

Über die Bindung von Thymol in roten Blutzellen.

Von

Ryuta Usui (aus Japan).

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. September 1912.)

Die indifferenten oxydationshemmenden Stoffe häufen sich zum Teil sehr erheblich in lebenden Zellen an;¹⁾ je kleiner die wirksame Konzentration in der umspülenden Flüssigkeit, um so stärker war die relative Anreicherung in der Zelle. Die Vermutung lag nahe, daß die Konzentrationen der Stoffe dort, wo sie wirken, andere als in der umspülenden Flüssigkeit sind.

Nun wurde für die Blutzellen festgestellt,²⁾ daß die Oxydationsprozesse nicht in dem flüssigen Zellinhalt, sondern in oder an den unlöslichen Zellbestandteilen, den Stromata, vor sich gehen, und so war die nächste Frage, ob sich ein Bindungsvermögen dieser für die Atmung wichtigen Zellbestandteile feststellen ließ.

Ich habe, auf Anregung und unter Leitung von Herrn Dr. Warburg, die Frage für den Spezialfall des Thymols studiert und konnte in der Tat nachweisen, daß die Stromata Thymol binden; und zwar binden sie mehr Thymol als die löslichen Zellbestandteile, wenn man das Bindungsvermögen auf gleiche N-Mengen bezieht. Sie enthalten etwa die Hälfte des aufgenommenen Thymols, während ihr N-Gehalt nur etwa $\frac{1}{8}$ des Gesamt-N-Gehaltes der Zelle beträgt. Dieses Bindungsvermögen ändert sich nicht merklich, wenn die Stromata durch Kochen mit Alkohol und Äther von ihren Lipoidstoffen befreit werden.

¹⁾ O. Warburg u. Wiesel, Pflügers Archiv, Bd. 144, S. 465.

²⁾ O. Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 413.

³⁾ Anders ausgedrückt: Das Bindungsvermögen der Stromata für Thymol ist 7mal so stark als das der übrigen Zellbestandteile, bezogen auf gleiche N-Mengen.

Die Aufnahme des Thymols in die lebende Zelle ist also zum mindesten das Resultat von 3 Faktoren: 1. Verteilung auf die wässerigen Zellphasen. 2. Aufnahme durch lösliche Zellbestandteile. 3. Aufnahme durch unlösliche Zellbestandteile; der «Teilungskoeffizient» der Tabelle hat demgemäß keine physikalische Bedeutung, sondern soll nur ein anschauliches Bild der Aufnahmefähigkeit der Zelle geben.

Was die chemische Beschaffenheit der bindenden Substanzen anbetrifft, so ist bemerkenswert, daß die entfetteten Stromata fast völlig aus Nucleinsäure und Histon bestehen.¹⁾ Diese Körper sind also für die Aufnahme durch die unlöslichen Zellbestandteile verantwortlich zu machen, sei es, daß sie mit dem Thymol eine chemische Verbindung eingehen, sei es, daß sie das Thymol lösen oder an ihrer Oberfläche verdichten.

Eine relativ reine Eiweißlösung (Oxyhämoglobin aus Vogelblut) zeigte kein merkliches Bindungsvermögen für Thymol; dagegen finden sich im Blutserum Substanzen, die mit Thymol reagieren. Beispielsweise muß man in 100 ccm Serum statt 15 mg mehr als 50 mg Thymol auflösen, wenn man eine Konzentration von 0,015 % erzielen will.²⁾

Tabelle.

Aufnahme von Thymol in intakte rote Blutzellen.

In den Protokollen	Thymol-Konzentration Gewichts-%	Teilungskoeffizient	Zellsuspension Salzlösung
Versuch A dieselbe Suspension	0,0044	7,4	
	0,0084	6,5	
	0,015	6,4	
Versuch B dieselbe Suspension	0,0083	6,7	
	0,016	6,6	
Versuch C dieselbe Suspension	0,0031	8,0	
	0,0038	7,4	
	0,0044	7,3	
Versuch Da	0,016	6,9	

¹⁾ Ackermann, Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 299 (1904).

²⁾ Über «Konzentration» in mikroheterogenen Systemen vgl. die Anmerkung in der Arbeit von Dorner, Diese Zeitschr., Bd. 81, S. 99.

Versuchsordnung.

1. Rote Blutzellen von Gänsen wurden durch Waschen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung von Serum befreit. Die «konzentrierte Zellsuspension» enthält etwa $\frac{1}{5}$ ihres Volumens Zwischenflüssigkeit. Das Thymol wurde in konzentrierter alkoholischer Lösung in 0,9%ige Natriumchloridlösung eingegossen. Passende Volumina Zellsuspension und Thymollösung wurden vermischt, nach wenigen Minuten scharf zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehoben, das Thymol abdestilliert und im Destillat jodometrisch bestimmt. Aus der Differenz des Thymolgehaltes vor und nach dem Mischen ergab sich die in der Zellsuspension verschwundene Thymolmenge. Die Thymolmengen waren so gewählt, daß die Gleichgewichtskonzentrationen nach dem Mischen im Bereich der atemungshemmenden Konzentrationen waren; die Verteilungsmessungen sind also in dem Bereich gemacht, der für unsere Frage der wichtige ist.

Die Trennung der löslichen und unlöslichen Zellbestandteile wurde durch Hämolyse mit Wasser vorgenommen. Arbeitet man quantitativ, so ergibt sich aus dem Bindungsvermögen der intakten Zellen und aus dem Bindungsvermögen der Stromata das Bindungsvermögen der löslichen Zellbestandteile.

2. Das Bindungsvermögen der löslichen Zellbestandteile läßt sich auch noch auf andere Art nachweisen. Löst man eine bestimmte Menge Thymol erstens in 100 ccm 0,9%iger Natriumchloridlösung, zweitens in 100 ccm wässerigen Zell-extraktes, dessen osmotischer Salzdruck mit Natriumchlorid physiologisch gemacht ist, wäscht lebende Blutzellen mit beiden Flüssigkeiten bis zum Gleichgewicht und bestimmt die Atemungshemmung, so findet man sie geringer in dem wässerigen Zell-extrakt als in der Salzlösung. Die Atemungshemmung, die eine Funktion der Konzentration ist,¹⁾ gibt einen annähernden Maßstab für die Konzentrationsverminderung. Es ist das eine sehr bequeme Methode, um die Konzentration einer

¹⁾ O. Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 331 und Warburg u. Wiesel, loc. cit. Abschnitt IV.

Substanz in der wässrigen Phase eines mikroheterogenen Systems annäherungsweise zu bestimmen.¹⁾

3. Die merkwürdigen Resultate, die sich früher für die Abhängigkeit der Thymolbindung von der Konzentration ergaben und auf die beiläufig²⁾ hingewiesen wurde, sind unrichtig. Der Irrtum ist den großen Fehlern zur Last zu legen, die bei der früher angewandten Methode, bei kleinen Beobachtungsfehlern im Gesamtergebnis entstehen.

Versuche.

I. Chemische Thymolbestimmungen.³⁾

Methode: Beim Arbeiten mit konzentrierten Zellsuspensionen ist es nicht zu vermeiden, daß in die umspülenden Flüssigkeiten Spuren organischer Substanz, z. B. durch ganz geringfügige Hämolyse, kommen, die in alkalischer Lösung gleichfalls Jod binden. Das Thymol wurde deshalb zur Bestimmung stets abdestilliert und die wässrige Thymollösung unter Kühlung mit Eiswasser aufgefangen. (In einen 500 ccm-Kolben wurde die zu bestimmende Thymollösung gebracht, ferner 10 ccm verdünnte Schwefelsäure, ein wenig Phosphorwolframsäure und auf ca. 350 ccm mit Wasser aufgefüllt. Dann wurde solange destilliert, bis etwa 200 ccm übergegangen waren. Zu dem Destillat kamen 10 ccm $n/10$ -NaOH, überschüssige etwa $1/60$ -n-Jodlösung, dann wurde mit 25 ccm verdünnter Salzsäure angesäuert⁴⁾ und mit $1/60$ -n-Thiosulfat zurücktitriert.)

1 ccm der Jodlösung zeigte 0,61 mg Thymol an. Beim Destillieren auf die angegebene Art entstehen keine nennenswerten Thymolverluste. Eine Thymollösung verbrauchte direkt 33,5 ccm Jodlösung; nach Destillation gefunden: 33,5; 33,2; 33,3; 33,2.

¹⁾ Vgl. auch die «Kompensationsmethode» von Michaelis u. Rona (Biochemische Zeitschrift, Bd. 14, S. 476 [1908]). Das Prinzip ist das gleiche, nämlich Trennung durch eine für Kolloide undurchlässige Membran, in unserm Fall durch die Zellgrenzschicht.

²⁾ Warburg u. Wiesel, loc. cit. Abschnitt IV.

³⁾ Jodometrische Bestimmung des Thymols nach Messinger u. Vortmann, Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 23, S. 2753 (1890).

⁴⁾ Nicht filtriert, weil beim Filtrieren Jodverluste entstehen. Die Farbe des Niederschlags stört die Jodtitration nicht.

A. Aufnahme von Thymol durch eine konzentrierte Suspension intakter Erythrocyten. Für a, b und c dieselbe Zellsuspension. 50 ccm Thymol = 30,9 ccm Jod.

a) 50 ccm Suspension + 50 ccm Thymollösung in NaCl (0,9%) + 10 ccm 0,9% NaCl vermischt, zentrifugiert, und 50 ccm in obiger Weise destilliert = 3,6 ccm Jod; auf 60:4,3. (Verschwunden also $30,9 - 4,3 = 26,6$ Jod. Diese in 50 ccm Zellsuspension. Also $26,6 : 3,6 = 7,4$ mal soviel in der Zellsuspension als in der NaCl-Lösung.)

Konzentration in der umspülenden Lösung im Gleichgewicht: 0,0044%.

b) 25 ccm Suspension + 10 ccm 0,9% NaCl + 50 ccm Thymollösung vermischt usw. 50 ccm Zentrifugat destilliert = 6,9 Jod.

(In 60 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,9
 » 60 » » nach » » 8,3

Verschwunden in 25 ccm Zellsuspension: 22,6

In 25 ccm umspülender Salzlösung 3,5. Also $22,6 : 3,5 = 6,5$ mal soviel in der Suspension als in der Salzlösung.)

Konzentration in der umspülenden Flüssigkeit: 0,0084%.

c) 10 ccm Zellsuspension + 10 ccm 0,9% NaCl + 50 ccm Thymollösung usw. Destilliert 50 ccm Zentrifugat = 12,4 ccm Jod.

(In 60 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,9
 » 60 » » nach » » 14,9

In 10 ccm Zellsuspension verschwunden: 16,0

In 10 ccm der umspülenden Salzlösung 2,5. Also $16,0 : 2,5 = 6,4$ mal soviel in der Zellsuspension als in der Salzlösung.)

Konzentration: 0,015% in der umspülenden Salzlösung.

B. Aufnahme von Thymol durch eine Suspension intakter Erythrocyten. Konzentrierte Suspension in 0,9% NaCl. Thymol in 0,9% NaCl gelöst. 50 ccm = 30,4 Jod. Auch im übrigen wie A.

a) 25 ccm Zellsuspension + 5 ccm 0,9% NaCl + 50 ccm Thymollösung usw. Destilliert 50 ccm = 6,8 Jod.

(In 55 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,4
 » 55 » » nach » » 7,5

In 25 ccm Zellsuspension verschwunden: 22,9

In 25 ccm umspülender Salzlösung 3,4. Also $22,9 : 3,4 = 6,7$ mal soviel in der Suspension als in der Salzlösung.)
Konzentration in der Salzlösung: 0,0083‰.

b) 10 ccm Zellsuspension + 5 ccm 0,9‰ NaCl + 50 ccm Thymol usw. 50 ccm destilliert = 12,7 ccm Jod.

(In 55 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,4
» 55 » » nach » » 14,0)

In 10 ccm Zellsuspension verschwunden: 16,4

In 10 ccm der umspülenden Salzlösung 2,5. Also $16,4 : 2,5 = 6,6$ mal soviel in der Zellsuspension als in der umspülenden Salzlösung.)

Konzentration: 0,016‰.

C. Aufnahme von Thymol durch eine Suspension intakter Erythrocyten. Konzentrierte Suspension in 0,9‰ NaCl. Thymol in 0,9‰ NaCl gelöst. 50 ccm = 30,6 Jod.

a) 50 ccm Zellsuspension + 10 ccm 0,9‰ NaCl + 50 ccm Thymol usw. Destilliert 50 ccm = 3,6 Jod.

(In 60 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,6
» 60 » » nach » » 4,3)

In 50 ccm Zellsuspension verschwunden: 26,3

In 50 ccm Salzlösung 3,6. Also $26,3 : 3,6 = 7,3$ mal soviel in der Zellsuspension als in der Salzlösung.)

Konzentration in der Salzlösung: 0,0044‰.

b) 50 ccm Suspension + 60 ccm 0,9‰ NaCl + 50 ccm Thymol. Zentrifugiert, 100 ccm überstehende Flüssigkeit destilliert und titriert = 6,3 Jod.

(In 110 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,6
» 110 » » nach » » 6,9)

In 50 ccm Zellsuspension verschwunden: 23,7

In 50 ccm Salzlösung 3,2. Also $23,7 : 3,2 = 7,4$ mal soviel in der Zellsuspension als in der Salzlösung.)

Konzentration in der Salzlösung: 0,0038‰.

c) 50 ccm Suspension + 160 ccm 0,9‰ NaCl + 50 ccm Thymol. Zentrifugiert und 200 ccm überstehende Flüssigkeit destilliert = 10,1 ccm Jod.

(In 210 ccm Salzlösung vor dem Mischen 30,6
 » 210 » » nach » » 10,6
 In 50 ccm Zellsuspension verschwunden: 20,0

In 50 ccm Salzlösung 2,5. Also $20 : 2,5 = 8$ mal soviel in der Zellsuspension als in der Salzlösung.)

Konzentration in der Salzlösung: 0,0031%.

D. Aufnahme von Thymol in intakte Erythrocyten und in Stromata derselben Zellen.

Darstellung der Stromata:¹⁾ 10 ccm konzentrierte Zellsuspension wurde mit 100 ccm destillierten Wassers, das auf 40° erwärmt war, einige Minuten geschüttelt, dann 25 ccm 3,6%iges NaCl zugegeben (absichtlich etwas weniger als berechnet), dann zentrifugiert und das ganze etwa 4—5 mal wiederholt, bis eine rein weiße Suspension in farbloser NaCl-Lösung erhalten wurde. Diese Suspension wurde auf 10 ccm gebracht. Es waren dann 2 Suspensionen vorhanden, 1. intakte Zellen, 2. Zellen minus allen bei der Behandlung mit Wasser und Kochsalz auslaugbaren Substanzen, also vor allem Zellen minus Hämoglobin.

Um eine Vorstellung davon zu geben, wie durch die Behandlung mit Wasser und Kochsalz die Substanzmenge vermindert wird, teilen wir die Resultate von Stickstoffbestimmungen der Stromata- und der Zellsuspension mit.

10 ccm Suspension intakter Zellen = 384 n_{10} -NH₃
 10 » Stromata = 45,6 n_{10} -NH₃.

Die N-haltigen Zellbestandteile sind also durch die Behandlung mit Wasser und NaCl zu etwa 88% entfernt.

Als nun beide Suspensionen mit Thymol vermischt wurden, ergab sich, daß das Aufnahmevermögen der Stromata für Thymol noch sehr erheblich war und nur auf etwa die Hälfte gesunken. 50 ccm Thymol (in 0,9%iger NaCl-Lösung) = 33,5 Jod.

a) 10 ccm konzentrierter Suspension intakter Zellen + 10 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung + 50 ccm Thymollösung usw. Destilliert 50 ccm = 13,0 Jod.

¹⁾ Vgl. Ackermann, loc. cit.

In 60 ccm Salzlösung vor dem Mischen	33,5
» 60 » » nach » »	<u>15,6</u>

Verschwunden in 10 ccm Zellsuspension : 17,9

In 10 ccm Salzlösung 2,6. Also $17,9 : 2,6 = 6,9$ mal soviel in der Zellsuspension als in der Salzlösung.

Konzentration in der Salzlösung: 0,016%.

b) Stroma, quantitativ aus 10 ccm derselben Zellsuspension dargestellt, auf 10 ccm + 10 ccm 0,9% NaCl + 50 ccm Thymol. Destilliert 50 ccm = 16,5 Jod.

In 60 ccm Salzlösung vor dem Mischen	33,5
» 60 » » nach » »	<u>19,8</u>

In 10 ccm Stromasuspension verschwunden : 13,7

In 10 ccm Salzlösung 3,3. Also $13,7 : 3,3 = 4,2$ mal soviel in der Stromasuspension als in der Salzlösung.

Konzentration in der Salzlösung: 0,02%.

E. Vergleich des Aufnahmevermögens entfetteter und nicht entfetteter Stromata.

Die Darstellung der Stromata geschah wie in D. Die Entfettung, die öfteres Absaugen erfordert, läßt sich nicht gut quantitativ machen; deshalb wurde zum Vergleich im frischen und entfetteten Stroma eine N-Bestimmung ausgeführt; da auch etwas N in den Alkohol-Äther geht, so ist dieser Vergleich nicht ganz genau, doch kommt der N-Gehalt der Lipide wohl kaum gegen den N-Gehalt der stickstoffreichen Nucleinsäurehistonverbindung in Betracht. Zur Entfettung wurde das frische Stroma mit Alkohol gefällt, 1 Stunde mit Alkohol gekocht, heiß filtriert, wieder 4 Stunden mit Alkohol gekocht, heiß filtriert, eine Nacht in Äther gebracht und schließlich 3 Stunden mit Äther am Rückflußkühler gekocht. 0,2 g gaben nach Kjeldahl 22,6 ccm n_{10} -NH₃.

0,5 g wurde mit 5 ccm einer 0,9%igen Kochsalzlösung angerieben, 50 ccm einer Thymollösung in 0,9% NaCl (Titer 50 ccm = 32,2 Jod) zugegeben, gemischt, zentrifugiert, und in 50 ccm überstehender Flüssigkeit das Thymol bestimmt. Verbraucht 19,0 ccm Jod; dann wären in 55 ccm 21 ccm Jod; 0,5 g Stroma hat also $32,2$ minus $21,0 = 11,2$ Jod oder 6,8 mg

Thymol fortgenommen. 0,5 g Stroma gaben nach Kjeldahl 57 ccm n_{10} -NH₃. — 10 ccm frischen Stromas, das zur Herstellung des entfetteten Präparates gedient hatte, gaben nach Kjeldahl 43 ccm n_{10} -NH₃; 10 ccm frischen Stromas wurden mit 50 ccm Thymollösung, alles in 0,9 % NaCl, vermischt usw.

50 ccm Thymollösung vor der Mischung 32,2 n_{60} -Jod
50 » » nach » » 20,0 n_{60} -Jod.

Also enthalten 60 ccm Salzlösung nach dem Mischen 24 ccm Jod; verschwunden 32,2 minus 24,0 = 8,2 ccm Jod oder 5 mg Thymol. Durch eine Stromamenge, die 57 ccm n_{10} -NH₃ äquivalent wäre, würde also 6,6 mg Thymol fortgenommen werden.

Resultat: Bei einer Konzentration von 0,022 % Thymol ist im Gleichgewicht von 0,5 g entfettetem Stroma 6,8 mg fortgenommen; bei einer Konzentration von 0,024 % Thymol ist im Gleichgewicht von frischem Stroma, dessen N-Gehalt = dem von 0,5 g entfettetem Stroma, 6,6 mg fortgenommen.

Das heißt also, daß die Entfernung der Lipoide aus dem Stroma das Aufnahmevermögen für Thymol nicht erheblich vermindert.

Es ist kaum nötig, hinzuzufügen, daß das Stroma das Thymol nicht zerstört, sondern als solches bindet. Das läßt sich zeigen, wenn man das Stroma in Wasser und verdünnter Schwefelsäure aufschwemmt und wie oben destilliert. Das verschwundene Thymol wird dann zurückgewonnen.

F. Darstellung der Oxyhämoglobinlösung. 1 Teil konzentrierter Zellsuspension mit 2 Teilen warmen Wassers vermischt. Zentrifugiert. Die überstehende klare (stromafreie) Flüssigkeit abgehoben, mit Eis gekühlt, und $\frac{1}{4}$ Volumen eiskalten Alkohols zugegeben. Nach 24 Stunden Kältemischung abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit fortgenommen und der Bodensatz, ein feines ziegelrotes Pulver, in Wasser aufgenommen. Durch Verdünnung mit Wasser und Zugabe von Natriumchlorid auf den N-Gehalt und den osmotischen Salzdruck des Serums gebracht. Auf diese Art ist das Oxyhämoglobin von den Formelementen und von der Hauptmenge der übrigen löslichen Zellbestandteile abgetrennt.

G. Das Thymolbindungsvermögen von Flüssigkeiten (mit der Atmungsmethode festgestellt).

a) Wässriger Zellauszug.

80 ccm konzentrierter Zellsuspension (in 0,9% NaCl) wurden mit 160 ccm Wasser vermischt, die Mischung 5 Minuten bei 37° gehalten und zentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit wurde dann mit NaCl auf den physiolog.-osmotischen Salzdruck gebracht und mit dem gleichen Volumen einer 0,03%igen Thymollösung vermischt. (1 ccm der Flüssigkeit nach der Mischung = 4,4 n_{10} -NH₃.) Die Atmungshemmung durch diese Flüssigkeit betrug ca. 50%, während die Atmungshemmung, gemessen an demselben Zellmaterial, für eine 0,015%ige Thymollösung in 0,9% Kochsalz ca. 95% betrug.

b) Serum von Gänsen.

0,01% Thymol in Ringerscher Lösung hemmte die Atmung um 79%. 0,05% Thymol im Serum hemmte die Atmung desselben Zellmaterials um 22%.

(1 ccm Serum gab nach Kjeldahl 5,4 ccm n_{10} -NH₃.)

c) Preßsaft aus roten Blutzellen, nach dem Buchnerschen Verfahren hergestellt.

I. 50 ccm Preßsaft wurden mit 50 ccm einer 0,03%igen Thymollösung vermischt.

II. 50 ccm 0,9% NaCl wurden mit 50 ccm einer 0,03%igen Thymollösung vermischt. Atmungshemmung in I 0, in II betrug sie fast 100%.

(1 ccm von I gab nach Kjeldahl 28 ccm n_{10} -NH₃.)

d) Oxyhämoglobinlösung.

1 ccm gab nach Kjeldahl 5,5 ccm n_{10} -NH₃.

0,015 g Thymol in 100 ccm gelöst, bewirkte eine Atmungshemmung¹⁾ von 90%, während 0,015 g Thymol, in 100 ccm 0,9% NaCl gelöst, die Atmung desselben Zellmaterials um 96% hemmte.

¹⁾ Atmungshemmung = (Atmung in Hämoglobin minus Atmung in Hämoglobin-Thymol) dividiert durch Atmung in Hämoglobin; beziehungsweise statt Hämoglobin NaCl, Preßsaft, Serum.