transport to NAD at the expense of H_2 would be inhibited to the same extent as the succinate-linked reaction. However, since the H_2 -linked reduction of cytochrome c is only weakly inhibited at low concentrations of antimycin A, the noncyclic system can operate under these conditions. It is suggested that the ascorbate-DCPIP-linked NAD-photoreduc-

tion by *Rh. rubrum* chromatophores also involves a light-induced noncyclic electron transport.

The author is indebted to Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL for his encouragement to this work and to Dr. K.-D. LIPPERT for stimulating discussions. The work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Polarographische Messung kritischer Sauerstoffdrucke bei Herzmuskelsarkosomen

H. GLOSSMANN * und M. FRIMMER

Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. med. M. FRIMMER)

(Z. Naturforsch. **24 b**, 76—79 [1969]; eingegangen am 20. Juni 1968)

Mit Hilfe der Ganzglas-Platinelektrode nach GLEICHMANN und LÜBBERS wurde der kritische O_2 -Druck bei stark verdünnten Sarkosomensuspensionen in Tris-Puffer bei $37^\circ C$ mit $2,14 \pm 0,87$ Torr ermittelt. Die Abhängigkeit der kritischen O_2 -Drucke vom Suspensionsmilieu (Tris- und Phosphatpuffer) sowie die Beeinflussung der Meßergebnisse durch Hämoglobin oder Myoglobin wurden untersucht.

Die Kenntnis der kritischen O_2 -Drucke in Zellen bzw. Mitochondrien ist für zahlreiche Probleme der Physiologie und Pharmakologie von großem Interesse (s. THEWS^{2,3}). Die 1955 von BÄNDER und KIESE⁴ mit einem schnell rotierenden Warburg-Manometer gemessenen kritischen Drucke bei Lebermitochondrien betrugen bei $37^\circ C$ 8–9 Torr. In letzter Zeit sind jedoch Zweifel aufgetaucht, ob diese Werte zutreffen (LÜBBERS und KESSLER⁵). Bei der manometrischen Bestimmung spielt die Diffusion des O_2 von der Gasphase in das Suspensionsmedium eine limitierende Rolle. Da ferner die an Lebermitochondrien gemessenen Werte nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse am Herzen übertragen werden können, haben wir die Atmung von Herzmuskelsarkosomen bei niedrigen O_2 -Drucken unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen.

Experimenteller Teil

Methoden: Sarkosomen wurden aus Herzen von etwa 200 g schweren Wistar-Ratten unter Verwendung von Nargase gewonnen. (Ausführliche Darstellung s. HEGNER und GLOSSMANN⁶.) Die von GLEICHMANN und LÜBBERS¹ ursprünglich für die Messung von O_2 -Drucken im Blute entwickelte polarographische Methode wurde für die Messung an Mitochondrien adaptiert (s. HEGNER und GLOSSMANN⁶).

Ergebnisse

Die O_2 -Aufnahme von Herzmuskelsarkosomen wurde bei $22,5^\circ C$, bei $30^\circ C$ und bei $37^\circ C$ gemessen (Abb. 1). Bei $22,5^\circ C$ bestand eine gute Proportionalität zwischen O_2 -Aufnahme und eingesetzter Sarkosomenmenge (mg Protein). Bei $30^\circ C$ und $37^\circ C$ war diese Proportionalität weniger ausge-

* Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil einer Dissertation (Med. Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen).

¹ U. GLEICHMANN u. D. W. LÜBBERS, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **271**, 431 [1960].

² G. THEWS, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **271**, 197 [1960].

³ G. THEWS, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **276**, 166 [1962].

⁴ A. BÄNDER u. M. KIESE, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **224**, 312 [1955].

⁵ D. W. LÜBBERS u. M. KESSLER, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **281**, 50 [1964].

⁶ D. HEGNER u. H. GLOSSMANN, Z. Naturforsch. **20 b**, 234 [1965].

Abb. 1. O₂-Verbrauch von Herzmuskelsarkosomen. Polarographische Messung nach GLEICHMANN und LÜBBERS¹, Registrierung mit Phillips Direktschreiber. Versuchsansatz: MgSO₄ 2,5 mm, Na-Succinat 64 mm, Cytochrom c 0,07 mm, Serumalbumin vom Rind (reinst) 0,5%, TRIS- bzw. Phosphatpuffer pH 7,4. Endvolumen: 2,5 ml. Kurven 3 und 4 zeigen den Einfluß von zwei verschiedenen Sarkosomenkonzentrationen auf den Kritischen Druck (*KD*), den Kritischen Druck 90% (*KD* 90%) und den Halbwertdruck (*HWD*) bei 37 °C, TRIS-Puffer; Kurven 6 und 5 den Einfluß von Phosphat- bzw. TRIS-Puffer pH 7,4.

Sarkosomenkonzentration mg Protein/Ansatz	T [°C]	Puffer	$v_{\max}$	<i>KD</i>	<i>KD</i> 90 %	<i>HWD</i>
0,1	22,5	Tris	0,098	6,9	2,25	0,51
0,1	22,5	Tris	0,090	6,8	2,45	0,51
0,1	22,5	Phosphat	0,600	4,1	3,70	1,04
0,03	22,5	Phosphat	0,199	1,64	1,52	0,80
0,015	22,5	Phosphat	0,100	1,44	1,35	0,45
0,02	30,0	Tris	0,088	3,8	1,70	0,48
0,02	30,0	Phosphat	0,340	2,35	2,25	0,85
0,006	30,0	Phosphat	0,103	0,67	0,63	0,33
0,003	30,0	Phosphat	0,066	0,67	0,63	0,30

Tab. 1 a. O₂-Verbrauch und kritische O₂-Drucke von Herzmuskelsarkosomen bei Messung in Tris- und Phosphatpuffer. $v_{\max}$ in $\mu\text{l O}_2/\text{ml}/\text{min}$, *KD* = kritischer O₂-Druck (Torr), *KD*₉₀ = $v = 90\% v_{\max}$ (Torr), *HWD* = Halbwertdruck = $v = 0,5 \cdot v_{\max}$ (Torr), Tris = Tris-Puffer 0,15-m., pH 7,4, Phosphat = Phosphatpuffer 0,15-m., pH 7,4.

T	Puffer	<i>KD</i>	<i>KD</i> 90 %	<i>HWD</i>
22,5	Tris	5,36 ± 0,74 (34)	2,25 ± 0,37	0,47 ± 0,07
30,0	Tris	3,48 ± 1,07 (20)	1,58 ± 0,30	0,42 ± 0,29
37,0	Tris	2,14 ± 0,87 (21)	1,17 ± 0,37	0,52 ± 0,07

Tab. 1 b. Mittelwerte der kritischen und Halbwertdrucke (in Klammern Zahl der Versuche).

prägt: Oberhalb einer bestimmten Sarkosomen-Konzentration war die gemessene Atmung kleiner als erwartet. Das unerwartete Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß mit steigender Partikelkonzentration die Halbwertsdrucke und kritischen O_2 -Drucke zunächst konstant blieben und dann anstiegen. Wurden die Sarkosomen-Konzentrationen in den Versuchsansätzen niedrig gehalten, so waren die gewonnenen Meßergebnisse gut reproduzierbar (Tab. 1 b).

Abb. 2 a. Verhalten der Atmung unterhalb der Kritischen O_2 -Konzentration, die gleich 1 gesetzt wurde. ■ Herzmuskel-sarkosomen, TRIS-Puffer, 37 °C; ● Herzmuskel-sarkosomen, TRIS-Puffer, 22,5 °C; ○ theoretische Werte für $v/v_{\max}$ atmen-der kugliger Teilchen in Abhängigkeit von n (berechnet nach Gleichung 3). Für $n=0$ ist $D_i \infty$; für $n=3$ ist $h \infty$.

Abb. 2 b. Werte der Abb. 2 a im doppelt logarithmischen Bezugssystem aufgetragen. ■ Herzmuskel-sarkosomen, 37 °C, TRIS-Puffer; ● Herzmuskel-sarkosomen, 22,5 °C, TRIS-Puffer.

In der Tab. 1 a sind die Ergebnisse vergleichen-der Messungen in Tris- und Phosphatpuffer wieder-gegeben. In Phosphatpuffer fanden wir höheren O_2 -Verbrauch und niedrigere kritische O_2 -Drucke als in Tris-Puffer.

Bei 22,5 °C ergab die Messung der O_2 -Aufnahme im Bereich unterhalb des kritischen O_2 -Druckes eine Kurve, die eine Michaelis-Menten-Kinetik vermuten läßt. Dagegen wurde bei 37 °C ein sigmoidförmiger Kurvenverlauf festgestellt. Trägt man $\log \frac{v}{v_{\max} - v}$ gegen $\log pO_2$ auf, so ergibt sich in beiden Fällen für den Bereich von 10 – 90% $v_{\max}$ eine Gerade, die bei 22,5 °C eine Steigung von 1,4 und bei 37 °C eine Steigung von 4,0 aufweist (Abb. 2 b).

Diskussion

Das überraschende Ergebnis der Untersuchung ist der Anstieg des kritischen Druckes und des Halb-wertsdruckes oberhalb einer bestimmten maximalen O_2 -Aufnahme. Die Tab. 1 zeigt, daß für dieses Er-gebnis nicht nur die Einstellzeit des polarographi-schen Meßsystems verantwortlich gemacht werden kann. Es ist deshalb zu diskutieren, welche Fakto-ren für dieses Phänomen entscheidend sein könnten:

1. In der atmen- den Partikelsuspension könnte ein Inhibitor (z. B. Fumarat) wirksam werden. Wir ha-ben bei mehreren Versuchen den O_2 -Druck bereits vor dem Start auf etwa 20 Torr gesenkt (durch Äquilibriumierung mit O_2N_2 -Gemischen). Bei diesen Versuchen konnte also ein Inhibitor noch nicht in nennenswerten Konzentrationen vorhanden sein. Diese Versuchsanordnung hatte weiter den Vorteil einer erheblichen Verkürzung der Versuchsdauer und damit einer geringeren Schädigungsmög-lichkeit der Sarkosomen. Diese Experimente ergaben die gleichen Ergebnisse wie unsere Normalansätze, welche bei Versuchsbeginn unter dem O_2 -Druck atmosphärischer Luft standen.

2. Die Sarkosomen-Suspensionen könnten trotz sorgfältiger Präparation Hämoglobin oder Myoglo-bin enthalten. In diesem Falle würde der Versuchs-ansatz einen O_2 -Speicher enthalten. Würde im An-satz gleichzeitig ein druckunabhängiger O_2 -verbrau-cher Prozeß stattfinden, dann ließe sich der Druckabfall in der Suspension wie folgt beschrei-ben: (Der O_2 -Speicher möge sich entlang einer Langmuir'schen Adsorptionsisotherme entladen.)

$$p = \frac{p_1}{v_a} \cdot \left(V_a - Q \cdot t + \frac{a \cdot p_1}{K + p_1} - \frac{a \cdot p}{K + p} \right). \quad (1)$$

- p = Sauerstoffdruck zur Zeit t (Torr),
 Q = Geschwindigkeit des O₂-verbrauchenden Vorganges ($\mu\text{l O}_2/\text{min}$),
 a = Sauerstoffkapazität des Speichers ($\mu\text{l O}_2$),
 K = Halbsättigungsdruck des Speichers (Torr),
 V_a = Anfangsvolumen des physikalisch gelösten O₂ (μl) beim O₂-Druck p_1 .

Setzt man Q'/Q (Q' = gemessene Geschwindigkeit) = n , so ergibt sich:

$$n = \frac{V_a \cdot (K + p)^2}{V_a \cdot (K + p)^2 + K \cdot a \cdot p_1}. \quad (2)$$

Für $V_a = 10 \mu\text{l O}_2$, $p_1 = 150$ Torr, $K = 20$ Torr und $a = 0,03 \mu\text{l O}_2$ ergibt sich $n = 0,99$ für 10 Torr. Gibt man für die Meßapparatur einen Fehler von 1% vor, so erschiene die Atmung nur bis etwa 10 Torr vom O₂-Druck unabhängig. Das heißt, auch kleinste Mengen Myoglobin und Hämoglobin können die Meßergebnisse verfälschen.

3. Bei der von uns verwendeten polarographischen Meßanordnung befand sich kein Gasraum über dem Suspensionsmedium. Demnach konnte nur der Gasaustausch zwischen den atmenden Partikeln und dem umgebenden Medium limitierend sein. LANGMUIR und McCABE⁷ haben diese Möglichkeit unter Benutzung der von RASHEVSKY⁸ und SULLIVAN⁹ angegebenen Funktionen theoretisch berechnet. Nimmt man an, daß die Atmung der Sarkosomen vom O₂-Druck unabhängig ist, so gilt für den Idealfall kugelliger Teilchen nach RASHEVSKY⁸ in einer gerührten Suspension:

$$c_0 = c^+ (1 - n \cdot y^2 - y^3 + n \cdot y^3). \quad (3)$$

$$n = \frac{A \cdot r_0^2}{2 \cdot D_i \cdot c^+}. \quad (4)$$

- c_0 = O₂-Konzentration in der Umgebung des Teilchens,
 c^+ = kritische O₂-Konzentration,
 D_i = Diffusionskoeffizient im Inneren des Teilchens.

$$y = \frac{v_{\max} - v}{v_{\max}}. \quad (5)$$

r_0 = Radius des Teilchens.

(Für n gilt: $0 \leq n \leq 3$; ist n kleiner als 3, so ist ein meßbarer Einfluß der Membranpermeabilität vorhanden.)

Die Abhängigkeit des O₂-Verbrauches atmender kugelliger Teilchen ist in Abb. 2 a in Abhängigkeit von n dargestellt. Man erkennt deutlich die formale Ähnlichkeit der eingezeichneten Ergebnisse für 22,5 °C in Tris-Puffer mit der berechneten Kurve unter der Bedingung, daß $n = 3$ ist. In diesem Fall ergab sich kein Einfluß der Membranpermeabilität.

4. Ist die Atmung kugelliger Teilchen vom O₂-Druck abhängig, so kann man nach dem Vorschlag von LANGMUIR und McCABE⁷ die von SULLIVAN⁹ angegebenen Funktionen zur Analyse der Meßwerte verwenden. Nach SULLIVAN gilt

$$\frac{p}{v} \sim \frac{K_m}{v_{\max} - v} + W.$$

(K_m = Michaelis-Konstante; W ist eine Funktion des Radius, der Membranpermeabilität und des Diffusionskoeffizienten.) Wir haben unsere Ergebnisse in einem Koordinationssystem

$$\left(\frac{p}{v} \text{ gegen } \frac{1}{v_{\max} - v} \right)$$

aufgetragen und dabei festgestellt, daß die Herzmuskelsarkosomen in Phosphatpuffer keinen Einfluß des verminderten O₂-Druckes auf die Atmung erkennen lassen. Der kritische O₂-Druck müßte deswegen wesentlich niedriger als 0,3 Torr (bei 30 °C und in Phosphatpuffer) liegen. Diese Ergebnisse stimmen mit den an Herzmuskelsarkosomen ermittelten Werten von SCHINDLER und Mitarb. (zitiert nach CHANCE¹⁰) überein. CHANCE gab 1965 kritische Drucke von etwa 0,05–0,10 Torr an. LÜBBERS und KESSLER⁵ haben mit der polarographischen Methode für Lebermitochondrien kritische O₂-Drucke von 3–4 Torr (37 °C) gefunden. Es liegt der Schluß nahe, daß unter in vivo-Bedingungen der kritische O₂-Druck durchaus in Bereichen unter 1 Torr liegen kann. Ob die von uns für 37 °C (Tris-Puffer) gefundene sigmoidförmige Abhängigkeit der Atmung vom O₂-Druck den Verhältnissen in der Herzmuskelzelle entspricht, ob der Exponent $r = 4$ ein Maß für die Stöchiometrie der Reaktion des O₂ darstellt und ob vielleicht ein allosterischer Effekt vorliegt, muß vorläufig offen bleiben.

⁷ I. S. LANGMUIR u. M. McCABE, J. theoret. Biol. **8**, 124 [1965].

⁸ N. RASHEVSKY, Mathematical Biophysics physico-mathematical foundation of biology. N. Y., Dover Publications, 3rd Edition, New York 1960.

⁹ D. G. O'SULLIVAN, J. theoret. Biol. **2**, 117 [1962].

¹⁰ B. CHANCE, J. gen. Physiol. **49**, 163 [1965].