Über den Einfluss ultraniedriger Temperaturen auf verschiedene biologische Erscheinungen.

III. Mitteilung.

Beeinflussung der Gewebsatmung durch ultraniedrige Temperatur.

Von

Sentaro Kusaka.

(日下千太郎)

(Aus der Medizinischen Klinik von Prof. Dr. T. Kato,
Kaiserliche Tohoku-Universität zu Sendai.)

Die Gewebsatmung vollzieht sich unter Mitwirkung verschiedener Faktoren. Trotz zahlreicher bisheriger Untersuchungen gelangte man doch noch nicht zu einer vollkommen zureichenden Deutung des Vorganges, weil noch ziemlich viele Einzelheiten ungeklärt sind. Nur eines geht aus den Versuchen vieler Autoren¹⁾⁻⁹⁾ zweifellos hervor, nämlich dass bei der Gewebsatmung die Wirkung der Fermente eine bedeutende Rolle spielen.

In den vorangehenden Mitteilungen¹⁰⁾ wurde der Einfluss ultratiefer Kälte auf die Fermentwirkung untersucht und beobachtet, dass die Wirkung der Diastase und des Pepsins durch ultratiefe Kälte nicht beeinflusst wird während die der Blutkatalase dadurch ein wenig gefördert wird, und dass die Hämoglykolyse infolge Kältewirkung vollständig zessiert. Wenn die Fermentwirkung ebenfalls für die Gewebsatmung eine sehr wichtige Rolle spielt, so wird auch letztere wahrscheinlich durch ultratiefe Kälte irgendwie beeinflusst werden können. Owada¹¹⁾ an der hiesigen Klinik hat bewiesen, dass die Atmung des Gewebes, welches Ultra-Schallwellen ausgesetzt wurde, stark gehemmt wird. Zieht man den Einfluss ultratiefer Kälte auf Fermente und ihre gewaltige physikalische Wirkung in Betracht, so dürfte die Frage nach dem Einfluss ultratiefer Kälte auf die Gewebsatmung eine interessante sein. Dessenungeachtet blieb diese Frage bisher noch ganz offen, was mich zur vorliegenden Arbeit veranlasste.

Versuchsmethode.

Von gesunden Kaninchen, welche morgens in nüchternem Zustand durch Verbluten aus der A. carotis getötet wurden, wurden sogleich steril Leber, Milz und

Muskel (*M. gastrocnemius*) herausgeschnitten. Alles Versuchsmaterial wurde in zwei Teile geschnitten, und die einen Hälften wurden zur Kontrolle in einer Ringerlösung aufbewahrt. Die anderen wurden in sterile Gase eingewickelt und eine flüssigen Sauerstoff enthaltende, breitmündige Thermosflasche hineingelegt. Wenn der flüssige Sauerstoff aufhörte zu siedern, d. h. die Temperatur des Gewebestücks vollkommen auf den Siedepunkt flüssigen Sauerstoffs (-183°C) herabgesetzt worden war, wurden sie noch 1 Minute lang darin gelassen und dann herausgenommen, um sie dann in einer Ringerlösung wieder aufzutauen. Diese und die zur Kontrolle in Ringerlösung aufbewahrten Gewebestücke wurden mit einem scharfen Messer in ca. 0,3 mm dicke Gewebeschnitte zerschnitten und in Ringerlösung eingelegt. Daraus wurden diejenige Gewebeschnitte herausgewählt, welche möglichst gleich gross und von gewünschter Dicke waren, und ihren Sauerstoffverbrauch nach der Warburg¹²⁾ schen Methode 5 Male (nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten) bestimmt und sein Verlauf verfolgt.

Versuchsergebnisse.

Auf Tab. 1 ist der Sauerstoffverbrauch (ccm pro mg) nach Ablauf von 15, 30 45, 60 und 90 Minuten angegeben. An 11 Versuchen normaler

Tabelle 1.

Versuchs-Nr.	Versuchskaninchen					O ₂ -Verbrauch				
	Geschlecht	Körpergewicht (kg)	Erythrozytenzahl (Millionen)	Hb. (g/dl)		Muskel				
						15'	30'	45'	60'	90'
1	♂	2,11	6,98	13,73	Kontrolle	0,336	0,624	0,917	1,232	1,897
					Behandelt	0,254	0,553	0,837	1,075	1,412
2	♂	1,93	7,25	14,12	Kontrolle	0,403	0,652	1,026	1,302	1,957
					Behandelt	0,274	0,527	0,868	1,101	1,558
3	♂	2,27	7,34	14,36	Kontrolle	0,248	0,526	0,697	0,906	1,382
					Behandelt	0,177	0,403	0,595	0,757	1,012
4	♀	1,96	6,81	13,36	Kontrolle	0,253	0,557	0,848	1,097	1,701
					Behandelt	0,225	0,456	0,624	0,884	1,263
5	♂	2,08	7,42	14,58	Kontrolle	0,347	0,628	0,896	1,203	1,842
					Behandelt	0,245	0,496	0,761	0,972	1,501
6	♂	1,74	7,31	14,18	Kontrolle	0,274	0,566	0,804	1,126	1,752
					Behandelt	0,213	0,428	0,687	0,902	1,411
7	♀	2,06	6,96	13,70	Kontrolle	0,351	0,697	0,952	1,307	1,954
					Behandelt	0,253	0,548	0,799	1,002	1,351
8	♂	1,78	7,37	14,44	Kontrolle	0,367	0,812	1,061	1,409	2,157
					Behandelt	0,249	0,553	0,782	1,054	1,546
9	♂	1,85	7,13	14,00	Kontrolle	0,384	0,747	1,072	1,439	2,189
					Behandelt	0,233	0,549	0,821	1,072	1,625
10	♀	1,95	7,40	14,66	Kontrolle	0,331	0,710	1,126	1,407	2,236
					Behandelt	0,206	0,463	0,704	0,822	1,197
11	♂	2,20	6,86	13,47	Kontrolle	0,478	0,984	1,436	1,896	2,792
					Behandelt	0,357	0,699	1,023	1,322	1,705

Gewebe ist der Sauerstoffverbrauch ohne Ausnahme bei dem Muskelgewebe am geringsten, bei der Leber etwas grösser und bei der Milz am grössten; ihre Werte liegen denjenigen nahe, die Kasugai¹³⁾ und Owada¹¹⁾ an der hiesigen Klinik nach derselben Methode gewonnen haben. Während 90 Minuten ist der Sauerstoffverbrauch konstant und läuft geradlinig, wie Fig. 1 zeigt, in der die Ergebnisse des Versuchs 1 in Kurven angegeben sind. Bei mit ultratiefer Kälte behandelten Geweben aber ist der Sauerstoffverbrauch im Vergleich mit dem der Kontrollgewebe deutlich vermindert, und zwar ist der Kälteeinfluss desto grösser, je lebhafter die Gewebsatmung bei normalem Gewebe ist. Wie man aus Tab. 2 ersieht, in der die 60-Minuten-Werte des Sauerstoffverbrauchs pro mg pro Stunde (ccm) angegeben sind, beträgt die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs gegenüber dem Kontrollversuch in Durchschnittswerten beim Muskelgewebe etwa 23,4%, bei der Leber etwa 34,6% und bei der Milz etwa 75,1%. Die Milz, deren normales Gewebe den grössten Sauerstoffverbrauch zeigt, zeigt nach der Kältewirkung einen kleineren Sauerstoffverbrauch als normale Leber, ja es gibt sogar solche

Tabelle 1. Fortsetzung.

(cmm pro mg)									
Leber					Milz				
15'	30'	45'	60'	90'	15'	30'	45'	60'	90'
0,594	1,359	1,884	2,606	3,891	0,965	2,011	2,753	3,804	5,721
0,453	0,957	1,416	1,794	2,368	0,322	0,637	0,918	1,037	1,429
0,705	1,312	2,276	2,813	4,218	1,117	1,948	3,147	4,102	6,096
0,454	0,946	1,312	1,842	2,594	0,254	0,510	0,775	0,958	1,363
0,591	1,098	1,852	2,395	3,564	0,764	1,407	2,153	2,914	4,295
0,423	0,915	1,427	1,826	2,589	0,251	0,513	0,754	0,978	1,376
0,583	1,267	1,813	2,496	3,748	0,924	2,256	3,285	4,501	6,493
0,456	0,943	1,512	1,987	2,755	0,216	0,523	0,718	0,898	1,273
0,778	1,625	2,512	3,314	4,912	1,032	1,927	3,045	3,926	5,801
0,487	1,004	1,426	1,961	2,853	0,284	0,598	0,878	1,109	1,517
0,823	1,534	2,457	3,424	5,105	1,052	2,016	3,068	4,212	6,047
0,452	0,979	1,324	1,832	2,912	0,257	0,593	0,857	1,217	2,032
0,625	1,278	1,852	2,553	3,846	1,104	2,271	3,308	4,211	5,743
0,446	0,947	1,405	1,765	2,398	0,246	0,534	0,796	0,967	1,229
0,712	1,524	2,215	3,023	4,517	1,076	2,164	3,132	4,316	6,269
0,497	0,953	1,518	1,986	2,818	0,213	0,475	0,681	0,957	1,554
0,774	1,551	2,225	3,015	4,487	1,036	2,183	3,209	4,313	6,447
0,459	0,946	1,362	1,916	2,762	0,248	0,515	0,697	0,958	1,464
0,662	1,273	1,924	2,627	3,866	1,078	2,313	3,275	4,603	6,436
0,406	0,920	1,251	1,746	2,616	0,296	0,553	0,781	0,987	1,506
0,779	1,501	2,397	3,143	4,475	1,197	2,568	3,943	5,090	6,712
0,486	1,098	1,524	1,896	2,368	0,394	0,721	1,135	1,398	1,927

Tabelle 2.

Versuchs-Nr.	Versuchskaninchen			O ₂ -Verbrauch (cmm pro mg pro Std.)								
	Körpergewicht (kg) u. Geschlecht	Erythrozytenzahl (Millionen)	Hb. (g/dl)	Muskel			Leber			Milz		
				Kontrolle	Behandelt	Diff. in %	Kontrolle	Behandelt	Diff. in %	Kontrolle	Behandelt	Diff. in %
1	2,11 ♂	6,98	13,73	1,232	1,075	-12,7	2,606	1,794	-31,1	3,804	1,037	-72,7
2	1,93 ♂	7,25	14,12	1,302	1,101	-15,4	2,813	1,842	-34,5	4,102	0,958	-76,6
3	2,27 ♂	7,34	14,36	0,906	0,757	-16,4	2,395	1,826	-23,7	2,914	0,978	-66,4
4	1,96 ♀	6,81	13,36	1,097	0,884	-19,4	2,496	1,987	-20,4	4,501	0,898	-80,0
5	2,08 ♂	7,42	14,58	1,203	0,972	-19,2	3,314	1,961	-40,8	3,926	1,109	-71,7
6	1,74 ♂	7,31	14,18	1,126	0,902	-19,9	3,424	1,832	-46,5	4,212	1,217	-71,1
7	2,06 ♀	6,96	13,70	1,307	1,002	-23,3	2,553	1,765	-30,9	4,211	0,967	-77,0
8	1,78 ♂	7,37	14,44	1,409	1,054	-25,2	3,023	1,986	-34,3	4,316	0,957	-77,8
9	1,85 ♂	7,13	14,00	1,439	1,072	-25,5	3,015	1,916	-36,4	4,313	0,958	-77,8
10	1,95 ♀	7,40	14,66	1,407	0,822	-41,6	2,627	1,741	-33,5	4,603	0,987	-78,5
11	2,20 ♂	6,86	13,47	1,896	1,322	-30,3	3,143	1,896	-39,7	5,090	1,398	-72,5
Durchschnitt				1,302	0,997	-23,4	2,855	1,868	-34,6	4,181	1,042	-75,1

Stücke, bei denen der Sauerstoffverbrauch noch kleiner als der des Muskelgewebes ist. Wie auch aus Fig. 1 ersichtlich ist, kann man nach 60 Minuten bei manchen Fällen eine Neigung zu geringer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beobachten.

Von hohem Interesse ist die Angabe von Dixon und Elliot¹⁴⁾, dass die Gewebsatmung durch Cyanid teilweise gehemmt wird. Wenn auch Warburg¹⁵⁾ sie verneint, wollen eine Reihe Autoren dieser Meinung anschliessen; Stare u. Elvehjem¹⁶⁾ fanden, dass durch M/100 Cyanid ca. 2/3 der

Gewebsatmung gehemmt werden, während ca. 1/3 ein cyanresistentes At-

mungssystem ist, und sind der Ansicht, dass die durch Cyanid gehemmten $\frac{2}{3}$ der totalen Atmung dem Oxygenasesystem zuzuschreiben sind, welches auf „Oxygenase“ beruht, durch die, wie Cook, Haldane und Mapson¹⁷⁾ meinen, die Sauerstoffmoleküle aktiviert werden. Kisch¹⁸⁾ stellte fest, dass die cyanresistente Restatmung je nach den Gewebearten verschieden ist, d. h. die Hemmung der Gewebsatmung durch Cyan bei der Retina am grössten, auch bei der Niere und der Leber erheblich und bei dem Zwerchfell und der Herzkammer am geringsten ist. Zieht man diese Tatsache in Betracht, so kann man annehmen, dass sich die Gewebsatmung nicht durch ein einzelnes Enzym, sondern vielmehr durch verschiedene Enzymsysteme vollzieht, die je nach den Gewebearten verschieden gestaltet sind. Auch die Tatsache, dass in vorliegenden Versuchen die Gewebsatmung von Milz, Leber und Muskel durch ultratiefe Kälte in verschiedenem Grade gehemmt wird, scheint mit derjenigen in einem innigen Zusammenhang zu stehen, dass sich das Enzymsystem je nach den Gewebearten verschieden gestaltet. Aber die Gewebsatmung lässt sich jetzt nicht vollständig allein von dem enzymatischen Standpunkt aus erklären.

Lambert und Hanes¹⁹⁾ fanden durch Gewebekultur des Hühnerembryonenherzens, dass das Gewebe durch anhaltendes Gefrieren getötet wird, während es kurzes Gefrieren überlebt. Klinker²⁰⁾ aber stellte durch Gewebekultur fest, dass sowohl bei Geschwulst- als auch bei Normalgewebe, auch wenn sie durch ultratiefe Kälte (-196°C und -253°C) behandelt werden, noch überlebende Zellelemente vorhanden sind. Daraus kann man schliessen, dass durch die Einwirkung der ultratiefen Kälte des flüssigen Sauerstoffs die Lebensfähigkeit des Gewebes zwar stark geschädigt wird, aber nicht alle Zellen getötet werden. Diese Annahme wird in E. mit der Tatsache in einer bestimmten Beziehung stehen, dass in vorliegenden Versuchen die Gewebsatmung auch nach der Einwirkung ultratiefer Kälte von ungefähr -200°C noch nicht Null wird und sich der Sauerstoffverbrauch noch vollzieht, wenn auch der Grad seiner Abnahme je nach den Gewebearten verschieden ist.

Den Einfluss der Kälte auf die Gewebsatmung haben Lipschütz und Veshnjakov²¹⁾, auf die Weise untersucht, dass sie das Ovarium des Meerschweinchens durch eine Kältemischung von Eis und Kochsalz abkühlten. Zu demselben Zweck liess Ogata²²⁾ die Leber von Frosch, Kröte und Maus durch Kohlensäureschnee und Nomura²³⁾ das Lungengewebe der Maus und die Gallenblasewand von Kaninchen durch eine Kältemischung von Eis und Kochsalz gefrieren. Dabei fanden sie alle eine erhebliche Hemmung der Gewebsatmung. Lipschütz und Veshnjakov stellten fest, dass der Sauerstoffverbrauch bei durch Kälte behandeltem Gewebe am Anfang

konstant bleibt und später rasch abnimmt. Diese Angabe deckt die Tatsache, dass in Fig. 1 beim mit ultratiefer Kälte behandelten Gewebe der Kurvenaufstieg nach Ablauf von 60 Minuten mehr oder minder herabgesetzt wird.

Über den Mechanismus der Hemmung der Gewebsatmung durch die Kältewirkung meinten Lipschütz und Veshnjakov²¹⁾, aus der Tatsache, dass die Gewebsatmung von der Struktur der Zellen abhängig ist und dass sie, wenn man den Eierstock vom Meerschweinchen nur mit Sand zerreibt, statt ihn frieren zu lassen, fast Null wird, könne man schliessen, dass die Schädigung durch Gefrieren wahrscheinlich auf einer Strukturveränderung der Zellen beruhe. Auch Ogata²²⁾ führte den Einfluss des Gefrierens auf irgendeine Veränderung der Zellstruktur zurück. Nomura²³⁾ stellte fest, dass die Gewebsatmung durch Abkühlung nur in geringem Masse beeinflusst wird, während sie durch Gefrieren, selbst wenn die hierbei angewandten Temperatur nicht niedriger sind als die der Abkühlungsversuche, erheblich gehemmt wird. Von Moran²⁴⁾ wurde erkannt, dass *M. sartorius* und *gastrocnemius* des Frosches im Aussehen und osmotischen Charakter keine Veränderung zeigen, wenn sie auch auf eine Temperatur von unter 0°C abgekühlt werden. Wenn man sie aber gefrieren lässt, so zeigen sie eine erhebliche Veränderung, und beim Auftauen wird eine saure Flüssigkeit in grosser Menge ausgeschieden. Nomura²³⁾ meinte, die Herabsetzung der Gewebsatmung durch Gefrieren nicht auf einer Veränderung des Protoplasmas selbst, sondern vielmehr auf einer mechanischen Zerstörung des Zellprotoplasmas beruhe, welche durch interzelluläre Eisbildung verursacht werde.

Mit Rücksicht auf das Gesagte unterliegt es keinem Zweifel, dass die Herabsetzung der Gewebsatmung durch ultratiefe Kälte nicht durch die Niedrigkeit der Temperatur allein verursacht wird, sondern dass dabei das Gefrieren des Gewebes eine bedeutende Rolle spielt. Beim Gefrieren des Gewebes geht selbstverständlich eine interzelluläre Eisbildung vor sich, besonders unter der Einwirkung ultratiefer Kälte wie in vorliegenden Versuchen tritt sie auch intrazellulär ein, wobei unter dem starken Drucke dieses gebildeten Eises die Struktur der Gewebezellen wird zerstört. Wenn die Temperatur noch weiter sinkt, zieht das Eis sich zusammen, wodurch das Gewebe endlich zerrissen wird. Man sieht ja nach dem Auftauen unzählige Risse. Obgleich Nomura mit Rücksicht darauf, dass Lungengewebe und Gallenblase auch nach Gefrieren und Auftauen noch weich bleiben, eine Veränderung des Protoplasmas verneinen will, stellte es sich aus den Ergebnissen vorliegender Versuche heraus, dass Muskelgewebe sehr elastisch und Milz und Leber sehr weich werden, woraus sich auf eine erhebliche Veränderung des kolloidalen Zustandes des Protoplasmas schliessen lässt. Wenn auch das Wasser, welches eine intrazelluläre Eisbildung herbeiführt, letzten Endes im Protoplasma

vorhanden ist, wird es doch nicht immer leicht sein, dass es nach dem Auftauen wieder mit dem durch den Verlust des Wassers dichter gewordenen Protoplasma den früheren kolloidalen Zustand herstellt. Andererseits hat Moriguti²⁵⁾ an der hiesigen Klinik festgestellt, dass verschiedene Eiweissarten durch ultratiefe Kälte deutliche Veränderungen erleiden. Darum wird es eine strikte Tatsache sein, dass durch ultratiefe Kälte eine irreversible Veränderung des Protoplasmas hervorgerufen wird.

Dass unter verschiedenen Enzymsystemen, welche an der Gewebsatmung teilnehmen, ein solches vorhanden seinkann, dessen Wirkung durch den Einfluss ultratiefer Temperatur verändert wird, ist auch nach meinen vorangehenden Arbeiten¹⁰⁾ nicht undenkbar. Vielleicht gibt es auch ein solches, dessen fermentative Wirkung durch Zerstörung der Zellstruktur und Zustandsänderung des Protoplasmas ungünstig beeinflusst wird. Dies klar zu deuten ist aber heute, da man über die biologischen Wirkungen ultratiefer Kälte nicht ganz im klaren ist, fast unmöglich. Wir erwarten hierin viel von den zukünftigen Untersuchungen.

Schluss.

Beim normalen Kaninchen ist die Grosse der Gewebsatmung Muskel < Leber < Milz. Lässt man auf diese Gewebearten die ultratiefe Kälte des flüssigen Sauerstoffs (Siedepunkt -183°C) einwirken:

1. So werden Muskelgewebe elastisch und Milz und Leber weich.
2. Die Gewebsatmung nimmt bei allen Gewebearten erheblich ab, wobei die Herabsetzung am Muskel am geringsten und in der Milz am stärksten erfolgt.

Literatur.

- 1) Warburg, Biochem. Z., 1933, **266**, 7; ebenda, 1938, **296**, 294; Ergeb. Enzymforsch., 1938, **7**, 210.
- 2) Krebs, Klin. Wschr., 1932, **11**, 1744.
- 3) Keilin, Ergeb. Enzymforsch., 1933, **2**, 239.
- 4) Green, Biochem. J., 1936, **30**, 2095.
- 5) Szent-Györgyi, Hoppe-Seylers Z., 1936, **245**, 106.
- 6) Theorell, Biochem. Z., 1936, **288**, 317.
- 7) Euler u. Adler, Hoppe-Seylers Z., 1937, **245**, 217.
- 8) Haas, Biochem. Z., 1938, **298**, 378.
- 9) Thunberg, Ergeb. Enzymforsch., 1938, **7**, 163.
- 10) Kusaka, Tohoku J. Exp. Med., 1944, **47**, 296.
- 11) Owada, Tohoku J. Exp. Med., 1936, **30**, 186.
- 12) Warburg, Biochem. Z., 1923, **142**, 317.
- 13) Kasugai, Tohoku J. Exp. Med., 1935, **27**, 525.
- 14) Dixon u. Elliot, Biochem. J. 1928, **23**, 812.

- 15) Warburg, Biochem. Z., 1931, **231**, 493.
 - 16) Stare u. Elvehjem, Amer. J. Physiol., 1933, **105**, 655.
 - 17) Cook, Haldane u. Mapson, Biochem. J., 1931, **25**, 534.
 - 18) Hisch, Biochem. Z., 1933, **263**, 75.
 - 19) Lambert u. Hanes, Virchows Arch., 1913, **211**, 89.
 - 20) Klinke, Klin. Wschr., 1940, 585.
 - 21) Lipschütz u. Veshnjakov, Pflügers Arch., 1930, **223**, 56.
 - 22) Ogata, Cytologia, 1931, **3**, 1.
 - 23) Nomura, Cytologia, 1932-33, **4**, 257.
 - 24) Moran, Proc. Roy. Soc. London, 1930, B, **105**, 177.
 - 25) Moriguti, Tohoku J. Exp. Med., 1942, **42**, 358.
-