Acta Medica Okayama

Volume 5, *Issue* 2 1936 *Article* 3

JUNI 1937

Der Einfluβ des 2, 6-Dichlorphenolindophenol auf den Gaswechsel und die Milchsaurebildung im Froschmuskel.

Tyujiro Seto*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Aus dem Physiologischen Institut der Med. Fakultät Okayama
(Direktor: Prof. Dr. S. Oinuma).

Der Einfluß des 2, 6-Dichlorphenolindophenol auf den Gaswechsel und die Milchsäurebildung im Froschmuskel.

Von

Tyûjirô Seto.

Eingegangen am 2. September 1936.

Fritz Lipmann hat veröffentlicht, daß 2,6-Dichlorphenolindophenol die Glykolyse im Muskelextrakt hemmt. Im selben Jahre experimentierten *Waldschmidt-Leitz, Mc Donald,* u. a. mit dem Ergebnis, daß beim Medium ohne Zusatz von Glykose die Respiration des Karzinomgewebes vollständig gehemmt war, während sie beim Medium nach Zusatz von Glykose nicht von 2, 6-Dichlorphenolindophenol beeinflußt wird. *K.A.C Elliot* hat kürzlich über den Einfluß des 2, 6-Dichlorphenolindophenol auf die Respiration des Tumors und der Niere mitgeteilt. Um festzustellen, wie 2, 6-Dichlorphenolindophenol den Gaswechsel und die Milchsäurebildung des Skeletmuskels beeinflußt, hat der Verfasser folgenden Versuch angestellt. Als Versuchsobjekt wurde fast ausschließlich Rana nigromakulata (in Winter) benutzt, von dem mehrere Exemplare in dem in Keller des physiologischen Institutes eingerichteten Ranarium aufbewahrt worden waren.

Versuch A.

Verfasser maß die CO_2-Produkte des isolierten Sartorius, der mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt worden war, mit denen des nicht behandelten Sartorius nach der *Parker*schen Indikatormethode. Als erstes wurde der Sartorius 60 Minuten lang in 2, 6-Dichlorphenolindophenollösung (0.01 % in Ringer) gelegt und dann in ein geschlossenes Respirationsrohr aufgehängt (Die Einzelheiten dieser Methode und die Berechnung wurden bereits veröffentlicht).

Der besseren Übersicht halber habe ich die Resultate in Tabellen aufgeführt.

Tabelle 1.

CO_2-Produkten eines isolierten Sartorius normaler Frösche (in Ruhe).

Temperatur °C	Volum des Respirationsrohr cc	Gewicht des Sartorius mg	Dauer der Schütterung min.	CO_2-Produktion pro g pro min. mg
15°	6.5	39	38′	0.0269
"	"	"	32′	0.0317
"	"	"	"	"
"	"	"	35′	0.0290
"	"	32	33′	0.0375
"	"	"	53′	0.0233
14°	"	43	32′	0.0268
"	"	"	43′	0.0214
"	"	63	27′	0.0233
"	"	"	30′	0.0209
Mittelwert		43.2	35.5′	0.0272*

* Die Dezimalstellen von der fünften Stelle ab sind fortgelassen.

Tabelle 2.

CO_2-Produkte eines isolierten Sartorius, der 60 Minuten lang in Ringer mit Zusatz von 2, 6-Dichlorphenolindophenol (in Konzentration von 1 : 10,000) getaucht wurde (in Ruhe).

Temperatur °C	Volum des Respirationsrohr cc	Gewicht des Sartorius mg	Dauer der Schütterung min.	CO_2-Produktion pro g pro min. mg
15°	6.5	42	35′	0.0269
"	"	"	48′	0.0196
"	"	"	38′	0.0246
"	"	30	52′	0.0254
14°	"	36	44′	0.0250
"	"	"	41′	0.0268
"	"	"	40′	0.0275
"	"	56	25′	0.0240
"	"	"	27′	0.0262
"	"	"	34′	0.0262
Mittelwert		43.2	38.4′	0.0246

Tabelle 3.

CO_2-Produkten eines isolierten Sartorius normaler Frösche (in Tätigkeit).

Temperatur °C	Volumen des Respirationsrohrs cc	Gewicht des Sartorius mg	Dauer der Erschütterung min.	CO_2-Produktion pro g pro min. mg
15°	6.5	39	28′	0.0363
"	"	"	29′	0.0350
"	"	"	"	"
14°	"	50	20′	0.0396
"	"	"	15′	0.0528
"	"	"	18′	0.0440
"	"	"	27′	0.0329
"	"	"	33′	0.0240
"	"	"	35′	0.0226
"	"	"	37′	0.0214
Mittelwert		46.7	27.1′	0.0343

Tabelle 4.

CO_2-Produktion eines isolierten Sartorius, der 60 Minuten lang im 2, 6-Dichlorphenolindophenol zugesetzten Ringer (in Konzentration von 1/10,000) getaucht wurde (in Tätigkeit).

Temperatur °C	Volum des Respirationsrohr cc	Gewicht des Sartorius mg	Dauer der Schütterung min.	CO_2-Produktion pro g pro min. mg
15°	6.5	34	25′	0.0466
"	"	"	37′	0.0315
14°	"	48	32′	0.0251
"	"	"	39′	0.0211
"	"	"	37′	0.0223
"	"	"	"	"
"	"	"	41′	0.0201
"	"	"	40′	0.0206
"	"	55	35′	0.0205
"	"	"	34′	0.0212
Mittelwert		46.6	35.7	0.0229

Versuch B.

O_2-Verbrauch eines isolierten Sartorius, der vorher mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt worden war, im Vergleich mit

einem nicht behandelten Sartorius, mit der *Winkler*schen Methode gemessen.

Erforderliche Lösung für die *Winkler*sche Methode sind:

1) 100 g chemisch reines, nitritfreies Natriumhydroxyd wird in 200 g destiliertem Wasser gelöst und nach dem Erkalten 30 g Jodkalium zugesetzt. Die Lösung wird in einer braunen Flasche mit gut schließendem, eingefettetem Glasstopfen aufbewahrt. Sie darf beim Ansäuren nur wenig Kohlensäure entwickeln.

2) Man löst 40 g reines kristallisiertes Manganchlorür ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) in destilliertem Wasser, und füllt danach 100 cc zu. Die Lösung muß eisenfrei sein und aus einer angesäuerten Jodkaliumlösung nur Spuren von Jod ausscheiden.

3) $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfatlösung, aus der kurz vor dem Gebrauch $\frac{n}{100}$ Lösung hergestellt wird, da diese sich schlecht hält. Die konzentrierte Lösung ist in mit Glasstöpsel verschlossenen braunen Flaschen gut haltbar.

4) Konzentrierte chlor- und eisenfreie reine Salzsäure von 28%, sp. Gew. 1.19.

Der Froschsartorius wird in 2, 6-Dichlorphenolindophenol bei Zusatz von Ringer mit Konzentration 1/10000 getaucht. Nach einer Stunde wird er an durch den Korkpfropfen gebohrte Silberdrähte gehängt und der Pfropfen in ein mit Ringer gefülltes, luftblasenfreies Reagenzrohr. Die Reizung des Muskels wird 60 Minuten lang angehalten. Nach der Reizung wird der Muskel herausgenommen und je 0.5 cc der ersten und zweiten Lösung in die Röhre eingeflößt und diese unter Vermeidung eines Eintritts von Luftblasen verschlossen. Dann schüttelt man sie gut durch und läßt die Probe beliebig lang stehen. Nach mindestens 2 stündigem Stehen, wenn sich der Niederschlagabgesetzt hat, läßt man 0.5 cc Salzsäure (Lösung 4) einfließen und löst den Niederschlag. Man spült das Gemisch quantitativ in einen Erlenmeyerkolben und titriert sofort unter Zusatz von Stärkelösung als Indikator mit Lösung 3.

Berechnungsformel; $$X = \frac{0.08\,(x - y)}{\frac{ab}{1000}}$$

X = O_2-Verbrauch pro g pro mim.
a = Gewicht des Sartorius (mg)
b = Zeitdauer des Versuchs (min.)
x = Verbrauchte Menge des Thyosulfats (ohne Muskel) in cc
y = Verbrauchte Menge des Thyosulfats (mit Muskel) in cc.

Die Resultate sind folgende:

Tabelle 5.

A) O_2-Verbrauch des isolierten Sartorius normaler Frösche (in der Tätigkeit).

Temperatur °C	Gewicht des Sartorius mg	Dauer des Versuchs min.	Volum des Reagenzrohrs cc	Verbrauchte Menge des Thiosulfats ohne Muskel cc	Verbrauchte Menge des Thiosulfats mit Muskel cc	O_2-Verbrauch pro g pro min. mg
15°	74	60	6.5	1.0	0.8	0.0036
13°	41	„	„	1.1	0.9	0.0063
„	47	„	„	1.3	1.1	0.0056
„	52	„	„	1.0	0.8	0.0051
14°	42	„	„	1.1	0.9	0.0063

B) O_2-Verbrauch des isolierten Sartorius, der sich 60 Minuten lang in mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol zugesetztem Ringer (in Konzentration von 1/10,000) befand.

Temperatur °C	Gewicht des Sartorius mg	Dauer des Versuchs min.	Volum des Reagenzrohrs cc	Verbrauchte Menge des Thiosulfats ohne Muskel cc	Verbrauchte Menge des Thiosulfats mit Muskel cc	O_2-Verbrauch pro g pro min. mg
14°	73	60	6.5	1.0	1.0	0
„	59	„	„	1.0	1.0	0
13°	26	„	„	1.0	1.0	0
„	40	„	„	1.5	1.5	0
14°	44	„	„	1.1	1.1	0

Versuch C.

Die 2, 6-Dichlorphenolindophenollösung (0.5% in Ringer) wird in die Bauchvenen des Frosches in einem Verhältnis von 0.01% zur gesammten Blutmenge (ca 6.4% des Körpergewicht angenommen) injiziert. 60 Minuten nach der Injektion wurde der N. ischiadicus präpariert und durch diesen die Muskeln der hinteren Extremitäten mit relativ langem Intervall gereizt und danach in O_2-reichem Medium gelassen. Den Muskel läßt man zunächst in einer Kältemischung gefrieren und bestimmt dann die Milchsäure in diesem Muskeln nach *Fletcher* und *Hopkins* als Zinklaktat. Zur Kontrolle benutzte der Verfasser die Milchsäurebestimmung des Froschmuskels unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen, aber ohne 2, 6-Dichlorphenolindophenol.

Methode: Der hartgefrorene Muskel wird mit einem eiskalten Messer zerschnitten, dann in einem eisgekühlten Mörser zerrieben,

und in einer eisgekühlten Schale gewogen. Die gut zerriebene Muskelmasse wird dreimal unter längerem Stehen (das erste Mal über kaltem Alkohol extrahiert. Jedesmal wird durch Musselin filtriert und die Muskelmasse stark abgepreßt. Die vereinigten alkoholischen Extrakte werden durch ein Papierfilter filtriert. Das klare gelbe Filtrat wird im Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wird in ca 100 cc heißen Wassers aufgenommen. Man fügt 2.5 g Tierkohle hinzu, erwärmt eine halbe Stunde im Wasserbade, kocht auf und filtriert durch ein kleines Filter. Es wird mit kochendem Wasser einmal nachgewaschen, das Filter mitsamt seinem Inhalte wird sodann in ein Becherglas übertragen, Wasser hinzugefügt, durch ein neues Filter filtriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Das klare farblose Filtrat wird im Wasserbade eben zum Trocknen gebracht, der Rückstand wird mit heißem Wasser in Portionen aufgenommen, in einen Meßzylinder von 100 cc mit eingeschliffenem Stöpsel übertragen, derart, daß das Volumen schließlich genau erreicht ist, 15 cc gesättigter Phosphorsäurelösung und 60 cc Äther hinzugefügt und gründlich durchgeschüttelt, neuer Äther in gleicher Menge hinzugefügt und der Vorgang fünfmal wiederholt. Die vereinigten Ätherextrakte werden durch ein trockenes Filter filtriert, der Äther aus einem kleinen Kolben abdestilliert, der Rückstand in heißes Wasser aufgenommen, die Lösung mit 0.5 g ausgewaschenem Zinkkarbonat digeriert, aufgekocht und in eine gewogene Glasschale filtriert. Es wird zum Trocknen abgedampft und im Trockenschranke zur Gewichtkonstanz gebracht. Das Gewicht ergibt wasserfreies Zinklaktat.

Resultate: Die Milchsäurebestimmung der Extremitätmuskeln, die mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt, durch Tätigkeit (Reizdauer 20 Minuten) ermüdet und danach 20 Minuten in O_2-reichem Medium gelassen wurden.

Fall 1. Gewicht der Muskeln 15.1g...Zinklaktat 0.0113 g (0.0753 g %), Temperatur 16°C.

Die Milchsäurebestimmung des Froschmuskels unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen, aber ohne 2, 6-Dichlorphenolindophenol.

Fall 2. Gewicht der Muskeln 4.3 g...Zinklaktat 0.0014 g (0.0325 g %), Temperatur 15°C.

Die Milchsäurebestimmung des Froschmuskels der mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt, 2 Minuten in Tätigkeit gesetzt und danach 60 Minuten in O_2 gelassen wurde.

Fall 3. Gewicht der Muskeln 9.8 g...Zinklaktat 0.0035 g (0.0357 g %), Temperatur 15°C.

Fall 5. Gewicht der Muskeln 5.0 g...Zinklaktat 0.0020 g (0.0400 g %),

Temperatur 13°C.

Fall 7. Gewicht der Muskeln 3.0 g...Zinklaktat 0.0010 g (0.0333 g %), Temperatur 10°C.

Die Milchsäurebestimmung des Froschmuskels unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen, aber ohne 2, 6-Dichlorphenolindophenol.

Fall 4. Gewicht der Muskeln 4.0 g...Zinklaktat 0.0010 g (0.0250 g %), Temperatur 11°C.

Fall 6. Gewicht der Muskeln 5.0 g...Zinklaktat 0.0015 g (0.0300 g %), Temperatur 11°C.

Die Muskeln, die nicht in Tätigkeit gesetzt wurden, zeigen keinen nennenswerten Unterschied zwischen den mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelten und nicht behandelten. Wenn man den Froschsartorius mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt, bekommt man CO_2-bildung ohne Extrasauerstoffverbrauch.

Die Milchsäuremenge des Froschmuskels, der mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol behandelt durch andauernde Tätigkeit ermüdet und danach in ein O_2-reiches Medium versetzt wird, ist größer als der Gehalt der Kontrolle.

Aus diesen Resultaten kann man schließen, daß 2, 6-Dichlorphenolindophenol wahrscheinlich die Oxydation der Milchsäure des Skelettmuskels hemmt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *S. Oinuma* für die freundliche Leitung meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Literatur.

K. A. C. Elliot, Nature No. 3381, Vol. 134, 1934. — *Fritz Lipmann*, Biochem. Zeitschrift Bd. 265, 1933. — *O. Meyerhof*, Die chemischen Vorgänge im Muskel 1930. — *Parker*, Journal of general physiology Vol. 7. — *Franz Müller*, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden herausgegebe von E. Abderhalden III. i, S. 634. — *Fletcher* u. *Hopkins*, Journal of physiology Vol. 35, 1906 - 1907. — *Abderhalden*, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden Abt. I. (chem. Teil), 6. — *M. Katori*, Okayama Igakkai Zasshi Jg. 46, Nr. 4, 1934. — *T. Seto*, Okayama Igakkai Zasshi Jg. 48, Nr. 8, 1936.