gegenüber biochemischen Messungen an Homogenaten (Kübler et al., 1969) ist eine gewisse Zurückhaltung geboten; denn man ist zwecks ausreichender und relativ schneller Gewebsgewinnung auf kräftig entwickeltes und sicher lokalisierbares Reizleitungsgewebe angewiesen, das in geeigneter Form eigentlich nur in den AV-Schenkeln großer Huftiere anzutreffen ist, muß aber dafür mancherlei Verunreinigungen durch das hier besonders reichliche Bindegewebe (Schiebler und Doerr, 1963, Lit.) in Kauf nehmen. Deshalb scheinen uns beide Verfahren nicht ganz auszureichen, um endgültige Aussagen über Glykolyse und oxidativen Stoffwechsel im Reizleitungsgewebe des Säugerherzens zu machen. Fortschritte erwarten wir uns von der Untersuchung des stellenweise außerordentlich bindegewebsarmen RLS von Goldhamster und Maus (Gossrau und Dryden, 1971, in Vorbereitung) mit mikrochemischen Methoden.

Der verglichen mit dem Myokard vermehrte Glykogengehalt im RLS der Säuger ist bekannt (u. a. Schiebler, 1953, 1955; Schiebler und Doerr, 1963, Lit.; Snijder und Meijer, 1970) und trifft auch für die spezifische Muskulatur von

Goldhamster und Ratte zu (Alcini et al., 1965), ist aber bei der Maus kaum nennenswert gegenüber der Arbeitsmuskulatur erhöht. Letzteres beobachten Snijder und Meijer (1970) auch im AVK des Hundes. Selbst wenn wegen ungenügender Methodik der in situ an sich reiche Glykogenbestand im RLS der Maus dem Nachweis entgeht, müßten zumindest noch UDPGGT und Transglucosidase darstellbar sein; denn bei Goldhamster und Ratte laufen diese Enzyme dem Glykogengehalt parallel und bleiben auch nach Glykogenabnahme nahezu unverändert aktiv. Lediglich die an das Glykogen gebundene Phosphorylase verhält sich gleichsinnig zum Glykogenverlust (vgl. Godlewski, 1964; Hecht et al., 1968). Insofern dürfte die Glykogenarmut der spezifischen Herzmuskulatur der Maus in etwa den wirklichen Verhältnissen entsprechen.

Unklar ist bisher die funktionelle Bedeutung des Glykogenreichtums im RLS, der z.B. trotz Thyroxin- und Schwimmbelastung bis zur Erschöpfung beim Kaninchen unverändert hoch bleibt (Schiebler, 1955; Schiebler et al., 1956). Wir können zeigen, daß es im AVS der Ratte nach Sauerstoffmangel, Katecholamingaben und Hunger zur Glykogenabnahme kommt. Beim Goldhamster ist dies sicher nur nach Hypoxie und Katecholaminapplikation der Fall. Dabei haben wir wenigstens im Rattenherzen den Eindruck, daß kein prinzipieller Unterschied im Glykogenverhalten von Reizleitungs- und Arbeitsmuskulatur besteht. Der Glykogenverlust nach Hypoxie erhärtet die Vermutung von Schiebler et al. (1956), wonach das Glykogen bei Sauerstoffmangel freigesetzt werden könnte.

Während sich die Stoffwechselsituationen im RLS von Goldhamster und Maus weitgehend gleichen, erbringt die Untersuchung der Innervationsverhältnisse deutliche regionale und tierartige Differenzen. Nur im Goldhamsterherzen zeichnen sich alle Anteile der Reizleitungsmuskulatur durch hohe cholinerge und aminerge Faserdichte aus, wobei beide Nervenfasertypen etwa gleich reichlich vertreten sind. Im Herzen von Haus- und Feldmaus bevorzugen die cholinergen Fasern das AVS, die adrenergen aber den SK. Dagegen beobachten Ehinger et al. (1968) im RLS der Hausmaus ein dem Goldhamster vergleichbares cholinerges und aminerges Innervationsmuster. Besser stimmen unsere Ergebnisse mit elektronenmikroskopischen Befunden überein, wonach der AVK überwiegend cholinerg versorgt wird (Thaemert, 1970). Der außerordentlich dichten cholinergen Innervation des SK beim Goldhamster kommt möglicherweise für die Herabsetzung der Herzfrequenz im Rahmen des Winterschlafes dieser Spezies Bedeutung zu (vgl. Nielsen und Owman, 1968; Kelsall und Visci, 1970). Die unterschiedlichen Innervationsmuster im RLS von Goldhamster und Maus deuten daraufhin, daß sich ganz allgemein das Konzept einer überwiegend aminergen Versorgung des SK sowie einer bevorzugt cholinergen Innervation des AVS (vgl. Gossrau, 1968a, Lit.) nicht aufrechterhalten läßt. Offenbar sind die Innervationsverhältnisse in der spezifischen Herzmuskulatur wesentlich komplizierter und bedürfen weiterer Untersuchung.

### Literatur

- Abe, T., Shimizu, N.: Histochemical method for demonstrating aldolase. *Histochemie* 4, 209—212 (1964).
- Alcini, E., Lageron, A., Wegmann, R.: Étude histoenzymologique du métabolisme glucidique du faiseau de His à différents niveau et du myocarde ventriculaire, chez le rat. *Ann. Histochem.* 10, 127—144 (1965).

- Altmann, F. P., Chayen, J.: The significance of a functioning hydrogen-transport system for the retention of "soluble" dehydrogenases in unfixed sections. *J. roy. micr. Soc.* **85**, 175—180 (1965).
- Arnold, F., Grossmann, H.: Über den Einfluß der Gelinkubation mit Polyvinylalkohol auf die Löslichkeit der Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase. *Histochemie* **13**, 196—202 (1968).
- Kunze, K. D., Simon, H.: Zur Problematik des histotopochemischen Nachweises der Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase am Beispiel der Rattenniere. *Histochemie* **9**, 84—92 (1967).
- Barka, T., Anderson, P. J.: *Histochemistry*. New York-Evanston-London: Harper & Row, Inc. 1963.
- Berchev, K., Rhadanov, S.: Histochemical inquiries into the conduction system of the heart in some hofded animals. *Nauch. Tr. Vissh. Med. Inst. (Sofia)* **44**, 43 (1965).
- Blanchaer, M. C.: Respiration of mitochondria of red and white skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* **206**, 1015—1020 (1964).
- Boxer, G. E., Devlin, T. M.: Pathways of intracellular hydrogen transport. *Science* **134**, 1495—1501 (1961).
- Brandau, H., Pette, D.: Topische Muster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im quergestreiften Muskel. *Enzym. biol. chim.* **6**, 123—156 (1966).
- Buta, J. L., Conklin, J. L., Dewey, M. M.: Subfraction of lactate dehydrogenase of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 658—662 (1966).
- Cahn, R. D., Kaplan, N. O., Levine, L., Zwilling, E.: Nature and development of lactic dehydrogenases. *Science* **136**, 962—969 (1962).
- Carbonell, L. M.: Phosphorylase and conductive system of the heart. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 419 (1955).
- Esterases of the conductive system of the heart. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 87—95 (1956).
- Ehinger, B., Falck, B., Persson, H., Sporrang, B.: Adrenergic and cholinesterase-containing neurons of the heart. *Histochemie* **16**, 197—205 (1968).
- Fahimi, H. D., Amarasingham, C. R.: Cytochemical localization of lactic dehydrogenase in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **22**, 29—48 (1964).
- Farber, E., Sternberg, W., Dunlap, C. E.: Histochemical localization of specific oxidative enzymes. I. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 254—265 (1956).
- Gallo, P.: A study on the topographical and quantitative relations between capillaries and fibres of the conduction system and on their functional significance. *Cardiologica (Basel)* **29**, 241—253 (1956).
- Godlewski, H. G.: Histochemistry of glycogen synthetase and phosphorylase in normal and pathologic tissues. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **4**, 30—51 (1964).
- Gossrau, R.: Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Reizleitungssystem von Vögeln. *Anat. Anz.* **121**, (Erg.-Heft), 49—56 (1968a).
- Über das Reizleitungssystem der Vögel. Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Histochemie* **13**, 111—159 (1968b).
- Dryden, G. L.: Topographical and histological investigations on the impulse conducting system of golden hamsters, mice and shrews. (1971, in Vorbereitung).
- Hecht, A., Jennrich, M., Friedrich, C.: Sauerstoffmangelzustände und histochemisch nachweisbare Phosphorylaseaktivität im Rattenherzmuskel. *Histochemie* **14**, 335—342 (1968).
- Heene, R.: Histochemischer Nachweis von Katecholaminen und 5-Hydroxytryptamin am Kryostatschnitt. *Histochemie* **14**, 324—337 (1968).
- Hegab, E. H. H., Ferrans, V. J.: A histochemical study of the esterases of the rat heart. *Amer. J. Anat.* **119**, 235—252 (1966).
- Henningsen, B.: Zur Innervation arteriovenöser Anastomosen. *Z. Zellforsch.* **99**, 139—145 (1969).
- Himmelhoch, S. R., Karnovsky, M. J.: The histochemical demonstration of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase activity. *J. biophys. biochem.* **9**, 573—581 (1961).
- Isaacson, R., Boucek, R. J.: The atrioventricular conduction tissue of the dog. Histochemical properties; influence of electric shock. *Amer. Heart J.* **75**, 206 (1968).
- Jacobsen, N. O.: The histochemical localization of lactate dehydrogenase isoenzymes in the rat nephron by means of an improved polyvinyl alcohol method. *Histochemie* **20**, 250—265 (1969).

- Kaplan, N. O., Goodfriend, T. L.: Role of two types of lactic dehydrogenases. *Advanc. Enzym. Regulat.* **2**, 203, (1964).
- Karnovsky, M. J., Roots, A.: A "direct-coloring" thiocholine technique for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219—221 (1964).
- Kelsall, M. A., Visci, M.: Aortic cartilage in the heart of Syrian golden hamsters. *Anat. Rec.* **166**, 627—634 (1970).
- Kübler, W., v. Smekal, P., Schumacher, K., Gerhard, W.: Vergleichende Untersuchungen über das Enzymverteilungsmuster im Reizleitungssystem und im Arbeitsmyokard. *Verh. dtsh. Ges. Kreisf.-Forsch.* **35**, 169—174 (1969).
- Kunze, K. D.: Beitrag zur Histochemie der Laktatdehydrogenase. *Histochemie* **11**, 350—359 (1967).
- Lee, Y., Lardy, H. A.: Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. biol. Chem.* **240**, 1427 (1965).
- Lojda, Z.: Remarks on histochemical demonstration of dehydrogenases. II. Intracellular localization. *Folia morph. (Warszawa)* **13**, 84—96 (1965).
- Lowry, O. H.: The quantitative histochemistry of the brain. *Histological sampling. J. Histochem. Cytochem.* **1**, 420—428 (1953).
- Microanalysis for histochemical purposes. In: *Second Int. Congr. of Histo- and Cytochemistry* (Schiebler, T. H., Pearse, A. G. E., Wolff, H. H., eds.), p. 62—69. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer 1964.
- Michel, G., Junge, D.: Zum Vorkommen der Zytochromoxidase, Milchsäuredehydrogenase und der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase in der Herzwand des Huhnes (*Gallus domesticus* L.). *Acta histochem. (Jena)* **35**, 38—42 (1970).
- Mohrenschild, H. v.: *Histologische und histochemische Untersuchungen am Sinusknoten verschiedener Säugetiere und des Menschen. Inaug.-Diss. Würzburg 1964.*
- Morales, A. R., Fine, G.: Enzyme histochemistry of the sinus and atrioventricular node of the human heart. *Lab. Invest.* **14**, 321—329 (1965).
- Nielsen, K. C., Owman, Ch.: Difference in cardiac adrenergic innervation between hibernators and non-hibernating mammals. *Acta physiol. scand., Suppl.* **316** (1968).
- Nomura, S.: On the structure, distribution and innervation of the special heart muscle systems of the mouse. *Cytolog. Neurolog. Studies* **10**, 211—256 (1952).
- Opie, L. H.: Metabolism of the heart in health and disease. Part I. *Amer. Heart J.* **76**, 685—698 (1968).
- Metabolism of the heart in health and disease. Part II. *Amer. Heart J.* **77**, 100—122 (1969).
- Otsuka, N., Hara, T., Okamoto, H.: Histotopochemische Untersuchungen am Reizleitungssystem des Hundeherzens. *Histochemie* **10**, 66—73 (1967).
- Pape, C., Kübler, W., v. Smekal, P.: Morphometrie am Reizleitungssystem und Arbeitsmyokard des Kalbsherzens. *Beitr. path. Anat.* **140**, 23—37 (1969).
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied*, 3rd ed., vol. I. London: Churchill 1968.
- Pfleiderer, G., Wachsmuth, E. D.: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Laktatdehydrogenase menschlicher Organe. *Biochem. Z.* **334**, 185—198 (1961).
- Reiss, J.: Grundlagen und neuere Ergebnisse des histochemischen Nachweises von Dehydrogenasen mit Tetrazoliumsalzen. *Z. wiss. Mikr.* **68**, 169—189 (1967).
- Romeis, B.: *Mikroskopische Technik. München: Oldenbuorg 1948.*
- Sasse, D.: Untersuchungen zur Nachweismethodik der Uridindiphosphoglukose-Glykogen-transferase. *Histochemie* **7**, 39—49 (1966).
- Schiebler, T. H.: Herzstudie. I. Mitt. Histochemische Untersuchungen der Purkinjefasern von Säugern. *Z. Zellforsch.* **39**, 152—167 (1953).
- Herzstudie. II. Mitt. Histologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen am Atrioventrikularsystem von Huf- und Nagetieren. *Z. Zellforsch.* **43**, 243—306 (1955).
- Über den histochemischen Nachweis von Atmungsfermenten im Reizleitungssystem. *Anat. Anz.* **111** (Erg.-Heft), 103—112 (1962).
- Doerr, W.: Orthologie des Reizleitungssystems. In: *Das Herz des Menschen* (W. Bargmann, W. Doerr, Hrsg.). Stuttgart: Thieme 1963.
- Starck, M., Caesar, R.: Die Stoffwechselsituation des Reizleitungssystems. *Klin. Wschr.* **34**, 181—183 (1956).



- Simon, H., Arnold, F., Rindfleisch, B.: Indirekter Aldolase-Nachweis. *Acta histochem.* (Jena) **23**, 322—325 (1966).
- Snijder, J., Meijer, A. E. F. H.: Enzyme histochemical studies on the Purkinje fibres of canine, bovine and porcine hearts. *Histochem. J.* **2**, 395—409 (1970).
- Thaemert, J. C.: Atrioventricular node innervation in ultrastructural three dimensions. *Amer. J. Anat.* **128**, 239—264 (1970).
- Toth, A., Schiebler, T. H.: Über die Entwicklung der Arbeits- und Erregungsleitungsmuskulatur des Herzens von Ratte und Meerschweinchen. *Histologische, histochemische und elektrophysiologische Untersuchungen. Z. Zellforsch.* **76**, 543—567 (1967).
- Wijhe, M. v., Blanchaer, M. C., George-Stubbs, S. S.: The distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in human skeletal muscle fibers. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 608—614 (1964).
- — Jacyk, W. R.: The oxidation of lactate and  $\alpha$ -glycerophosphate by red and white skeletal muscle. II. Histochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 505—510 (1963).
- Wilson, A. C., Cahn, R. D., Kaplan, N. O.: Functions of two forms of lactic dehydrogenase in the breast muscle of birds. *Nature (Lond.)* **197**, 331 (1963).
- Winckler, J.: Zum Einfrieren von Gewebe in Stickstoff-gekühltem Propan. *Histochemie* **23**, 44—50 (1970 a).
- Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte für histologische und histochemische Untersuchungen. *Histochemie* **24**, 168—186 (1970 b).

Dr. R. Gossrau  
Anatomisches Institut der Universität  
BRD-8700 Würzburg, Koellikerstr. 6  
Deutschland