

Aus dem Institut für Pathologie (Geheimrat v. Krehl) des Kaiser Wilhelm-Instituts für medizinische Forschung in Heidelberg.

Über ein Manometergefäß zur Bestimmung von Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe von Gewebeschnitten.

Von

Dr. H. Ruska.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. IX. 1934.)

Die gebräuchlichen Methoden von Warburg¹, Meyerhof² und Dickens³ zur Bestimmung des scheinbaren und echten respiratorischen Quotienten verwenden Anordnungen, bei welchen die Meßergebnisse von mehreren Gewebeschnitten in zwei oder drei Manometern zur Berechnung verwendet werden. Dabei muß die Atmung der Schnitte quantitativ und qualitativ möglichst genau übereinstimmen, was einen einheitlichen histologischen Bau zur Voraussetzung hat. Bei der Messung des Stoffwechsels von Unterhautfettgewebe der Ratte⁴, welches beim gleichen Tier einen schwankenden Anteil von Bindegewebe enthält, war diese Forderung nicht streng zu erfüllen. Der Stickstoff- und Wassergehalt nahe beieinander liegender Fettgewebsteile, wie etwa des Fetts der Schenkelbeuge und des seitlich und nach dem Rücken zu sich anschließenden Gewebes kann bis zu 15% schwanken. Es mußte deshalb ein Weg gesucht werden, der erlaubt, an eine und derselben Gewebeportion Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe zu bestimmen. Fehler, die durch Änderung des Säurebasengleichgewichts des Gewebes auftreten können, mußten dabei in Kauf genommen werden. Es kam uns nicht so sehr darauf an, die absolute Höhe des respiratorischen Quotienten (R.-Q.) zu untersuchen*, als vielmehr Änderungen festzuhalten, die im Zusammenhang mit Eingriffen in den Gesamtstoffwechsel des Tieres auftreten und sich am isolierten Gewebe noch nachweisen lassen.

Die physiologisch beste Methode von Warburg, welche in verschiedenen Flüssigkeits- bzw. Gasvolumen in Sauerstoff mit 5% Kohlensäure die Differenz zwischen Gasaufnahme und Gasabgabe mißt, mußte auch aus einem anderen Grunde ausscheiden. Die Differenzmessung bei der nur geringen Atmung der Fettgewebe gibt zu kleine Manometerausschläge und

¹ Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumoren. Springer, 1926. Vgl. auch Krebs, H. A.: Oppenheimers Handb. d. Methodik der Fermente, S. 635. —

² Meyerhof, O. u. F. O. Schmitt: Biochem. Z. **208**, 445 (1929). — ³ Dickens, F. u. F. Šimer: Abderhaldens Handb. IV, Teil 13, Heft 5, S. 435. — ⁴ Siehe die folgende Arbeit.

* Diese erwies sich schon bei den Untersuchungen von Seoz als äußerst variabel.

wird dadurch ungenau. So konnte die Sauerstoffaufnahme nur beim Kohlensäuredruck ≈ 0 unter Absorption des vom Gewebe abgegebenen Kohlendioxyds gemessen werden. Die Kohlensäure mußte nach dem Versuch aus dem Absorptionsmittel ausgetrieben werden. Dieses Prinzip, das von Meyerhof und Schmitt, sowie von Dickens und Simer angewendet wurde, schließt bei Verwendung eines einzelnen Manometergefäßes zwei Fehler in sich, die umgangen werden mußten. Erstens wird während der Zeit des Temperatúrausgleichs im Thermostaten vom Gewebe eine unbekannte Menge Kohlensäure gebildet, die am Ende des Versuchs mit ausgetrieben wird, und zweitens kann am Ende des Versuchs nach der Austreibung der Kohlensäure aus dem Absorptionsmittel von der Suspensionsflüssigkeit des Gewebes und diesem selbst wieder Kohlensäure absorbiert werden. Gewebe und Suspensionsflüssigkeit selbst anzusäuern, hätte die Kenntnis der vor dem Versuch im Gewebe vorhandenen Kohlensäuremenge verlangt, die, um eine zweite Messung zu vermeiden, umgangen werden mußte. Der erste Fehler war dadurch auszuschalten, daß die Kohlensäure im Manometergefäß von zwei räumlich getrennten Absorptionsmitteln (I und III) absorbiert wird, die nacheinander mit dem Gasraum über dem Gewebeschnitt in Verbindung gebracht werden. Das eine Absorptionsgefäß (III) nimmt die Kohlensäure während der Vorbereitungszeit und der Zeit des Temperatúrausgleichs auf bis zum Beginn der Atmungsmessung, das andere (I) nur während der Atmungsmessung. Der zweite Fehler wurde so umgangen, daß beim Austreiben der Kohlensäure aus dem Absorptionsmittel der Gasraum über dem Gewebe (II) nicht mehr mit dem Gasraum, der die Kohlensäure zur Messung aufnimmt, in Verbindung ist. Das abgebildete dreiteilige Manometergefäß* ermöglicht dieses Vorgehen.

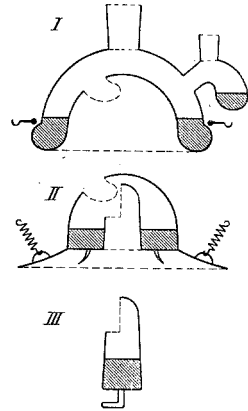


Abb. 1. Erklärung siehe Text.

Das Gefäß II nimmt durch den Ausschnitt im Kugelschliff das zu untersuchende Gewebe auf. In den inneren Turm wird der Einsatz III mit 5% iger Kalilauge gefüllt so eingeführt, daß sein Gasraum durch den Ausschnitt im fingerförmigen Schliff mit dem Gasraum des Gefäßes II verbunden ist. Zur Vergrößerung der absorbierenden Fläche der Kalilauge wird ein Filtrierpapierstreifen in den Einsatz III gebracht, der bis in die Kuppe hinaufreicht. Der Einsatz wird durch einen Gummiring mit Hilfe der Glashaken am Boden des Gefäßes II festgehalten. Das Gefäß II wird mit Gefäß I durch den gut zu fettenden Kugelschliff zunächst so verbunden, daß die Gasräume miteinander kommunizieren. Die Gefäße werden durch vier kleine Zugfedern aneinandergespreßt. Die Anordnung der Haken am oberen Gefäß auf einem frei beweglichen Kupfering erlaubt die Gefäße gegen-

Beschreibung eines Versuchs.

Das Gefäß II nimmt durch den Ausschnitt im Kugelschliff das zu untersuchende Gewebe auf. In den inneren Turm wird der Einsatz III mit 5% iger Kalilauge gefüllt so eingeführt, daß sein Gasraum durch den Ausschnitt im fingerförmigen Schliff mit dem Gasraum des Gefäßes II verbunden ist. Zur Vergrößerung der absorbierenden Fläche der Kalilauge wird ein Filtrierpapierstreifen in den Einsatz III gebracht, der bis in die Kuppe hinaufreicht. Der Einsatz wird durch einen Gummiring mit Hilfe der Glashaken am Boden des Gefäßes II festgehalten. Das Gefäß II wird mit Gefäß I durch den gut zu fettenden Kugelschliff zunächst so verbunden, daß die Gasräume miteinander kommunizieren. Die Gefäße werden durch vier kleine Zugfedern aneinandergespreßt. Die Anordnung der Haken am oberen Gefäß auf einem frei beweglichen Kupfering erlaubt die Gefäße gegen-

* Die Herstellung der Gefäße mit ausgeschnittenen Kugelschliffen übernahm die Firma Hormuth und Vetter, Heidelberg.

einander zu verdrehen. Im Anhang des Gefäßes I befindet sich gesättigte Citronensäurelösung, die sich, da sie nicht flüchtig ist, zur Ansäuerung des Bariumhydroxyds besonders eignet. Die ganze Anordnung wird mit dem Manometer so verbunden, daß die Schnittebene der Abbildung senkrecht zu derjenigen Ebene steht, in welcher die Gefäße im Thermostaten geschüttelt werden. Dadurch wird ein Überfließen der Flüssigkeiten aus den verschiedenen Räumen vermieden. Die Gefäße werden kurze Zeit am Manometer mit kohlenstofffreiem Sauerstoff durchströmt, was auch mit der Suspensionsflüssigkeit* vor der Einfüllung in Gefäß II geschehen ist. Dann wird II durch Drehen um 180° gegen I verschlossen und gegen den Sauerstoffstrom durch den Tubus des Anhangs wird in das ringförmige äußere Absorptionsgefäß halbgesättigte Bariumhydroxydlösung, die unter Kohlenstoffverschluss steht, eingefüllt. Konzentration und Flüssigkeitsmenge müssen so gewählt sein, daß die Citronensäure zur Übersäuerung der Barytlauge ausreicht. Der Tubus wird verschlossen und das Manometergefäß mittels der Schüttelvorrichtung in den Thermostaten von 37° C gehängt.

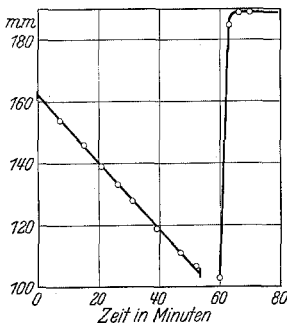


Abb. 2. Atmung vom Unterhautfettgewebe einer 4 Tage hungernden Ratte. Abszisse = Zeit in Minuten. Ordinate = mm Druck in Brodie'scher Flüssigkeit.

Bis zum erfolgten Temperatenausgleich in 10–15 Minuten absorbiert die Kalilauge im Innengefäß III die Atmungskohlensäure. Ist der Temperatenausgleich erfolgt, d. h. bleibt die Manometereinstellung konstant, so wird unter Wasser III gegen II geschlossen. An dem einseitigen Griff am Boden des Einsatzes III kann man sich leicht über die Stellung der Einsatzöffnung orientieren. Von diesem Augenblick an ist die Versuchszeit zu rechnen, II wird gegen I geöffnet, das Außengefäß I beginnt mit der Absorption der Kohlensäure. Der Sauerstoffverbrauch wird in der üblichen Weise am Manometer durch die Druckabnahme gemessen. Bei der Öffnung von II gegen I entsteht ein Überdruck, da das erwärmte Gas in II sich nicht ausdehnen konnte. Nach Beendigung der Atmungsmessung wird II gegen I wieder verschlossen. Am besten verfährt man dabei so, daß man am Kupfering dreht, der mit seinen vier Federn das Gefäß II nach sich zieht. Das Außengefäß I kann am Anfang leicht festgehalten werden. Mit dem Drehen tritt gewöhnlich eine kleine Verschiebung des Manometerstandes ein. Diese ist praktisch belanglos, da der Sauerstoffverbrauch aus der graphischen Darstellung der Meßpunkte auch ohne genauen Endpunkt hervorgeht.

Nachdem man sich überzeugt hat, daß am Manometerstand keine Änderung mehr eintritt, nimmt man das Gefäß aus dem Thermostaten heraus und kippt die Säure in das Bariumhydroxyd ein. Es entsteht zunächst ein Niederschlag von citronensaurem Barium, der sich im Überschuß der Säure wieder löst. Wenige Minuten nach dem Zurückbringen des Gefäßes in den Thermostaten kann man die Druckerhöhung durch die ausgetriebene Kohlensäure ablesen. Von der endgültigen Ablesung muß derjenige Manometerausschlag in Abzug gebracht werden, den man in einem vorher auszuführenden Leerversuch beim Ansäuern des Bariumhydroxyds erhält. Diese Korrektur bleibt dann bei Verwendung der gleichen Bariumhydroxydlösung für jeden Versuch und jedes Gefäß dieselbe.

Berechnungsbeispiel.

Die Gefäßkonstanten nach Warburg (l. c.)

$$k = V_G \frac{273}{P_0 \cdot T} + V_F \frac{\alpha}{P_0}$$

* Am besten Phosphat-Ringerlösung.

und der Wert Q_{O_2} = Sauerstoffverbrauch pro mg Trockengewicht und Stunde werden in der üblichen Weise berechnet. Die Gefäßvolumina betragen für Gefäß I mit Manometeransatz 14,83 ccm, für Gefäß II 8,91 ccm, das Volumen des Einsatzes III wird nicht in die Rechnung einbezogen, da es bei der Messung nicht mit dem Manometer verbunden ist. Von den Gefäßvolumen werden die Flüssigkeitsvolumina (V_F) abgezogen, um die Volumina der Gasräume (V_G) zu erhalten. V_F setzt sich zusammen aus 2,5 ccm Suspensionsflüssigkeit für das zu untersuchende Gewebe in Gefäß II, 4,0 ccm Barytlaug und 0,3 ccm Citronensäure in Gefäß I. Die Gefäßkonstante für Sauerstoff K_{O_2} errechnet sich hieraus zu 1,51, die Konstante für Kohlensäure K_{CO_2} aus den Volumen des Gefäßes I zu 1,15. Aus der Kurve ergibt sich für die Versuchszeit von 53 Minuten eine Abnahme des Sauerstoffdrucks $h_{O_2} = - 57,5$ mm und eine Druckzunahme durch die ausgetriebene Kohlensäure $h_{CO_2} = + 86$ mm, von welcher 11 mm aus dem Vorversuch abgezogen werden müssen. Bei einem Trockengewicht des Fettgewebes von 210,6 mg ist der Sauerstoffverbrauch $Q_{O_2} = - 0,46$. Der respiratorische Quotient ist im Gegensatz zu anderen Methoden von Gewebegewicht und Versuchsdauer unabhängig. $R.-Q. = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{h_{CO_2} \cdot K_{CO_2}}{h_{O_2} \cdot K_{O_2}}$ ist für jedes Gefäß wieder konstant = $K_{R.-Q.}$, in unserem Beispiel $K_{R.-Q.} = 0,764$ und $R.-Q. = 0,99$. Die Berechnung des respiratorischen Quotienten ist also äußerst einfach.

Die Anwendung von Absorptionsgefäßen, welche sich von außen verschließen lassen, dürfte auch für andere Methoden geeignet sein. Das beschriebene Gefäß kann nicht nur zu Messungen am Fettgewebe Anwendung finden, sondern auch für jedes andere Gewebe, zur Untersuchung der Wirkung von Substratzusätzen, Fermentmodellen und dergleichen mehr. Die Verlässlichkeit der Methode ist aus Doppelbestimmungen an Lebern normaler und hungernder Ratten ersichtlich.

Ratte	Hungertage	Q_{O_2}		R.-Q.	
82	0	10,3	9,8	0,89	0,91
97	1	10,3	9,7	0,81	0,82
99	2	10,6	10,4	0,79	0,79
104	4	10,0	10,2	0,79	0,81

Die Größe des respiratorischen Quotienten kann, wie bei der Kästchenmethode von Warburg durch die Glykolyse oder Kohlensäureretention der Gewebe beeinflusst werden.

Zusammenfassung.

Es wird ein Gefäß für Warburg-Manometer beschrieben, das erlaubt, ohne Vergleichsgefäß sowohl Sauerstoffaufnahme als auch Kohlensäureabgabe von Gewebeschnitten beim Kohlensäuredruck 0 zu bestimmen.

Herrn Th. Oestreicher danke ich für seine Hilfe bei der Ausarbeitung der Methode.