

## UEBER DIE CHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE NATUR DER STICKSTOFFABGABE VON GEWEBSSCHNITTEN IM WARBURG-VERSUCH

von

H. AEBI

*Medizinisch-chemisches Institut der Universität, Bern (Schweiz)*

Der Zustand eines überlebenden Organschnittes hängt ausser von seiner Herstellungsweise und der Ueberlebenszeit vor allem von der Beschaffenheit seines Milieus ab. Die am häufigsten gemessene Tätigkeit des überlebenden Gewebes — der  $O_2$ -Verbrauch — wird zwar oft der Atmungsgrösse *in vivo* ohne Vorbehalt gleichgesetzt; er kann indessen durch obige Faktoren weitgehend verändert werden. Als Hilfsmittel zur besseren Abschätzung solcher Wirkungen lassen sich verschiedene Eigenschaften der Schnitte oder des suspendierenden Mediums heranziehen: Die Konstanthaltung der Atmung<sup>1,2,3</sup>, die Aufrechterhaltung des *in vivo* vorhandenen Wassergehaltes resp. Trockengewichtsanteiles des Gewebes<sup>4,5</sup> und das Ausmass der Abgabe stickstoffhaltiger Substanzen an das suspendierende Medium<sup>6</sup>.

Der Stickstoffverlust, den Schnitte im Warburgversuch erleiden, ist zuerst von CUTTING UND MACCANCE<sup>6</sup> bei Nierenschnitten von neugeborenen und ausgewachsenen Ratten bestimmt worden. Abgesehen von den beobachteten Altersunterschieden stellten diese Autoren fest, dass der Calciumgehalt des Mediums für die Grösse der N-Abgabe ausschlaggebend ist. Die Gegenwart einer geringen Calciumkonzentration von 2 mmolar bewirkt eine starke Einschränkung desselben, ebenso verhindert sie eine Quellung der Nierenschnitte. Aus dem gleichen Institut hat ROBINSON<sup>2</sup> später die Abhängigkeit der N-Abgabe vom Quellungsgrad des überlebenden Gewebes bestätigt und auf das antagonistische Verhalten von Atmungsgrösse und Quellung hingewiesen.

In dieser Arbeit sollen die Zusammenhänge, die zwischen dem Stickstoffverlust und den anderen erwähnten Kriterien bestehen, untersucht werden. Ferner gibt die chemische, mikroskopische und elektronenmikroskopische Analyse des Mediums Aufschluss über die Zusammensetzung des N-Verlustes. Dies erlaubt eine bilanzmässige Unterteilung des während eines Warburg-Versuches abgegebenen stickstoffhaltigen Substanzen in verschiedene Fraktionen.

Die praktische Bedeutung dieses Problems liegt darin begründet, dass es selbst heute nicht endgültig entschieden ist, welche Grösse am zweckmässigsten und besten als Basis für die gemessenen Leistungen des überlebenden Gewebes verwendet werden soll. Als Bezugssubstanz werden am häufigsten Feuchtgewicht, Trockengewicht oder N-Gehalt der Gewebsschnitte verwendet. Diese Daten lassen sich entweder bei Versuchsbeginn oder bei Versuchsende, in parallelen Ansätzen oder direkt ermitteln. Die Analyse des N-Verlustes ist somit nicht nur ein Test für die Qualität der Versuchsbedingungen,

sondern liefert auch einen Beitrag zur Entscheidung dieser Streitfrage. Da sich darauf keine allgemeingültige Antwort geben lässt, muss dies für jede Versuchsanordnung und jedes Gewebe (hier: Schnitte von Meerschweinchenleber) erneut geprüft werden. Massgebend ist die Tatsache, ob den vom Schnitt in das Medium übergetretenen N-Verbindungen ein Anteil am gemessenen Gaswechsel oder Stoffumsatz zukommt oder nicht.

Schliesslich hat sich gezeigt, dass das Bewegen von überlebenden Gewebsschnitten in Gegenwart von Sauerstoff und bei Körpertemperatur in einer geeigneten physiologischen Ersatzlösung eine weitere Möglichkeit darstellt, Zellbestandteile schonend aus desintegrierendem Gewebe resp. Zellen herauszulösen. Dies ist vor allem deswegen der Fall, weil die Schnittoberfläche fast gänzlich aus 2 grossen Wundflächen besteht. Es muss daher angenommen werden, dass sämtliche an der Oberfläche liegenden Zellen laediert sind. Damit ist auch ausgesagt, dass es sich bei der Abgabe stickstoffhaltiger Substanzen an das Medium — von der Rest-N-Fraktion abgesehen — weniger um eine "Eiweisslösung" als um eine Suspension der verschiedensten cellulären Elemente handelt.

## VERSUCHSERGEBNISSE

### 1. Methodisches

Als Versuchstiere dienten Meerschweinchen ( $G = 400-800$  g), welche nach 24 h Hungern durch Decapitation getötet wurden. Unmittelbar nach dem Ausbluten des Tieres wurde die Leber entnommen und in ein eisgekühltes Becherglas gelegt. Die Herstellung der Leberschnitte von ca 0.4 mm Dicke erfolgte nach der Methode von DEUTSCH<sup>7</sup>, wobei die Schnitte vor dem Einbringen in die Warburg-Gefässe unbewegt 5–10 Minuten in  $O_2$ -gesättigter Suspensionsflüssigkeit gehalten wurden. Als suspendierendes Medium gelangte das früher beschriebene kaliumreiche Medium zur Anwendung, mit der Ausnahme, dass der Phosphatzusatz auf die Hälfte d.h. auf eine Endkonzentration von 20 mmolar reduziert wurde. Diese Lösung weicht lediglich in Bezug auf ihren Kaliumgehalt (11 mmolar) von den andern gebräuchlichen Lösungen ab (vgl. <sup>3</sup>, bes. Tabelle I). Dieses Medium wird durch zehnfaches Verdünnen einer Stammlösung folgender Zusammensetzung hergestellt: 440 ml 9.5% NaCl, 40 ml 12.2% KCl, 12 ml 1.16 molar  $CaCl_2$  und 8 ml 1.16 molar  $MgCl_2$ -Lösung. Auf 5 Teile der verdünnten Lösung werden 1 Teil (z.B. 0.5 zu 2.5 ml) isotonische Na-Phosphat-Pufferlösung von pH 7.1 vor Gebrauch zugesetzt. Dieses Milieu zeigt folgende Kationenkonzentrationen: 144 mmolar Na; 10.8 mmolar K; 2.3 mmolar Ca und 1.5 mmolar Mg. Nähere technische Angaben über die Bestimmung der Gewebsatmung nach der direkten Methode von WARBURG sind beschrieben (AEBI<sup>3</sup>).

Das End-Feuchtgewicht der Schnitte wurde nach vorsichtigem Abtrocknen derselben mit Streifen von gehärtetem Filtrierpapier mit der Torsionswaage auf 0.5 mg genau bestimmt, ebenso das End-Trockengewicht nach Trocknen bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz. Die Berechnung des Quellungsgrades der Schnitte geschah nach ROBINSON<sup>8</sup>. Die Bestimmung des Stickstoffes im suspendierenden Medium erfolgte in einem aliquoten Teil der Proben nach der Mikroveraschungsmethode von PARNAS-KJELDAHL. Bei der Ermittlung des Rest-N-Anteils wurde zur Eiweissfällung ein gleicher Volumteil 20% Trichloressigsäure zugesetzt und nach 10 min abfiltriert. Da für die Fraktionierungsversuche grössere Flüssigkeitsmengen wünschenswert waren, wurden Grossansätze zu 15–20 ml in 100er Erlenmeyerkölbchen angesetzt. Diese wurden unter denselben Versuchsbedingungen wie die Warburg-Gefässe gehalten. Das Verhältnis von Gewebemenge (3 Schnitte entsprechend ca 80–100 mg Frischgewebe) zum Gesamtflüssigkeitsvolumen (3 ml) wurde dabei konstant gehalten. Die Grossansätze wurden im Thermostaten bei 37.6° C bewegt und kontinuierlich mit  $O_2$  durchperlt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Bern (Vorsteher: Prof. Dr W. FEITKNECHT) ausgeführt. Das Elektronenmikroskop (Fa. Trüb-Täuber, Zürich) steht dank Mitteln aus dem Arbeitsbeschäftigungskredit des Bundes zur Verfügung<sup>9</sup>). Ein kleiner Tropfen der Suspensionslösung resp. der überstehenden Flüssigkeit wurde — direkt oder nach vorangehender Fixierung mit 2% Osmiumsäure — auf die Trägerfolie gegeben, trocken gelassen und nach einigen Stunden wiederholt mit dest. Wasser gewaschen. Die Beschattung der Präparate erfolgte mit einer Legierung von Gold + Manganin unter einem Winkel von 14°. Die Strahlspannung betrug 50 kV.

\* Herrn Dr H. STUDER sei für die bereitwillige Ausführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen herzlich gedankt.

Literatur S. 456.

## 2. Zeitlicher Verlauf von Atmung, Quellung und Desintegration von Leberschnitten

CUTTING UND MACCANCE<sup>8</sup>, sowie ROBINSON<sup>2</sup> haben an Schnitten von Rattenniere beobachtet, dass die Grösse des Gesamt-N-Verlustes vom Verlauf der Atmungskurve abhängt. Bleibt der  $O_2$ -Verbrauch als Zeichen dafür, dass die Versuchsbedingungen optimal sind, über mehrere Stunden konstant, dann resultiert eine relativ geringe Abgabe von N-haltigen Substanzen an das Medium. Unter ungünstigen Bedingungen z.B. bei Fehlen von Calcium- oder Kalium-Ionen im Medium, kommt es relativ rasch zum Erlahmen der Atmungstätigkeit verbunden mit einer Erhöhung des Stickstoff-Verlustes. Andererseits ist früher mitgeteilt worden, dass Ausmass und Geschwindigkeit der

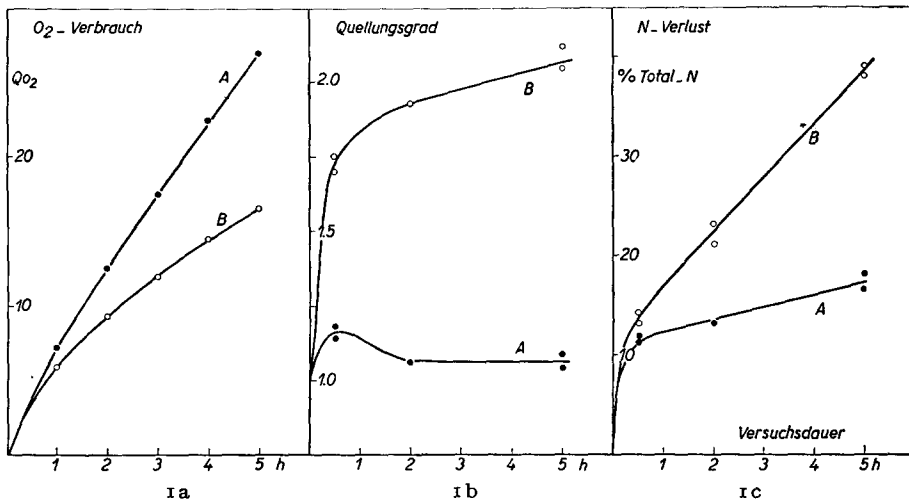


Fig. 1.  $O_2$ -Verbrauch, Quellung und Stickstoff-Verlust von Leberschnitten (Meerschweinchen) in einem quellungsverhindernden Medium (kaliumreiches Medium) A = —●— und einem quellungsfördernden Medium (0.95% NaCl) B = —○—

1a.  $O_2$ -Verbrauch:  $Q_{O_2}$  bezogen auf 1 mg End-Trockengewicht. Substrat 0.01 m Na-Fumarat.

1b. Quellungsgrad: relatives Feuchtgewicht der Schnitte bezogen auf dieselbe Menge Trockensubstanz. Verhältnis Feuchtgewicht: Trockengewicht *in vivo* = 1.0.

1c. Abgabe N-haltiger Substanzen an das suspendierende Medium: Total-N aliquoter Proben des Mediums bezogen auf den N-Gehalt der Schnitte bei Versuchsende.

Atmungsabnahme von Leberschnitten während des Versuches vor allem vom Quellungsgrad der Schnitte abhängt. (AEBI<sup>3</sup>). Da das Ausmass der N-Abgabe ebenfalls eine Funktion des Quellungsgrades der Schnitte ist, besteht somit eine gegenseitige Beziehung zwischen allen drei Grössen.

Am deutlichsten treten diese beim Vergleich extremer Bedingungen zutage. Werden Leberschnitte unter denselben Versuchsbedingungen einerseits in 0.95% NaCl-Lösung und andererseits im kaliumreichen Medium suspendiert, so ergibt sich das in Fig. 1 dargestellte Verhalten.

Im kaliumreichen Medium, welches — wenigstens für Versuche mit Leberschnitten — eine optimale Kationenzusammensetzung aufweist, atmen die Schnitte bis zu 5 Stunden mit praktisch gleichbleibendem  $O_2$ -Verbrauch, quellen kaum und erleiden nur einen sehr kleinen N-Verlust. Obwohl Ionenstärke, Pufferung und pH (= 7.1) gleich

sind, kommt es in isotonischer NaCl-Lösung zu einem raschen Abfall der Atmungstätigkeit. Die beträchtliche Quellung der Schnitte auf annähernd das doppelte ihres ursprünglichen Volumens ist von einer ausgiebigen Stickstoff-Abgabe an das Medium begleitet, dies als Ausdruck einer beschleunigten Desintegration des Gewebes.

Die zeitliche Unterteilung des Stickstoff-Verlustes in 2 verschiedene Phasen, auf welche ROBINSON<sup>2</sup> hingewiesen hat, lässt sich auch bei Versuchen mit Leberschnitten erkennen. Während die N-Abgabe in den ersten 15 min des Versuches in jedem Falle bedeutend ist, zeigt diese in der darauffolgenden 2. Phase grosse Unterschiede. Sie ist nahezu Null bei den nicht gequollenen Schnitten, dagegen beträchtlich, aber von konstantem Ausmass bei den gequollenen Schnitten. Dieselbe zeitliche Trennung lässt sich beim Quellen der Leberschnitte beobachten, indem sich dort der Quellungsgrad innerhalb der ersten 15–20 min des Versuches ändert und dann nach Einstellung der neuen Gleichgewichtslage nur wenig variiert.

### 3. *Fraktionierung des abgegebenen Stickstoffs*

Die alleinige Angabe des Gesamt-Stickstoffs mag als Test zur Prüfung der Versuchsbedingungen im Serienversuch genügen. Die richtige Beurteilung dieser Daten setzt indessen die Kenntnis voraus, aus welchen chemischen *und* morphologischen Komponenten sich diese Stickstoff-Abgabe zusammensetzt. Zu diesem Zwecke wurde das suspendierende Medium eines Grossansatzes von 20 ml nach Herausnahme der Leberschnitte (12–15 Stück) durch 15 min langes Zentrifugieren bei 1500 g von allen cellulären Bestandteilen befreit. Sediment und Ueberstehendes wurden getrennt weiter verarbeitet. Vor dem Zentrifugieren wurde ein kleiner aliquoter Teil aus der gut gemischten Suspension entnommen und darin die Zahl der suspendierten Erythrocyten und Leberzellen in der Bürker-Zählkammer bestimmt.

Die Umrechnung der Zellenzahl in Stickstoff geschah auf Grund folgender Analysenergebnisse resp. Annahmen: Die Anzahl Erythrocyten pro mm<sup>3</sup> Meerschweinchenblut beträgt im Durchschnitt 5.5 Millionen. Der Haemoglobingehalt des Meerschweinchenblutes ist 12 g/100 ml und der Gesamt-Stickstoff 2.75 %, entsprechend ca 17 % Protein. Der Berechnung des Stickstoffgehaltes einer Leberzelle wurden folgende Daten zugrunde gelegt.: Der Total-N-Gehalt von frischem Lebergewebe beträgt im Mittel 2.9 %. Da der davon abzuziehende Rest-N-Anteil im Mittel 200 mg % beträgt, entspricht dies einem Proteingehalt von  $ca\ 6.25 \cdot 2.7 = 16.9 \sim 17\%$  in der Leber. Bei Annahme, dass die Kantenlänge der in ungequollenem Zustand annähernd würfelförmigen Leberzellen rund 20  $\mu$  beträgt, ergibt sich schätzungsweise ein Zellvolumen von  $8 \cdot 10^{-6}$  mm<sup>3</sup>, entsprechend einer Proteinmenge von  $1.4 \cdot 10^{-6}$  mg. Bei einer grossen Anzahl von frischen Leberproben und von inkubierten Gewebsschnitten wurde ein Stickstoffgehalt von 9.2–10.5 mg N pro 100 mg Trockensubstanz, durchschnittlich 10 % ermittelt.

Die nach obigen Richtlinien vorgenommene Unterteilung des in einem Grossansatz von 20 ml vorhandenen Stickstoffs ergibt die in Tabelle I wiedergegebenen Verhältnisse. Die Basis für die darin errechneten relativen Daten bildet der gesamte, in Schnitt und Medium enthaltene Stickstoff des Ansatzes.

Auf Grund des in Tabelle I wiedergegebenen und anderer analoger Versuche, setzt sich das N-haltige Material, welches während eines Warburg-Versuches von Leberschnitten des Meerschweinchens abgegeben wird, wie folgt zusammen: Bei den 8–12 % N, welche in den ersten 15 min des Versuches d.h. noch während der Temperatenausgleichsperiode abgegeben werden, handelt es sich zu ca einem Drittel um Rest-N und zu zwei

TABELLE I

FRAKTIONIERUNG DER STICKSTOFFABGABE VON LEBERSCHNITTEN (MEERSCHWEINCHEN)  
IM WARBURGVERSUCH BEI VARIABLER VERSUCHSDAUER UND IN VERSCHIEDENEN MEDIEN

Grossansätze à 20 cm<sup>3</sup>. Versuchsbedingungen: T = 37.6° C; pH = 7.2, Quotient Trockengewicht: Feuchtgewicht *in vivo* = 30.0%. Zusammensetzung der Lösungen siehe Methodik. Kein Substratzusatz (Versuch No. 260 vom 9.10.51)

Fraktion	In K-reichem Medium:		In 0.95% NaCl-Lösung:	
	15 min	5 h	15 min	5 h
Total-N im Ansatz (Schnitt + Lösung) = 100%	31.2 mg	36.2 mg	34.5 mg	38.1 mg
Schnitte: Total-N	28.1 mg = 90.0%	31.4 mg = 86.7%	30.1 mg = 87.2%	19.8 mg = 52.0%
Trockengewicht	276 mg	307.5 mg	298 mg	220 mg
$Q = \frac{\text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}}$	26.8%	27.8%	18.9%	15.1%
Suspend. Medium:				
Total N	3.07 mg = 9.8%	4.80 mg = 13.2%	4.39 mg = 12.8%	18.3 mg = 48.0%
Rest-N	1.19 mg = 3.8%	2.61 mg = 7.2%	1.38 mg = 4.0%	3.33 mg = 8.8%
Protein N	1.88 mg = 6.0%	2.19 mg = 6.0%	3.01 mg = 8.8%	14.97 mg = 39.2%
Ueberstehendes:				
Protein N	1.17 mg = 3.7%	1.26 mg = 3.5%	2.0 mg = 5.8%	5.45 mg = 14.2%
Sediment insgesamt:				
Protein N	0.71 mg = 2.3%	0.93 mg = 2.6%	1.02 mg = 2.9%	9.52 mg = 25.0%
davon Erythrocyten				
Zellzahl/Ansatz	64 Mill.	72 Mill.	35 Mill.	48 Mill.
entspr. N (aus Blut)	0.32 mg = 1.0%	0.36 mg = 1.0%	0.18 mg = 0.6%	0.24 mg = 0.6%
davon Gewebe-Eiweiss	0.39 mg = 1.3%	0.57 mg = 1.6%	0.84 mg = 2.4%	9.28 mg = 24.4%
intakte Leberzellen				
Anzahl/Ansatz	310,000	780,000	260,000	1,000,000
entspr. N	0.07 mg	0.19 mg	0.06 mg	0.24 mg

Dritteln um Protein-N. Letzterer stammt — der Erythrocytenzahl im Medium nach zu schliessen — lediglich zu 10–20% aus den ausgespülten Blutgefässen des Schnittes. Der überwiegende Teil von Eiweiss-N wird von Zellen oder Zellverbänden, welche an der Schnittoberfläche abgelöst worden sind, dargestellt. Da sich diese Partikel jedoch nur ca zur Hälfte abzentrifugieren lassen, muss man annehmen, dass grössenordnungsmässig 50% der abgelösten Zellen infolge mechanischer Laedierung oder Auflösung nicht mehr als solche vorhanden sind. Die mikroskopische und elektronenmikroskopische Analyse des Ueberstehenden bekräftigt diese Annahme. Betrachtet man eine Probe des suspendierenden Mediums eines Warburg-ansatzes nach kurzdauernder Inkubierung (15 min)

Literatur S. 456.

bei mittlerer Vergrößerung, so lassen sich — unabhängig von der Art des Mediums — neben vielen Erythrocyten auch intakte Leberzellen, einzeln oder in kleinen Verbänden, nachweisen.

Der relativ grosse Anteil der Rest-N-Fraktion von ca 30% am Stickstoffverlust während der ersten 15 min des Versuches ist auf den hohen Rest-N-Gehalt des Lebergewebes zurückzuführen. Dieser wurde zu 200–250, im Mittel zu 220 mg % Rest-N bestimmt. Zwar kann bereits während der kurzen Zeitspanne von 5–10 min, während welcher die frisch hergestellten Schnitte bei 0° C unbewegt im Medium gehalten werden, ein Teil der niedermolekularen N-Verbindungen aus dem Schnitt herausdiffundieren. Die Bilanz zeigt indessen, dass die im Ansatz wiedergefundene Rest-N-Menge nicht viel geringer ist, als dem Rest-N-Gehalt des geschnittenen Gewebes entspricht d.h. 130–160 mg % im Vergleich zum oben erwähnten Wert von 200–250 mg %. Auch wenn die Rest-N-Stoffe nicht bis zum völligen Konzentrationsausgleich aus dem Schnitt heraus diffundieren, lässt sich der bei Versuchsbeginn vorfindende Rest-N im Ansatz allein durch diesen Vorgang erklären. Dass bei den Aminosäuren z.B. bei der Glutaminsäure selbst *in vitro* ein gewisses Konzentrationsgefälle zwischen Zell-innerem und Aussenflüssigkeit bestehen bleiben kann, ist von KREBS und Mitarbeitern<sup>9</sup> gezeigt worden.

Da der Stickstoffverlust während der ersten 15 min (Phase I von ROBINSON<sup>2</sup>) praktisch ausschliesslich durch Ausschwemmungs- und Diffusionsvorgänge zustande kommt, spielt die Behandlung der Gewebsschnitte vom Moment der Schnittherstellung bis zum Einbringen derselben in die Warburg-Gefässe eine ausschlaggebende Rolle. Werden die Schnitte nach dem verbreiteten "nassen" Verfahren hergestellt d.h. nach dem Schneiden in Medium suspendiert, zurechtgeschnitten und erst dann in die Gefässe eingebracht, so ist der Stickstoffverlust relativ gering, weil ein beträchtlicher Teil bereits zuvor herausgelöst worden ist. Bei Anwendung des "trockenen" Verfahrens (FIELD<sup>10</sup>), wie es beim Arbeiten in der feuchten kühlen Kammer der Fall ist, resultiert in der Phase I ein wesentlich grösserer Verlust stickstoffhaltiger Substanzen. Dies daher, weil die in wasserdampfgesättigter Atmosphäre hergestellten Organschnitte vor dem Einbringen in die Gefässe mit keiner Lösung in Berührung kommen. Auf Grund vergleichender Untersuchungen darf die Grösse des in der Temperatúrausgleichsperiode abgegebenen N bei Leberschnitten wie folgt veranschlagt werden: Beim hier geübten klassischen "nassen" Verfahren beträgt er 10–12% N bezogen auf den Total-N des Ansatzes oder 8–10% N  $\times$  6.25 des End-Trockengewichtes der Schnitte; bei in der kühlen, feuchten Kammer hergestellten Schnitten dagegen 18–22% N pro Total-N des Ansatzes oder 16–19% N  $\times$  6.25 des End-Trockengewichtes der Schnitte.

Ein chemisch und morphologisch völlig anderes Bild bietet der während des Versuches selbst auftretende Stickstoff-Verlust (Phase II von ROBINSON). Um dessen Zusammensetzung erfassen zu können, muss von der bei mehrstündigen Versuchen auftretenden Stickstoffabgabe, diejenige der Phase I (15 min) subtrahiert werden. Ueber das Ausmass des N-Verlustes in diesem Versuchsabschnitt entscheidet nicht die Herstellungsweise resp. Vorbehandlung der Schnitte, sondern allein die Qualität des suspendierenden Mediums. Während es durch Verwendung eines quellungsverhindernden Mediums gelingt die N-Abgabe sehr klein zu halten (1–2.5% Total-N pro Stunde), ist dieser bei gequollenen Schnitten recht beträchtlich und kann Werte von 5–10% des Total-N der Schnitte pro Stunde erreichen. Unter beiden extremen Versuchsbedingungen zeigt die Rest-N-Fraktion dieselbe geringgradige Zunahme von  $1-2 \cdot 10^{-3}$  mg Rest-N/mg Trockengewicht Gewebe/h. Dieser Betrag stimmt grössenordnungsmässig mit der von

KREBS<sup>11</sup> beschriebenen "spontanen Amino-N-Bildung" von Rattenleberschnitten überein.

Wird der Eiweissverlust der Leberschnitte nach Abzug des Rest-N unter diesen beiden Bedingungen verglichen, so wird der Unterschied deutlicher und dürfte einem Verhältnis von 1:10–20 entsprechen. Selbst bei einer 5-stündigen Versuchsdauer geben nicht gequollene Leberschnitte, obwohl sie beim Schütteln einer beträchtlichen mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind, eine nur schwer mit Sicherheit erfassbare Eiweissmenge an das suspendierende Medium ab. Proben des suspendierenden Mediums zeigen denn auch bei beliebiger Versuchsdauer dasselbe mikroskopische Bild, wie es oben bereits erwähnt worden ist. Andererseits weisen gequollene Leberschnitte bei längerer Versuchsdauer massive Desintegrationserscheinungen auf, welche durch das — methodisch notwendige — Schütteln der Ansätze noch verstärkt werden. Die Veränderungen der Schnitte sind bereits makroskopisch gut sichtbar, indem sich ihre Farbe von braun bis ins gelbliche aufhellt und die sonst eher matte Oberfläche ein spiegelndes, glasiges Aussehen erhält; die Konsistenz dieser wasserreichen Schnitte ist stark vermindert. Im histologischen Schnittpräparat lassen sich nach Fixierung durch Gefrier-trocknen analoge Veränderungen nachweisen, wie sie auch von OPIE<sup>12</sup> an gequollenen Gewebsschnitten beobachtet worden sind. Im suspendierenden Medium solcher Ansätze sieht man neben Erythrocyten und isolierten intakten Leberzellen, die nicht wesentlich vermehrt sind, zahlreiche Bindegewebsfasern, teilweise mit vereinzelt noch anhaftenden Leberzellen. Unter extremen Bedingungen, wie sie hier absichtlich gewählt worden sind, kann dieser Desintegrationsprozess bei mehrstündiger Versuchsdauer ein groteskes Ausmass erreichen. Bei einer Protein-N-Abgabe von 5–10% N pro Stunde können nach 5 h 30–40%, in extremen Fällen gar bis 50% des im Ansatz vorhandenen N in "Lösung" gegangen sein.

Die Bestimmung des O<sub>2</sub>-Verbrauches der in "Lösung" gegangenen Zellbestandteile kann nach erfolgter Herausnahme der Schnitte aus dem Ansatz ermittelt werden. Dieses Vorgehen ist allerdings auf 1–2-stündige Versuche beschränkt, weil die Beobachtungsdauer nach Entfernung der Schnitte bei den resultierenden geringen Atmungsbeträgen mindestens 2–3 Stunden betragen sollte. Bei Ausdehnung der Messung auf insgesamt über 5 Stunden sind die Ergebnisse nicht mehr zu verwerten, da mit Gewebsschnitten kaum steril gearbeitet werden kann. Unter diesen Voraussetzungen ausgeführte Messungen des O<sub>2</sub>-Verbrauchs zeigen, dass die Atmungsgrösse des an das Medium abgegebenen Materials nur 10–20% derjenigen des Schnittes beträgt; dies selbst dann, wenn beide auf dieselbe Vergleichsbasis ( $N \times 6.25$ ) bezogen werden. Dieser O<sub>2</sub>-Verbrauch ist somit grössenordnungsmässig mit der "innern Atmung" eines stark verdünnten Leberhomogenats vergleichbar.

#### 4. Identifizierung verschiedener Zellbestandteile im suspendierenden Medium

Aus den oben mitgeteilten Befunden geht hervor, dass es unter ungünstigen Versuchsbedingungen (hier: 0.95% NaCl-Lösung) zu einer starken Aufquellung der Leberschnitte kommen kann. Diese hat eine stark beschleunigte Desintegration der Schnitte zur Folge. Wie bereits erwähnt lassen sich im suspendierenden Medium resp. Sediment zwar massenhaft Faserbündel von Bindegewebe erkennen, daneben aber nur relativ wenig intakte Leberzellen. Die noch vorhandenen Parenchymzellen sind — wohl als Zeichen der Quellung — von beinahe kugeliger Gestalt.

Da aus diesem Missverhältnis geschlossen werden musste, dass der Grossteil der

Zellen nicht mehr intakt vorhanden war, wurden Proben von suspendierendem Medium mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht. Dabei haben sich zahlreiche Partikel feststellen lassen, welche als *Mitochondrien* angesprochen werden dürfen. Diese sind ohne Weiteres zur Darstellung zu bringen, indem ein kleiner Tropfen der Suspensionsflüssigkeit direkt auf die Folie aufgetragen und trocknen gelassen wird. Bei vorheriger Fixierung durch Zugabe von gleichen Teilen 2% Osmiumsäure ergeben sich praktisch dieselben Bilder (Fig. 2a). Sie sind mehr oder weniger stark verändert; ihre Form ist eher rund, der Inhalt teilweise oder vollständig entleert, sodass fast nur noch die Membran des Mitochondrions zu sehen ist. Bezüglich Grösse ( $1-2\frac{1}{2}\mu$  Durchmesser) und Membranstruktur sind sie den Mitochondrien aus Rattenmilch ähnlich, welche künstlich durch Suspendieren in Wasser zur Quellung gebracht worden sind (MÜHLETHALER, MÜLLER UND ZOLLINGER<sup>13</sup>). Vergleicht man die aus einem Warburg-Ansatz stammenden Mitochondrien mit solchen aus angereicherten Suspensionen, welche durch Homogenisieren und nachfolgendes fraktioniertes Zentrifugieren gewonnen worden sind, so lässt sich kein grundsätzlicher Unterschied feststellen; ausgenommen die Tatsache, dass letztere bei Suspendierung in isotonischer Mannitlösung z.T. weniger stark gequollen sind (Fig. 2b, c).

Abgesehen von Erythrocyten, Bindegewebsfasern und Mitochondrien sind im suspendierenden Medium, welches hier nur aus gepufferter NaCl-Lösung besteht, keine weiteren corpusculären Bestandteile nachzuweisen.

Die Analyse des kaliumreichen Mediums, welches sich gegenüber dem vorigen durch den Gehalt von 11 mmolar Kalium und von 2 mmolar Calcium auszeichnet, ergibt ein anderes Resultat. Obwohl infolge Ausbleibens einer Quellung das suspendierte Lebergewebe praktisch kaum eine Desintegration erleidet, ist hier ein grösserer Anteil der abgegebenen N-Substanzen morphologisch erfassbar. Neben den bereits oben erwähnten Fasern, Blutzellen und Mitochondrien sind bei gleicher Präparation sehr zahlreiche kleine, rundliche Partikel sichtbar, deren Grösse von  $0.1-0.2\mu$  im Durchmesser derjenigen von *Mikrosomen* entspricht (Fig. 3a, b). Auch diese Partikel haben in unfixiertem Zustand ein ähnliches Aussehen. Sie sind im Vergleich zu denen, welche in einer nicht ausgewaschenen Mitochondriensuspension (in 5.7% Mannit) zu sehen sind, etwas rundlicher und grösser. Bei letzteren ist die Stäbchenform, auf welche bereits HOGEBOOM, SCHNEIDER UND PALADE<sup>14</sup> hingewiesen haben, deutlich zu erkennen (Fig. 3c).

Es muss noch die Frage beantwortet werden, ob es sich bei diesen Partikeln nicht um nachträglich aufgetretene Fällungserscheinungen handeln könnte. Wird zu diesem Zweck eine Probe der vorher erwähnten gepufferten NaCl-Lösung nach beendetem Warburgversuch mit einem gleichen Volumen 0.01 molar  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt, so treten darin keine derartigen Partikel auf. Dies obwohl ein Mehrfaches an desintegriertem Zellmaterial und auch an Calciumionen darin vorhanden ist. Diese Partikel dürfen somit als Mikrosomen angesprochen werden. Es ist bekannt, dass Nucleinsäuren, woraus die Mikrosomen zu einem grossen Teil bestehen, mit NaCl in Lösung gebracht werden können, nicht aber bei Gegenwart selbst geringer Mengen von Calcium-Ionen. Es scheinen hier insofern analoge Verhältnisse vorzuliegen, als die Mikrosomen in Mannit-Lösung oder in einem calciumhaltigen Medium erhalten bleiben, während sie in NaCl-Lösung aufgelöst werden.



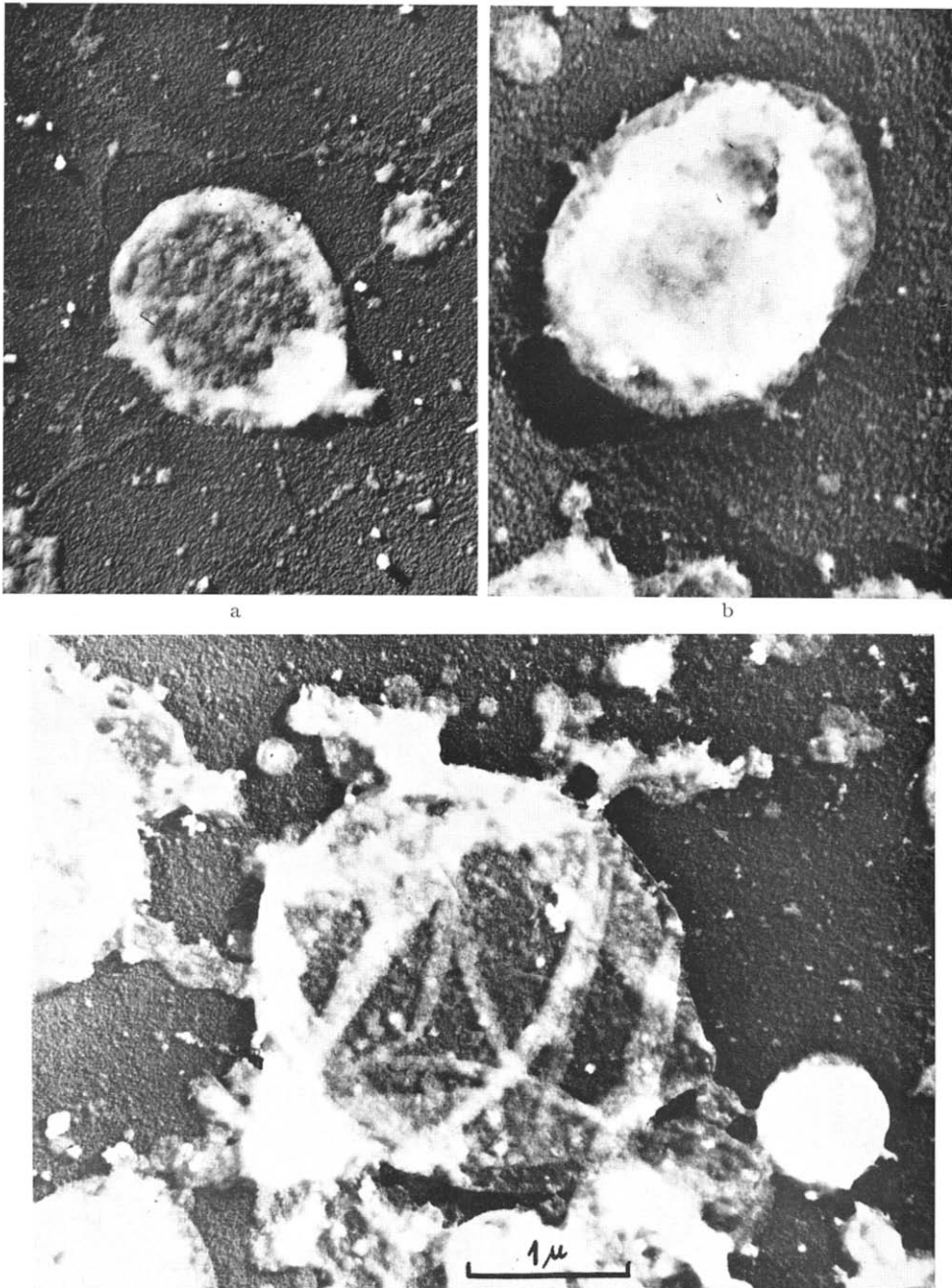


Fig. 2. Elektronenmikroskopische Darstellungen von Mitochondrien aus Zellen der Meerschweinchenleber

- 2a. Mitochondrion aus dem suspendierenden Medium eines Warburg-Versuches (isotonische, gepufferte NaCl-Lösung), fixiert mit 2% Osmiumsäure, 1:10 verdünnt, gewaschen und beschattet (Nr. 239). Vergrößerung bei allen Abbildungen 1:20,000.
- 2b. und 2c. Mitochondrien aus gewaschener Mitochondriensuspension, dargestellt nach LEUTHARDT UND MÜLLER<sup>15</sup>, 1:1000 verdünnt mit isotonischer KCl-Lösung, fixiert mit  $\text{OsO}_4$ , gewaschen und beschattet (Nr. 1004 und 1011).

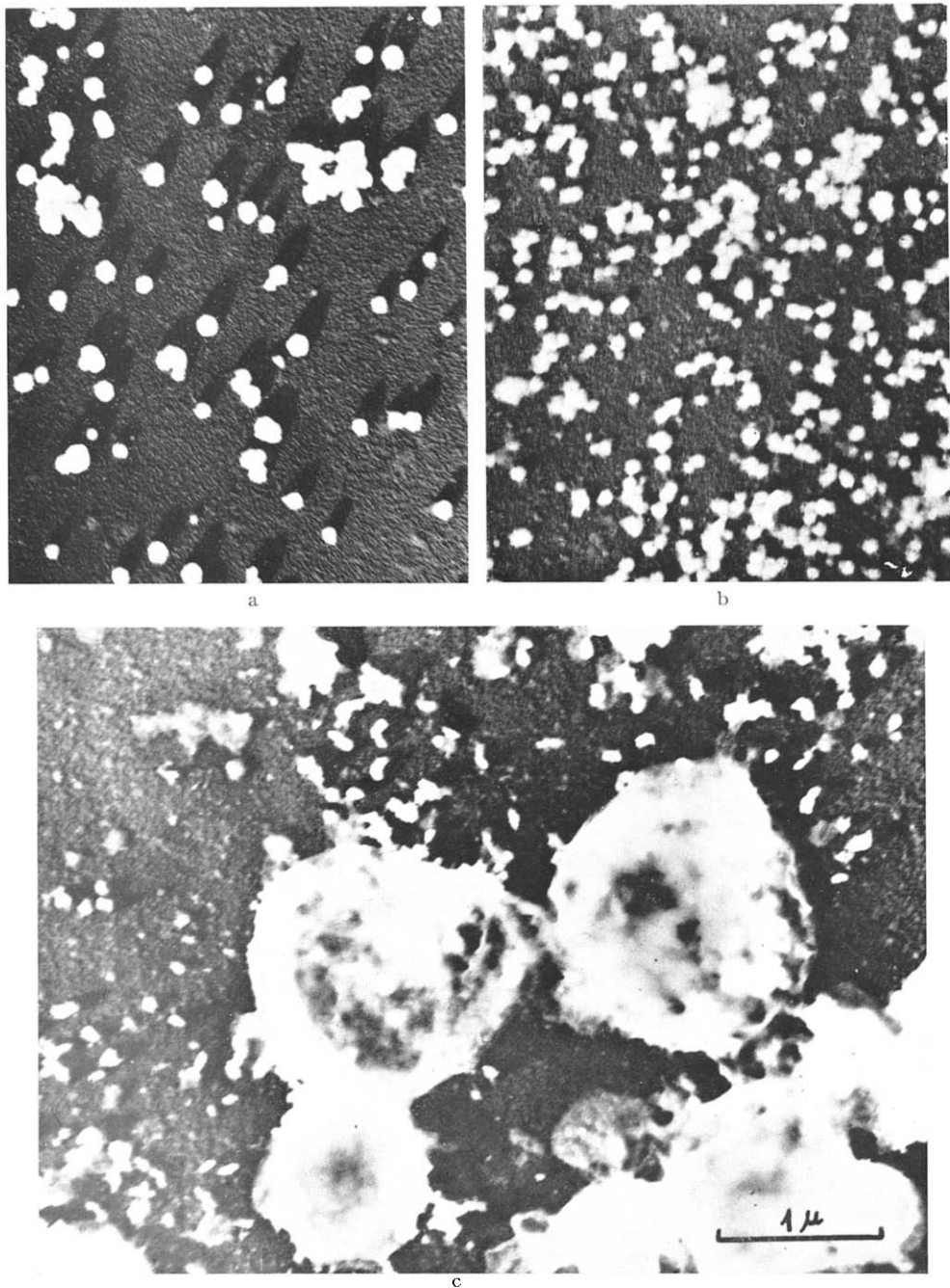


Fig. 3. Elektronenmikroskopische Darstellungen von Mitochondrien und Mikrosomen aus der Meer-schweinchenleber

- 3a. Mikrosomen in einem suspendierenden Medium, enthaltend 10 mmolar K und 2 mmolar Ca, unverdünnt fixiert mit  $\text{OsO}_4$ , gewaschen und beschattet. (Nr. 243) Vergrößerung bei allen Abbildungen 1:20,000.
- 3b. Desgleichen, jedoch unverdünnt, unfixiert, gewaschen und beschattet (Nr. 455).
- 3c. Suspension hergestellt wie bei 2b und 2c. Diese ist hier jedoch nicht ausgewaschen worden und enthält neben Mitochondrien noch Mikrosomen (Nr. 1009).

## DISKUSSION

Der Gesamt-Stickstoff-Verlust, den Gewebsschnitte beim Inkubieren im Warburg-Versuch erleiden, lässt sich zeitlich, morphologisch und chemisch unterteilen. Seine Grösse hängt ab von der Art des Gewebes, der Technik der Schnittherstellung und von den Versuchsbedingungen, insbesondere der Zusammensetzung des suspendierenden Mediums. Die hier ermittelten Werte sind kleiner, als die von CUTTING UND MACCANCE<sup>6</sup>, sowie ROBINSON<sup>2</sup> für Rattennierenschnitte mitgeteilten Grössen. Während bei Leberschnitten selbst in 5 Stunden dauernden Versuchen im kaliumreichen Medium die Grenze von 20% nie überschritten wurde, fanden diese Autoren bei Nierenschnitten selbst unter optimalen Bedingungen Werte von 25% nach 4 Stunden. Trotz dieses — offenbar durch die Gewebsart bedingten — Unterschiedes, lässt sich die von ROBINSON<sup>2</sup> beschriebenen zeitliche Differenzierung auch bei Leberschnitten erkennen. Auf Grund der vorliegenden Resultate können die zwei zu unterscheidenden Phasen folgendermassen charakterisiert werden:

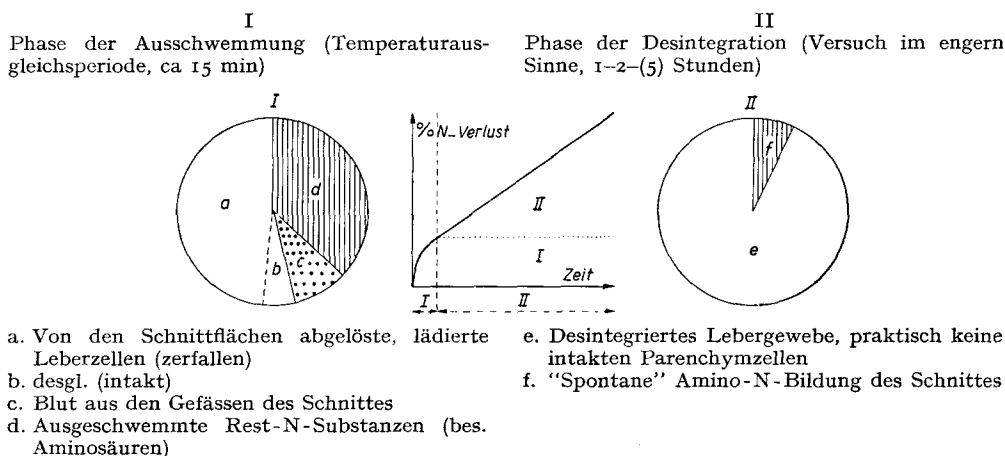


Fig. 4. Zusammensetzung des Stickstoff-Verlustes von überlebenden Leberschnitten während verschiedener Versuchsabschnitte

I: Die *Phase der Ausschwemmung* umfasst die ersten 10–20 Minuten, während welcher der Gewebsschnitt im Warburg-Gefäss geschüttelt wird. In dieser Zeitspanne, die ungefähr der normalerweise 15 min betragenden Temperaturausgleichsperiode gleichzusetzen ist, kommt es zur Ausspülung des Gefässinhaltes in den Schnitten, zur Ablösung laedierter Parenchymzellen, oder kleinerer Gewebsfetzen von der Schnittfläche. Daneben kommt es auf dem Wege der Diffusion zum teilweisen Konzentrationsausgleich des hohen Rest-N-Gehaltes des Lebergewebes mit der Spülflüssigkeit. Welchen Anteil diese einzelnen Vorgänge am Total der N-Abgabe dieser Phase haben, ist in Fig. 4 schematisch dargestellt. Entscheidend für die absolute Grösse der N-Abgabe in der Ausschwemmungsphase sind die Technik der Schnittherstellung, die Schnittdicke und die Art des Gewebes. Sie schwankt für 0.4 mm dicke Leberschnitte (Meerschweinchen) je nach Technik zwischen 10–18% und ist unter konstanten Versuchsbedingungen stets etwa gleich gross.

Literatur S. 456.

II: Die *Phase der Desintegration* schliesst ohne scharfe Grenze an die vorherige an und umfasst näherungsweise den Zeitintervall, während welchem die Atmung (usw.) gemessen wird. Sofern das überlebende Gewebe unter günstigen Versuchsbedingungen gehalten wird, kann es auf Grund aktiver osmotischer Regulationsmechanismen den Quellungsgrad resp. den Wassergehalt, den es *in vivo* hat, beibehalten. Trifft dies zu, ist die N-Abgabe in dieser Phase infolge der mechanischen Widerstandsfähigkeit des Gewebes sehr klein, d.h. nicht über 1–2 % N pro Stunde. Die N-Abgabe setzt sich in diesem Falle aus der geringfügigen Desintegration von Zellen und der ebenfalls kleinen Amino-N-Bildung zusammen, deren Anteil bereits bei mässiger Desintegration unbedeutend wird. Je nach Versuchsdauer und Beschaffenheit des Mediums kann dieser Desintegrationsprozess jedes mögliche Ausmass erreichen. In diesem Sinne kann die N-Abgabe in der zweiten Phase des Versuches gleich wie die Kontrolle des Wassergehaltes der Schnitte als Qualitäts-Test herangezogen werden. Da die beschleunigte Desintegration offenbar eine direkte Folge des Quellungsvorganges ist, besagen beide Tests dasselbe (AEBI<sup>3</sup>).

Die Unterteilung des N-Verlustes in der Ausschwemmungsphase kann auch Aufschluss darüber geben, mit welchem Prozentsatz an laedierten Leberzellen in einem Gewebsschnitt von bestimmter Dicke grössenordnungsmässig zu rechnen ist. In der Phase I werden von 0.3–0.4 mm dicken Leberschnitten bei "nasser" Herstellung (vgl. <sup>7</sup>) ca 3 % N als Rest-N, 1 % als Protein-N aus dem Blut und ca 6 % als Protein-N aus dem Gewebe des Schnittes abgegeben. Bei "trockener" Herstellung (vgl. <sup>10</sup>) dagegen ca 6 % N als Rest-N, 3 % als Protein-N aus dem Blut und 8–10 % als Protein-N aus dem Gewebsteil des Schnittes. Da sich unter optimalen Versuchsbedingungen praktisch keine intakten Zellen vom Schnitt ablösen, darf angenommen werden, dass beim Schneiden des Gewebes ca 8–10 % aller Zellen des Schnittes ( $d = 0.4$  mm) laediert sind und in der Folge abgelöst werden. Dieser Wert entspricht einer Randzone an der Schnittfläche von beiderseits 5 % der gesamten Schnittdicke, d.h. von etwa  $0.05 \times 400 = 20 \mu$  Dicke. Etwa denselben Durchmesser weisen die Leberzellen des Meerschweinchens auf. Dies berechtigt zur Annahme, dass bei der Schnittherstellung die direkt angeschnittenen Zellen, sowie teilweise die daran angrenzende Zellschicht laediert werden. Die restlichen Zellen dürften unversehrt sein.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sei versucht die Frage zu beantworten, worauf der gemessene Gaswechsel eines Schnittes am zweckmässigsten bezogen werden soll. Da das im Medium suspendierte desintegrierte N-Material 5–10 mal kleinere  $Q_{O_2}$  Werte aufweist als der Schnitt, ist sein absoluter Anteil an der gemessenen Atmung sehr klein. Er beträgt approximativ einige Prozent des totalen  $O_2$ -Verbrauchs. Korrekterweise sollte daher eine Bezugsbasis gewählt werden, in welcher der N-Verlust der Phase I nicht eingeschlossen ist. Dieser Forderung kommt das End-Trockengewicht oder der N-Gehalt der Schnitte am nächsten. Wird das oft verwendete Anfangs-Feuchtgewicht resp. Trockengewicht als Basis genommen, weil es am einfachsten zu bestimmen ist, so ergeben sich infolge der Miteinbeziehung dieses inaktiven Materials etwas geringere Werte. Diese systematische Abweichung ist dann belanglos, wenn sich die Grösse des Stickstoff-Verlustes in engen Grenzen bewegt. Beim Auftreten einer beträchtlichen Desintegration der Schnitte vermag hingegen keines der beiden Verfahren das Geschehen richtig wiederzugeben, weil die Menge des aktiven Gewebes während des Versuches abnimmt. Wird das Anfangsfeuchtgewicht als Basis genommen, so ergeben sich zu niedrige Werte; bei Verwendung des End-Trockengewichtes sind die Werte zu hoch.

Solange die Schnitte nicht quellen und desintegrieren sind alle vorgeschlagenen Bezugsgrößen brauchbar; beim Auftreten einer erhöhten Desintegration sind alle problematisch, wie der Versuch an und für sich überhaupt. Als abschreckendes Beispiel dafür sollen die hier angeführten Versuche mit gepufferter NaCl-Lösung dienen.

Die grosse Bedeutung welche der Beschaffenheit des Ionenmilieus beizumessen ist, geht aus den hier mitgeteilten morphologischen und chemischen Unterschieden erneut hervor. Sie sind ein Ausdruck dafür, dass Quellungsgrad und Desintegration der Gewebsschnitte von den Milieubedingungen abhängen. Beide sind gleichsam ein Indikator für den Zustand der überlebenden Gewebsschnitte. Sie beantworten die Frage, ob diese in der Lage sind den Wassergehalt, den sie *in vivo* aufweisen, *in vitro* aufrecht zu erhalten. Der dafür verantwortliche osmotische Regulationsmechanismus der Zelle darf als eine der auffälligsten und wichtigsten Leistungen von überlebendem Gewebe betrachtet werden, dessen Funktionieren oder Versagen auf die Qualität der Versuchsbedingungen schliessen lässt.

Herrn Prof. I. ABELIN danke ich für sein Wohlwollen und Interesse, welches er diesen Untersuchungen entgegengebracht hat.

Herr Prof. F. E. LEHMANN ist mir bei der Ausführung der elektronen-mikroskopischen Arbeiten, sowie bei der Abfassung des Manuskriptes mit Rat und Kritik zur Seite gestanden, wofür ihm ebenfalls herzlich gedankt sei.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird der "Stickstoff-Verlust" von überlebenden Leberschnitten (Meerschweinchen), welcher im Warburg-Versuch an das suspendierende Medium abgegeben wird, nach chemischen, morphologischen und zeitlichen Gesichtspunkten analysiert.

2. Der in den ersten 15 Minuten (= Phase der Ausschwemmung) abgegebene Stickstoff beträgt je nach Technik 8–18% des im Ansatz vorhandenen Total-N. Er ist methodisch bedingt und daher unvermeidbar. Der während der restlichen Versuchsdauer (= Phase der Desintegration) verlorene N (praktisch alles Eiweiss) hängt neben der Versuchsdauer vor allem von der Beschaffenheit des Mediums ab. Er ist bei nicht gequollenen Schnitten sehr klein, bei gequollenen Schnitten beträchtlich (30–40% des im Ansatz vorhandenen Total-N).

3. Die Grösse des erlittenen Stickstoff-Verlustes, welcher wie der Quellungsgrad der Schnitte vom Funktionieren der aktiven Osmo-Regulation der Zellen abhängt, darf daher als Test für die Qualität der Versuchsbedingungen verwendet werden.

4. Die bei der Desintegration der Leberzellen freigesetzten Zellbestandteile bleiben unter geeigneten Bedingungen erhalten und können als solche (Mitochondrien, Mikrosomen) im suspendierenden Medium unter Zuhilfenahme des Elektronenmikroskopes nachgewiesen werden.

#### SUMMARY

1. The "loss of nitrogen" of surviving liver slices (guinea-pig), *i.e.* the quantity of nitrogen, which is given off by the sliced tissue to the suspending medium, is analysed with respect to its time course and to its morphological and chemical aspects.

2. The quantity of nitrogen lost during the first 15 min (suspension phase) corresponds, according to the technique, to 8–18% of the total nitrogen content. This loss is due to the method and is, consequently, inevitable. The nitrogen lost during the remainder of the experiment (disintegration phase) depends on the duration of the experiment and above all on the nature of the medium. It is a minimum for not swollen slices, but is considerable for swollen ones (30–40% of total nitrogen).

3. The magnitude of the loss of nitrogen, which depends on the functioning of the active osmoregulation of the cells, as well as on the degree of swelling of the slices, permits conclusions concerning the quality of experimental conditions.

4. The particules liberated during the disintegration of the cells (mitochondria, microsomes) are maintained under favourable conditions and can be demonstrated in the suspending medium with the aid of the electron microscope.

*Literatur S. 456.*

## RÉSUMÉ

1. La "perte d'azote" de coupes de foie en survie (cobaye), soit la quantité d'azote que dans l'expérience de Warburg ces coupes fournissent au milieu dans lequel elles sont suspendues, est analysée aux points de vue chimique et morphologique. Sa progression est suivie au cours du temps.

2. La quantité d'azote perdue pendant les premières 15 min (phase de suspension) correspond avec la technique employée à 8-18 % de la teneur totale en azote. Cette perte est due à la méthode et, par conséquent, inévitable. L'azote perdu pendant le reste de l'expérience (phase de désintégration) dépend de la durée de celle-ci et avant tout de la nature du milieu. Elle est minime pour les coupes non gonflées, mais considérable pour les coupes gonflées (30-40 % de l'azote total).

3. La grandeur de la perte d'azote qui dépend, de même que le degré de gonflement des coupes, du fonctionnement du mécanisme régulateur osmotique actif des cellules, permet de tirer des conclusions au sujet de la qualité des conditions expérimentales.

4. Les particules libérées lors de la désintégration des cellules (mitochondries, microsomes) sont conservées dans des conditions favorables et peuvent être mises en évidence dans le milieu de suspension à l'aide du microscope électronique.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> C. O. WARREN, *Am. J. Physiol.*, 128 (1939) 455.
- <sup>2</sup> J. R. ROBINSON, *Biochem. J.*, 45 (1949) 68.
- <sup>3</sup> H. AEBI, *Helv. Physiol. Acta*, 8 (1950) 525.
- <sup>4</sup> W. M. SPERRY UND C. F. BRAND, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 42 (1939) 147.
- <sup>5</sup> K. A. C. ELLIOTT, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 63 (1946) 234.
- <sup>6</sup> M. CUTTING UND R. A. MACCANCE, *J. Physiol.*, 104 (1946) 288; 105 (1946) 205; 106 (1947) 405.
- <sup>7</sup> W. DEUTSCH, *J. Physiol.*, 87 (1936) 56P.
- <sup>8</sup> J. R. ROBINSON, *Proc. Roy. Soc. B. London*, 137 (1950) 378.
- <sup>9</sup> J. R. STERN, L. V. EGGLESTON, R. HEMS UND H. A. KREBS, *Biochem. J.*, 44 (1949) 410.
- <sup>10</sup> J. FIELD, *Methods in Medical Research*, Yearbook Publishers Co. Chicago, 1948, page 289.
- <sup>11</sup> H. A. KREBS, *Z. physiol. Chem.*, 217 (1933) 191.
- <sup>12</sup> E. L. OPIE, *J. Exptl. Med.*, 87 (1948) 425.
- <sup>13</sup> K. MÜHLETHALER, A. F. MÜLLER UND H. U. ZOLLINGER, *Experientia*, 6 (1950) 16.
- <sup>14</sup> G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER UND G. E. PALADE, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 619.
- <sup>15</sup> F. LEUTHARDT UND A. F. MÜLLER, *Experientia*, 4 (1948) 478.

Eingegangen am 3 März 1952