

Über Beeinflussung der Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen an roten Blutkörperchen.¹⁾

Von
Otto Warburg.

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Oktober 1910.)

Aus Versuchen am Seeigelei²⁾ ergab sich, daß Substanzen, die nicht eindringen, die Oxydationen sehr erheblich beeinflussen können: dadurch wurde die Aufmerksamkeit auf eine merkwürdige Beziehung gelenkt, die zwischen der Plasmahaut und den chemischen Vorgängen in der Zelle bestehen muß. Die Plasmahaut besteht nun, nach eingehenden Untersuchungen Overtons,³⁾ aus lipoiden (fettähnlichen) Stoffen und so war zu erwarten, daß bei Versuchen, die Oxydationen zu beeinflussen, die Zustandsänderung der Lipoide eine besonders wichtige Rolle spielen würde.

Wenn man zu Blut Methylurethan zusetzt, so dringt diese Substanz schnell in die Zellen ein und verteilt sich hier nach Maßgabe ihres Teilungskoeffizienten in den verschiedenen Phasen. Im Gleichgewicht wird die Konzentration in der wässerigen Phase groß sein im Vergleich zu der in der lipoiden Phase. Umgekehrt werden die Verhältnisse liegen beim Phenylurethan, das in Öl sehr leicht, in Wasser sehr schwer löslich ist. Wir wollen annehmen, das Teilungsverhältnis zwischen Öl und Wasser wäre für die Phenylverbindung a mal so groß als für die Methylverbindung; dann wird man dem die Zelle umspülenden wässerigen Medium a mal mehr Methyl- als Phenylurethan zufügen müssen, um die Konzentrationen der beiden Stoffe in den Zell-Lipoiden gleich zu machen. Wenn es nun im

¹⁾ Die Resultate dieser Arbeit wurden im September auf dem internationalen Physiologenkongreß in Wien mitgeteilt.

²⁾ O. Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. LXVI, S. 305.

³⁾ E. Overton, «Über den Mechanismus der Resorption und der Sekretion» in Nagels Handbuch der Physiologie.

wesentlichen auf die Konzentration in den Lipoiden ankommt, so werden die Stoffe in um so kleineren Mengen dem umspülenden Medium zugefügt werden müssen, je größer ihr Teilungsverhältnis zwischen Öl und Wasser ist; mit anderen Worten, die Wirkungsstärke wird der von Hans Meyer¹⁾ und Overton²⁾ aufgedeckten Gesetzmäßigkeit folgen. Das ist nun in der Tat für die Oxydationsprozesse der Fall.

Die Versuche wurden mit Gänseerythrocyten ausgeführt, die, wie ich vor einiger Zeit mitteilte,³⁾ eine ziemlich erhebliche und leicht meßbare Sauerstoffatmung haben. Die Suspensionsflüssigkeit war eine isotone NaCl- oder Lockesche Lösung, der die zu prüfende Substanz zugefügt war. In der folgenden Tabelle sind die Konzentrationen verzeichnet, die eine annähernd gleiche Beeinflussung der Oxydationen (Herabsetzung auf $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$) bewirken. Daneben stehen die Löslichkeiten in Öl resp. Wasser nach Overton oder Hans Meyer. (Methodik siehe unter Versuchen A.)

Alkohole.

	Menge in Gewichtsprozenten	Löslichkeit in Wasser und Öl nach Overton ⁴⁾
Methyl	mehr als 16	Wasser: ∞ . In mehr als 50 Öl
Äthyl	7,3	Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}} = \frac{1}{30}$
Propyl (iso)	4,8	—
Butyl (n)	1,1	12 Vol. Wasser. In Öl: ∞
Butyl (iso)	1,1	Löslich in 10 Teilen Wasser
Amyl (Gärung)	0,4	Wasser: 2%. Öl: ∞
Amyl (Dimethyl- äthylcarbinol)	1,6	In 8 Teilen Wasser. Öl: ∞

¹⁾ Hans Meyer, Schmiedebergs Archiv, Bd. XLII, S. 109, und Baum, Bd. XLII, S. 119, Bd. XLVI, S. 338.

²⁾ Overton, Studien über die Narkose, Jena 1901.

³⁾ O. Warburg, Zur Biologie der roten Blutzellen. Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 112.

⁴⁾ loc. cit.

Urethane.

	Menge in Gewichtsprozenten	Löslichkeit in Wasser und Öl
Methyl	10	Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$: 0,04 (H. Meyer ¹))
Äthyl	3	Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$: 0,14 (H. Meyer ¹))
Propyl	1—1,5	—
Isobutyl	0,5	—
Phenyl	0,05	Löslich in 720 Teilen Wasser; in 3,5—4 Teilen Öl (Overton ²))

Die Hemmung war in den untersuchten Fällen mit Ausnahme von Methylurethan reversibel, d. h. der Sauerstoffverbrauch steigt nach Entfernung der hemmenden Substanz wieder zu der durch die Kontrolle gegebenen Höhe.³) (Versuche A).

Fassen wir als Beispiel den Unterschied zwischen Methyl- und Phenylurethan ins Auge. Eine 0,05%ige Phenylurethanlösung wirkt ebenso stark auf die Oxydationen wie eine 10%ige Methylurethanlösung. Die molekularen Konzentrationen dieser Stoffe in der wässrigen Phase der Zelle differieren unter diesen Bedingungen um das 360fache.

Das allgemeine Resultat ist also, daß der Zustand einer lipoiden Phase mehr als der Zustand der wässrigen Phase diejenigen chemischen Prozesse beeinflusst, die der Sauerstoffatmung zugrunde liegen; da sich die Oxydationen von der lipoiden Plasmahaut beeinflussen ließen, so liegt für mich die Vermutung sehr nahe, daß es sich um die Lipide der Plasmahaut handelt.

Es ist bekannt, daß eine Anzahl Autoren die Ursache oder eine Ursache der Narkose in der Hemmung der Oxy-

¹) loc. cit.

²) loc. cit.

³) oder sogar vielleicht darüber hinaus; ob hier, wie beim Seeigelei, eine Erregung vorliegt, soll untersucht werden.

dationsprozesse sehen; da nun die narkotische Wirkungsstärke mit dem Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ wächst, so würden meine Resultate wie eine Bestätigung dieser Theorie aussehen. Ich glaube aber aus Versuchen über die Phenylurethannarkose des Seeigeleies¹⁾ schließen zu dürfen, daß allgemein ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Oxydationen und Narkose nicht besteht. Zweifellos ist in den interessanten Versuchen Verworn's²⁾ und seiner Schule die Sauerstoffaufnahme des Nerven behindert; es ist aber nicht dargetan, daß die verminderte Sauerstoffaufnahme die Ursache der Narkose ist, sondern es könnte sich um zwei Beeinflussungen handeln, die unabhängig von einander sind. Wenn man bedenkt, wie langsam der Nerv seine Erregbarkeit in relativ starken Blausäurelösungen verliert³⁾ und wie schnell die Narkose in Äther oder Amylalkohol einsetzt, so stößt die chemische Theorie doch auch beim Nerven auf schwerwiegende Hindernisse.

Weiterhin wären die Resultate der Tabelle nicht merkwürdig, wenn sich die ganze Zelle als Lösungsmittel wie eine lipoider Phase verhielte: sie würden dann nichts weiter aussagen, als daß eine Substanz um so wirksamer ist, je mehr von ihr in die Zelle hineinkommt. Ich habe deshalb untersucht, wie sich die roten Blutkörperchen als Lösungsmittel verhalten, und zwar durch Messungen über die Verteilung von Aceton. Es ergab sich, daß sie sich mehr wie eine wässrige als wie eine lipoider Phase verhalten (Versuch B).

Phenylurethan dringt nach Overton⁴⁾ schneller in die Zellen ein als Methylurethan; auch so wäre es möglich, daß von der Phenylverbindung einfach mehr in die Zelle kommt,

¹⁾ loc. cit.

²⁾ Zeitschrift für allgemeine Physiologie, Bd. I und II (besonders Fröhlich und Winterstein). Verworn, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 37.

³⁾ Dontas, Schmiedebergs Archiv, Bd. LIX, S. 430. Es handelt sich hier um Konzentrationen, die weit über der für Zellen oxydationshemmenden liegen.

⁴⁾ loc. cit.

als von der Methylverbindung; ich brauche aber wohl kaum zu erwähnen, daß es sich in meinen Versuchen um Gleichgewichtszustände handelt.¹⁾

Versuche.

A.

Für alle Experimente wurde Gänseblut benutzt. Die Atmung wächst sehr erheblich nach Blutentziehungen, worüber Herr Dr. Onaka ausführlicher berichten wird. Das Blut wurde zentrifugiert in isotonischer²⁾ Kochsalzlösung oder einer Art Lockescher Flüssigkeit von folgender Zusammensetzung:

pro Liter: NaCl	7,2 g
NaHCO ₃	1,0 g
KCl	0,3 g
CaCl ₂	0,3 g (wasserfrei)
Traubenzucker	5,0 g

(im folgenden als Lockesche Lösung bezeichnet).

Nach Entfernung des Serums wurde etwa 10 Minuten an der Luft geschüttelt, um das Hämoglobin in Oxyhämoglobin überzuführen. Von dem so erhaltenen Blutkörperchenbrei verteilt man gleiche Mengen, in meinen Versuchen etwa 2 ccm in die verschiedenen zu vergleichenden Lösungen und wäscht mit den Lösungen mehr oder weniger oft. Die Alkohole und Urethane waren immer in 0,92% iger NaCl-Lösung oder der Lockeschen Flüssigkeit gelöst. Nach dem Waschen füllt man die Blutkörperchen quantitativ in kleine Röhrchen, die etwa 3,1 ccm fassen, und verschließt luftdicht. In den kleinen Gläschen ist eine Glasperle, damit die Zellen gleichmäßig verteilt werden können. Wenn die Erythrocyten nun atmen, so verbrauchen sie den Sauerstoff, von dem sie gewissermaßen ein Reservoir in Form von Oxyhämoglobin bei sich führen, und es entsteht Hämoglobin. Das Hämoglobin ist viel dunkler als das Oxy-

¹⁾ Ein weiterer, sehr unwahrscheinlicher Einwand wäre, daß die zugefügten Substanzen nur die Sauerstoffabgabe aus dem Hämoglobin in der Zelle verhinderten; er wurde dadurch widerlegt, daß Wasserstoff aus den Lösungen, die die Atmung hemmen, den Sauerstoff austreibt.

²⁾ Isotonisch ist nach meinen Gefrierpunktsbestimmungen eine 0,92% ige NaCl-Lösung.

hämoglobin und es läßt sich die mehr oder minder starke Atmung schon an der zunehmenden Dunkelfärbung des Gläschens erkennen. Es wurden nun immer Serien von Konzentrationen des zu prüfenden Stoffes angesetzt in den beschriebenen kleinen Röhren und beobachtet, bei welcher Konzentration ein deutlicher Farbenunterschied gegenüber der Kontrolle in NaCl oder Lockescher Flüssigkeit zu konstatieren war. Durch Einengen der Konzentrationen in mehreren Versuchen kommt man, wie die quantitativen Bestimmungen später ergaben, zu sehr brauchbaren Resultaten. Alle Zahlen der Tabelle wurden auf diese Weise erhalten. Geprüft wurden sie für die Reihe der Urethane durch Messungen des Sauerstoffverbrauchs, ohne daß an ihnen dadurch etwas geändert werden mußte.

Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs. Es handelte sich darum, in den beschriebenen kleinen Gläsern die Menge des vor und nach der Atmung vorhandenen Hämoglobins zu bestimmen. Zu dem Zweck benutzte ich den schönen Blutgasapparat von Haldane-Barcroft, der im wesentlichen aus einer verschließbaren Flasche von 30 bis 40 ccm Inhalt besteht, die mit einem kleinen Wassermanometer verbunden ist. Ich entwickelte aber nicht, wie die englischen Forscher, den Sauerstoff aus dem Oxyhämoglobin mit Ferricyankalium, sondern bestimmte, aus der Druckabnahme am Manometer, wieviel Sauerstoff von dem Blut beim Schütteln aufgenommen wird, also das reduzierte Hämoglobin. Es wurde unter 3 ccm Ammoniakaponinlösung (nach Krogh 1 g Saponin, 1 ccm konzentrierter NH_3 , 500 ccm Wasser) 1,8 ccm der Blutsuspension geschichtet; nach eingetretenem Temperaturgleichgewicht der Hahn geschlossen und geschüttelt, bis das immer auf die gleiche Marke eingestellte Manometer sich nicht mehr änderte. Dies ist sehr bald, ebenso schnell wie bei der Ferrocyanidmethode, erreicht. Die Temperaturkontrolle sollte sich bei guten Versuchen nicht ändern. Man liest dann die Temperatur und die Druckverminderung ab und kann daraus leicht den verbrauchten Sauerstoff berechnen.¹⁾

¹⁾ Nach der Formel $v_0 = \frac{p \cdot v}{p_0(1 + \alpha t)}$, worin p die Druckvermin-

Um eine bessere Beurteilung meiner Versuche zu ermöglichen, habe ich gar nichts umgerechnet, sondern gebe einfach die Druckverminderung in Millimetern Wasser. Da die Flaschen, in denen diese Druckverminderung auftrat, für die hier in Betracht kommenden Werte gleichgroß waren (ihr Volumen betrug etwa 32 ccm nach Abzug der eingefüllten Flüssigkeit: Blut, NH_3), so stehen die am Wassermanometer abgelesenen Druckverminderungen verschiedener Blutproben direkt im Verhältnis ihres Sauerstoffverbrauchs. Das maximal gesättigte Blut gibt nach dieser Methode am Manometer keinen die Fehlergrenzen überschreitenden Ausschlag. Die Fehler sind etwa 2 mm Wasser.

Die Athmungsversuche wurden bei 29° vorgenommen, weil manche Substanzen bei 40° schon giftig wirken. Die Gläschen blieben bei dieser Temperatur 1 bis $2\frac{1}{2}$ Stunden. Die Zeit muß sich nach der Intensität des Stoffwechsels des betreffenden Materials richten, unter anderm, damit der Sauerstoffdruck nicht zu sehr abnimmt und der Kohlensäuredruck nicht zu sehr zunimmt; selbstverständlich darf man für Vergleichsversuche keine Beeinträchtigung durch diese Faktoren bekommen. Die Suspensionen, die ich verwendete, sollten nicht mehr als 50 mm Wasser ($T. = \text{ca. } 18^\circ$) Druckverminderung zeigen, wenn 1,8 ccm zur Sauerstoffbestimmung verwendet wurden. Meine Suspensionen waren so dicht, daß 1,8 ccm, bei stickstofffreier Snsensionsflüssigkeit, etwa 35 ccm $n_{10}\text{-NH}_3$ bei der Veraschung nach Kjeldahl lieferten.

Sollte untersucht werden, ob die Beeinflussung der Oxydationen reversibel ist, so wurde jede Probe doppelt angesetzt, also z. B. je 2 Gläschen in Methylurethan und je 2 in Lockescher Flüssigkeit. Nach einiger Zeit wurde dann in je einem Gläschen der verbrauchte Sauerstoff bestimmt. Der Inhalt der beiden andern wurde 3mal gründlich mit Lockescher Flüssigkeit gewaschen, maximal mit Sauerstoff gesättigt und die gleiche Zeit wie die beiden ersten Gläschen bei derselben Temperatur

derung ist, p_0 der Atmosphären-Normaldruck in Millimeter Wasser, v das Volumen der Flasche + Kapillare — Volumen der eingefüllten Flüssigkeit, t die Versuchstemperatur.

Temperatur während der Atmung 29°.

Substanzen		Zeit in Min.	Druck- verminderung I	Druck- verminderung II	
Methyl- urethan	1	10 % in Locke	70	23 (t = 16)	—
		8 % » »	70	33 »	—
		Kontrolle » »	70	43 »	—
	2	10 % in Locke	100	25 (t = 18)	18 (t = 18)
		Kontrolle » »	100	48 »	50 »
	Äthyl- urethan	1	3 % in NaCl	150	35 (t = 16)
2 % » »			150	50 »	—
Kontrolle » »			150	60 »	—
2		3 % in Locke	80	37 (t = 15)	54 (t = 15)
		Kontrolle » »	80	54 »	55 »
Propyl- urethan		1	2 % in NaCl	150	7 (t = 16)
	1,5 % » »		150	12 »	—
	Kontrolle » »		150	29 »	—
	2	1,5 % in Locke	95	12 (t = 16)	64 (t = 16)
		Kontrolle » »	95	50 »	54 »
	Butyl- urethan (iso)	1	0,7 % in NaCl	120	8 (t = 16)
0,5 % » »			120	18 »	—
Kontrolle » »			120	32 »	—
2		0,7 % in NaCl	135	8 (t = 16)	29 (t = 16)
		Kontrolle » »	135	32 »	22 »
Phenyl- urethan		1	0,1 % in NaCl	150	7 (t = 16)
	0,05 % » »		150	12 »	—
	Kontrolle » »		150	28 »	—
	2	0,05 % in Locke	95	10 (t = 14)	24 (t = 14)
		Kontrolle » »	95	28 »	25 »
	Äthyl- alkohol		12 ccm + 100 ccm Locke	60	—
		Kontrolle in Locke	60	—	42 »
Amyl- alkohol		0,5 ccm + 100 ccm Locke	100	—	48 (t = 18)
		Kontrolle in Locke	100	—	53 »

gelassen, und dann ihr Sauerstoffverbrauch bestimmt. Hieraus ersieht man also gleichzeitig, nämlich aus der Kontrolle, inwieweit die Suspensionsflüssigkeit schädigt.

Die Druckverminderungen in Millimetern Wasser, die unter den angeführten Bedingungen erhalten wurden, sind in der Tabelle zusammengestellt: unter I die Versuche in dem Urethan mit Kontrolle in der Suspensionsflüssigkeit ohne Urethan; aus II ist zu ersehen, ob die Beeinflussung der Oxydationen reversibel ist; hier stehen die Druckverminderungen, die, wie oben beschrieben, nach Entfernen der in I verwendeten Suspensionsflüssigkeiten erhalten wurden, I und II beziehen sich auf gleiche Zeiten:

Die durch einen Strich umrandeten Zahlen gehören immer zu einem Versuch. Liest man von oben nach unten, so ergibt sich die Beeinflussung durch die betreffende Substanz; liest man von links nach rechts, so erkennt man, inwieweit die Beeinflussung reversibel ist. t in Klammern hinter den Druckzahlen bedeutet die Temperatur bei der Sauerstoffbestimmung.

Es ist noch zu bemerken, daß manche Urethane von Kahlbaum eine ganz erhebliche Dampfspannung zeigen, was von Verunreinigungen mit Spuren von Lösungsmitteln herrührt. Solche Präparate sind am besten aus Wasser umzukristallisieren.

B. Verteilung von Aceton zwischen einer Salzlösung und den roten Blutkörperchen.

Aceton dringt schnell in lebende Zellen ein. Mischt man einen Blutkörperchenbrei mit isotoner Salzlösung, der eine bekannte Menge Aceton zugefügt ist, zentrifugiert nach einiger Zeit und bestimmt das Aceton in der überstehenden Flüssigkeit, so findet man, daß viel Aceton eingedrungen ist; jedoch nicht soviel, als wenn man die Acetonlösung mit einer wässrigen Lösung vermischt hätte. Das Aceton verteilt sich also nicht gleichmäßig auf Wasser und Blutkörperchen.

Die Löslichkeitsbeeinflussungen durch gequollene Eiweißkörper usw. sind zu wenig bekannt, als daß man aus den Acetonbestimmungen direkt berechnen könnte, der wievielte Teil der Zelle wässriger und der wievielte lipoider Natur ist.

Wohl aber kann man die Frage so stellen: Verhält sich die Zelle mehr wie eine wässrige oder mehr wie eine lipoide Phase? Nur hierauf kam es in dem Zusammenhang mit den Stoffwechselversuchen an.

Wenn man Aceton in Wasser löst und diese Flüssigkeit mit Öl schüttelt, so geht relativ wenig Aceton in das Öl; das Teilungsverhältnis $\frac{\text{Konzentration in Öl}}{\text{Konzentration in Wasser}}$ ist nach Hans Meyer¹⁾ bei 20° 0,2.

Für Verteilungsversuche ist eine genaue Kenntnis des Blutkörperchenvolumens nötig; dies bestimmte ich sehr einfach, indem ich die Blutkörperchen in einer isotonen NaCl-Lösung mehrmals wusch; 5 ccm des Blutkörperchenbreis in der NaCl-Lösung von bekanntem Chlortiter wurden mit 5 ccm einer isotonen Na₂SO₄-Lösung vermischt; dann wurde zentrifugiert und in 5 ccm der überstehenden Flüssigkeit wieder das Chlor titriert (immer mit ⁿ/₁₀-AgNO₃ und Chromat als Indikator). Bedingung für dies Verfahren ist, daß in einer Na₂SO₄-Lösung kein Chlor aus den Blutkörperchen austritt. Wäscht man mit Na₂SO₄, bis die Cl-Reaktion verschwunden ist, so findet man in der Tat nach Stunden noch kein Chlor in der Suspensionflüssigkeit.

Das Aceton wurde jodometrisch nach Messinger in der von Embden²⁾ beschriebenen Form bestimmt.

Beispiel: Gänseblutkörperchen wurden mehrmals in einer isotonen NaCl-Lösung gewaschen. 5 ccm der NaCl-Lösung verbrauchten 7,9 ccm ⁿ/₁₀-AgNO₃. Von dem gewaschenen Blutkörperchenbrei wurden je 5 ccm in 2 Zentrifugiergläser (mit eingeschliffenem Stopfen) verteilt. In das eine Glas wurden 5 ccm einer isotonen (1,76%igen) Na₂SO₄-Lösung zugefügt, in das andere 5 ccm einer Acetonlösung (in 0,92% NaCl, die nach Messinger 29,3 ccm Jodlösung verbrauchte. Nun wurde umgeschüttelt und nach 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem einen Glas wurden 5 ccm zur Cl-Bestimmung, aus dem andern 5 ccm zur Acetonbestimmung entnommen. Sie verbrauchten:

¹⁾ Schmiedebergs Archiv, Bd. XLIV.

²⁾ Abderhalden, Arbeitsmethoden.

$$1. 5 \text{ ccm} = 1,8 \text{ } n_{10}\text{-AgNO}_3.$$

$$2. 5 \text{ ccm} = 16,4 \text{ Jodlösung.}$$

Aus 1. berechnet sich das Volumen der Blutkörperchen zu 3,5 ccm. In diesen 3,5 ccm Blutkörperchen ist eine Acetonmenge = 8 ccm Jodlösung; in 3,5 ccm der Suspensionsflüssigkeit eine Acetonmenge = 11,5 ccm Jodlösung. Daraus berechnet sich für das

$$\text{Teilungsverhältnis } \frac{\text{Konzentration in den Zellen}}{\text{Konzentration in der Salzlösung}} = 0,7.$$

Verhielten sich die Blutkörperchen ganz wie eine wässrige Phase, so wäre das Teilungsverhältnis 1 zu erwarten; verhielten sie sich wie eine lipide Phase, das Teilungsverhältnis 0,2.

Aus den bekannten Gefrierpunktsbestimmungen von Hedin¹⁾ könnte man sich ähnliche Zahlen berechnen; doch sind diese Bestimmungen nicht an vollständigen Zellen, sondern an den kernlosen Blutscheiben der Säugetiere gemacht.

Für Verteilungsversuche hat Aceton den Vorteil, daß es sich sehr genau bestimmen läßt; den Nachteil, daß seine Lösungsverhältnisse in Öl nicht mit denen in den wichtigen Zelllipoiden übereinstimmen.²⁾

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXVIII, S. 242.

²⁾ Hans Meyer, loc. cit.