

Die Bedeutung der Homogenisationsart und -intensität für die Größe und Konstanz der Sauerstoffaufnahme von Meerschweinchen-Leberhomogenat

The Influence of Mode and Intensity of Homogenization on the Absolute Value and Stability of Oxygen Consumption of Guinea Pig Liver Homogenates

H. J. Schmidt, U. Schaum und J. P. Pichotka

Physiologisches Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 32 c, 908–912 [1977]; eingegangen am 1. August 1977)

Methods of Homogenisation, Intensity of Homogenisation, Stability and Reproducibility of Oxygen Uptake, Liver Homogenates

The influence of five different methods of homogenisation (1. The method according to Potter and Elvehjem, 2. A modification of this method called Potter S, 3. The method of Dounce, 4. Homogenisation by hypersonic waves and 5. Coarse-grained homogenisation with the "Mikrofleischwolf") on the absolute value and stability of oxygen uptake of guinea pig liver homogenates has been investigated in simultaneous measurements. All homogenates showed a characteristic fall of oxygen uptake during measuring time (3 hours). The modified method according to Potter and Elvehjem called Potter S showed reproducible results without any influence by homogenisation intensity.

Einleitung

Homogenate von Lebergewebe wurden bisher von vielen Autoren für pharmakologische bzw. pharmako-kinetische Fragestellungen verwendet. Dabei werden zum Teil sehr unterschiedliche Homogenisationsformen und insbesondere Homogenisationsintensitäten bei ein und demselben Gewebe verwendet (zusammenfassende Darstellung bei Berthet¹, Kleinzeller² und Umbreit³). Bei den meisten Autoren wird darauf verzichtet, Angaben über die Homogenisationsintensität zu machen, so daß die Ergebnisse kaum zu vergleichen sind. Es fehlt vor allen Dingen in der bisher bekannten Literatur eine Untersuchung, die den Einfluß der verschiedenen Homogenisationstechniken bzw. deren Intensität auf irgendeinen Parameter des homogenisierten Gewebes hin untersucht. Diese Untersuchung versucht, mit Hilfe der Messung der Sauerstoffaufnahme des homogenisierten Gewebes einen kleinen Beitrag zu leisten, die Vergleichbarkeit der mit verschiedenen Methoden erhobenen Ergebnisse unter Umständen zu ermöglichen.

Methodik

Die Sauerstoffaufnahme von Meerschweinchenleberhomogenat wurde manometrisch nach der direkten Warburg-Methode^{2–4} bestimmt. Handelsübliche

Sonderdruckanforderungen an Prof. J. P. Pichotka, Physiologisches Institut der Universität Bonn, Nußallee 11, D-5300 Bonn 1.

Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 500 ± 50 g wurden durch Nackenschlag und Dekapitation getötet. Für die Homogenisation wurde jeweils der Lobus dexter hepatis verwendet. Im direkten Vergleich wurden folgende Homogenisationsverfahren geprüft:

1. Homogenisation nach Potter und Elvehjem (Geräte der Fa. B. Braun, Melsungen). Bei diesem Verfahren standen verschiedene Stempel-Gefäß-Kombinationen (Teflonstempel in Glaszyylinder und Glassstempel in Glaszyylinder) zur Verfügung.
2. Eine Modifikation der Methode nach Potter und Elvehjem (Gerät Potter S, Fa. B. Braun, Melsungen), bei der die Stempelumdrehungsgeschwindigkeit lastunabhängig wählbar und wesentlich konstanter ist als bei der Original-Methode.
3. Homogenisation mit Hilfe des Dounce-Homogenisators. Bei dem Verfahren stehen 2 verschiedene Glassstempel (L+S) zur Verfügung. Bei Dounce-L beträgt der Abstand zwischen Wand und Stempel im Mittel 0,25 mm, bei Dounce-S im Mittel 0,06 mm.
4. Ultraschallhomogenisation (Gerät Politron, Fa. Kinematica, Luzern).
5. Grob-Homogenisation mit Hilfe des Mikrofleischwolfs (Fa. B. Braun, Melsungen). Bei diesem Verfahren wird das Lebergewebe durch einen Stempel gegen eine Lochscheibe gedrückt. Ein verhältnismäßig langsam rotierendes Messer schneidet jeweils die Portionen an Lebergewebe ab, die in die Löcher der Lochscheibe hineingedrückt werden. Es standen 6 verschiedene



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

dene Lochscheiben zu Verfügung mit Lochdurchmessern zwischen 0,3 und 2 mm. Der Homogenisationsansatz betrug mit Ausnahme der Grob-Homogenisation (Mikro-Fleischwolf) 1 g Leber auf 6 ml Nährmedium. Die endgültige Konzentration an Lebergewebe betrug somit 143 mg Lebergewebsproben pro ml Homogenat.

Als Nährmedium wurde ausgehend von den Erfahrungen an ungeschnittenen, in der Schichtdicke präformierten Geweben Medium II⁵ verwendet. Die Konzentration der wesentlichen An- und Kationen sind Na⁺ 147,5, K⁺ 5,9, Mg²⁺ 2,4; Cl⁻ 103,1, H₂PO₄²⁻ 4,0, HPO₄²⁻ 22,2, SO₄²⁻ 2,4, HCO₃⁻ 3,6, Pyruvat 4,9, Fumarat 10,8 und Glutaminat 5,0 mval/Liter und Glucose 11,5 mmol/Liter. Mit Ausnahme des Mikro-Fleischwolfverfahrens betrug der Gefäßansatz jeweils 1 ml Homogenat und 2,5 ml Medium II. Im Falle des Mikro-Fleischwolfverfahrens wurde das zerkleinerte Gewebe in Portionen von 80 mg mit Hilfe speziell geformter Löffelchen in 3,5 ml Medium II gegeben. Die Sauerstoffaufnahme wurde bei 37 °C (± 0,02 °C) mit einer Schüttelfrequenz von 40/min und einer Amplitude von 3 cm bestimmt. Die Belüftung der Reaktionseinheiten erfolgte simultan über ein Verteilersystem mit reinem Sauerstoff während der sogenannten Temperatur-Äquilibrierungszeit. Dabei wurden innerhalb von 5 min durch jeden Gefäßansatz 7–8 Liter Sauerstoff geleitet. Der dabei resultierende Sauerstoffdruck in der flüssigen Phase liegt bei 530 ± 27 Torr [Kontrollmessungen mit stabilisierten Pt-Elektroden (Fa. Eschweiler, Kiel)]. Die O₂-Aufnahme wurde mit 12 Meßwerten/Stunde während 3 Stunden Gesamtversuchszeit bestimmt. Die Sauerstoffaufnahme des Leberhomogenates ist angegeben in ml O₂/kg und min. In allen Fällen wurde der Übersichtlichkeit halber der Mittelwert der Sauerstoffaufnahme mit S.D. für jeweils 6 Halbstundenperioden angegeben. Die O₂-Aufnahme der Proben wurde mit einem Rechenprogramm an der Großrechenanlage der Gesellschaft für Mathematik und Datenverarbeitung (G.M.D) in Bonn ermittelt.

Ergebnisse

Die bekannteste und verbreitetste Methode zur Homogenisierung von parenchymatösen Organen ist die Methode nach Potter und Elvehjem⁶, bei der das Gewebe zwischen einem rotierenden Stempel und der Wandung des Gefäßes zerrieben wird. Für dieses Verfahren stehen Stempel und Zylinder unterschiedlicher Abstandsdimension und unterschiedlichen Materials zur Verfügung [bei der Kombination Glasgefäß mit Teflonstempel beträgt die mitt-

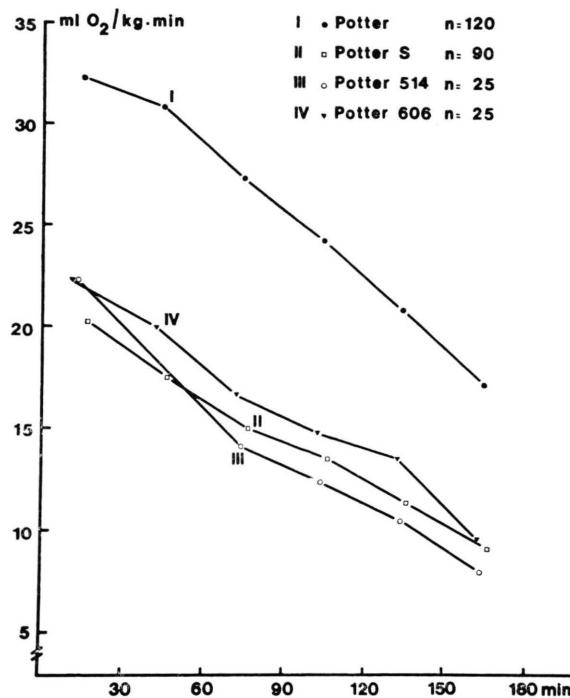


Abb. 1. Vergleich der O₂-Aufnahme von Meerschweincheneleberhomogenat bei Homogenisation mit der Originalmethode (Potter und Elvehjem), I, mit dem Potter-S-Gerät, II, und mit Glasstempeln Potter 514, III, und Potter 606, IV.

lere Spaltbreite 50–60 µm, bei der Kombination Glasstempel in Glaszyylinder etwa 500 µm (Potter 514 und 606)]. Die Prüfung dieser Homogenisationsform ergibt folgendes Ergebnis (Abb. 1):

Die Sauerstoffaufnahme des homogenisierten Gewebes fällt bei den hier gewählten Homogenisationsformen von einem hohen Ausgangswert kontinuierlich und parallel ab; nach 180 min beträgt die Stoffwechselgröße nur noch 50% des Ausgangswertes. Bemerkenswert ist, daß die in Kurve I dargestellte Originalmethode nach Potter und Elvehjem (Teflonstempel in Glaszyylinder) zu wesentlich höheren O₂-Aufnahmen des Homogenates führt. Daß die Benutzung des Teflonstempels an sich nicht die Ursache sein kann, ergibt sich aus der Tatsache, daß die Verwendung des gleichen Stempel-Zylinderpaars im Potter-S-Gerät zu deutlich niedrigeren Sauerstoffaufnahmen führt (Kurve II), die statistisch von den Verläufen der Sauerstoffaufnahme bei Verwendung der Glasstempel nicht zu trennen sind (Kurve III und IV).

Bei der Homogenisation nach Dounce⁷ findet sich ebenfalls ein kontinuierlicher Abfall der Sauerstoff-

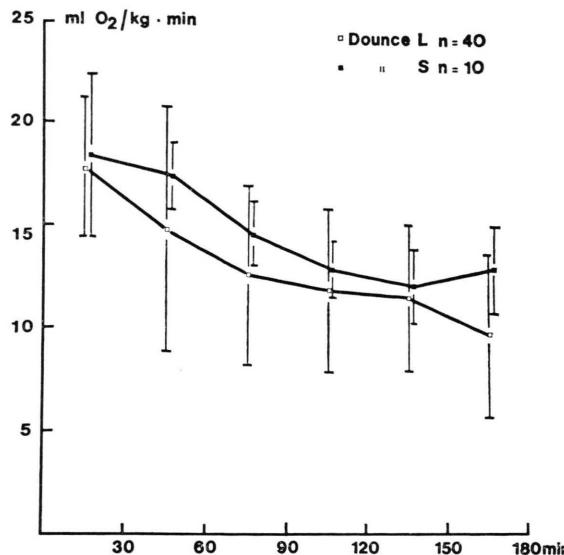


Abb. 2. Homogenisierung nach Dounce. Bei Dounce-L beträgt der Abstand zwischen den Wänden 0,25 mm, bei Dounce-S 0,06 mm.

aufnahme des homogenisierten Gewebes während der Meßzeit (Abb. 2). Die Ausgangswerte und der Abfall während der Versuchszeit sind insgesamt geringer als bei dem Potter-Verfahren. Bemerkenswert ist der außerordentliche Unterschied in der Reproduzierbarkeit bei den beiden Variationen des Verfahrens, wie er sich in der S.D. ausdrückt.

Bei der Ultraschallhomogenisation wurden im Simultan-Vergleich 4 verschiedene Homogenisationszeiten d. h. Intensitäten geprüft. Für eine vollkommene Durchhomogenisierung des Lebergewebes werden ca. 3 sec benötigt. Wir haben darüber hinaus in verschiedenen Schritten bis zum 20fachen dieser Minimalzeit homogenisiert. Das Ergebnis dieser Variation der Homogenisationsintensität ist übersichtlich (Abb. 3). Mit zunehmender Homogenisationszeit fällt die zu Beginn der Versuchszeit bestehende Sauerstoffaufnahme. Die Sauerstoffaufnahme der 4 Kollektive fällt den Anfangswerten entsprechend unterschiedlich steil ab, um sich nach 180 min auf einem gemeinsamen Niveau von etwa 4 ml O_2 /kg und min zu treffen. Eine Verlängerung der Homogenisationszeit über 30 sec hinaus bringt keine weiteren Veränderungen mit sich. Die mit der Ultraschallhomogenisationstechnik erhobenen Befunde widersprechen den Erfahrungen bei einfachen mechanischen Homogenisierungen (Potter-Verfahren). Im allgemeinen ist bei den höheren Graden der mechanischen Homogenisierung die an-

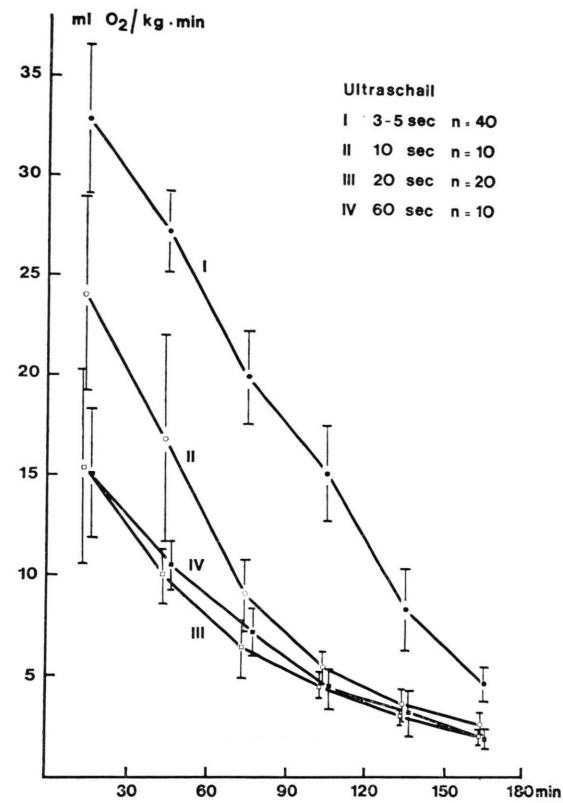


Abb. 3. Homogenisation durch Ultraschall bei Variation der Homogenisationszeit zwischen 3 und 60 sec.

fängliche O_2 -Aufnahme höher und der Abfall über der Meßzeit steiler. In beiden Fällen laufen die Sauerstoffaufnahmewerte der unterschiedlichen Versuchsgruppen im Laufe der Versuchszeit auf ein gemeinsames Niveau hin. Die Erklärung dieses Befundes ist schwierig. Während bei allen anderen Verfahren der mechanischen Homogenisierung im wesentlichen Verbände von einzelnen Zellen bzw. Zellgruppen mikroskopisch nachzuweisen sind, bestehen die Homogenate bei der Ultraschallhomogenisation aus Zelltrümmern, die lichtmikroskopisch nicht weiter zu differenzieren sind. Eine elektronenoptische Präparation von Leberhomogenaten, die 3, 10 und 60 sec lang homogenisiert wurden, kann dieses Phänomen auch nicht restlos erklären. Sicher ist, daß in den 3 untersuchten Homogenaten noch funktionsfähige Mitochondrien vorhanden sind. Die Auswertung mehrerer Schnitte an verschiedenen Stellen des ultrazentrifugierten Homogenates legt die Vermutung nahe, daß mit zunehmender Homogenisationsdauer weniger funktionsfähige Mitochondrien erhalten bleiben.

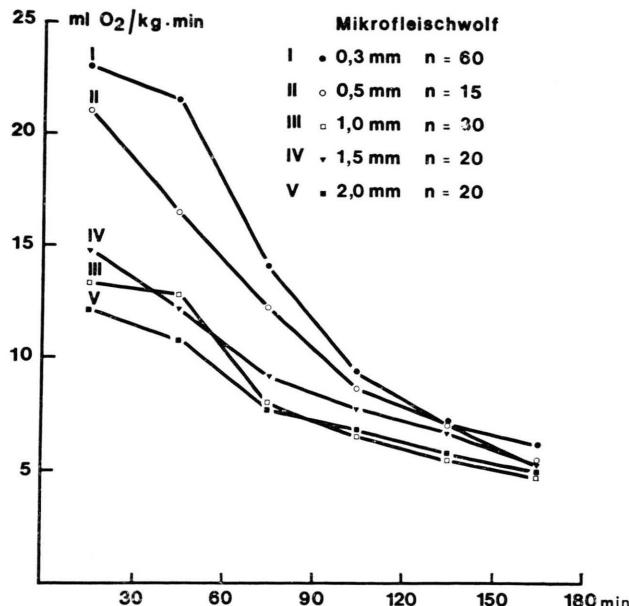


Abb. 4. Homogenisierung mit dem Mikro-Fleischwolf bei Verwendung von 5 verschiedenen Lochscheiben mit Lochdurchmessern zwischen 0,3 und 2 mm. Die zu den Einzelkurven gehörenden S.D.-Angaben finden sich in Tab. I.

Das 1971 von Pette⁸ entwickelte Grobhomogenisationsgerät (Mikrofleischwolf) ist in der Originalversion mit einer Lochscheibe bestückt, deren Löcher einen Durchmesser von 0,3 mm aufweisen. Bei der ersten Prüfung dieses Gerätes fiel uns auf, daß die auf diese Art und Weise homogenisierten Gewebe einen etwas geringeren Sauerstoffverbrauch zu Beginn der Messung aufwiesen als die in simultanen Experimenten geprüften Homogenate mit der Standardmethode nach Potter und Elvehjem. Durch Variation der Lochdurchmesser konnten bei dieser Technik in übersichtlicher Weise unterschiedliche Korngrößen des homogenisierten Gewebes produziert werden. Die erzielten Ergebnisse sind sehr übersichtlich und lassen sich in einfacher Weise beschreiben (Abb. 4). Je kleiner die Löcher der Lochscheibe sind, um so höher ist die O₂-Aufnahme in der Versuchszeit und um so stärker der Abfall über der Meßzeit, d. h. mit zunehmender Korngröße fällt die absolute Stoffwechselintensität. Entscheidend für die Beurteilung dieses Verfahrens ist die Streuung der Meßwerte. Die dabei auftretenden Streuungswerte sind selbst für Homogenate extrem hoch und sind, da sie das Gruppenbild völlig unübersichtlich machen würden, in der folgenden Tabelle angegeben.

Tab. I. Homogenisierung mit dem Mikrofleischwolf.

Korngröße [mm]	Streuung der Einzelwerte [% des Mittelwertes]					
	1. Halbstunde	2.	3.	4.	5.	6.
0,3	± 26	28	25	24	31	30
0,5	18	17	31	55	71	96
1,0	43	31	25	24	25	21
1,5	34	21	18	23	23	15
2,0	32	19	21	16	16	20

Bei fast allen Homogenisationsverfahren wird die Absolutgröße und die Konstanz der Sauerstoffaufnahme des Gewebes durch Dauer und Stärke der Homogenisation bzw. durch die unterschiedliche Korngröße beeinflußt. Für die Frage eines standardisierbaren Homogenates ist es von entscheidender Bedeutung, eine Methode zu finden, die über einen sehr weiten Bereich von Homogenisationszeit bzw. -stärke keine wesentliche Änderung der Sauerstoffaufnahme des zu homogenisierenden Gewebes verursacht und bei dem die Streuung der Meßwerte klein ist. Bei der Homogenisation mit Ultraschall sowie bei der Methode nach Dounce und bei Benutzung des Mikro-Fleischwolfs stellen sich offen-

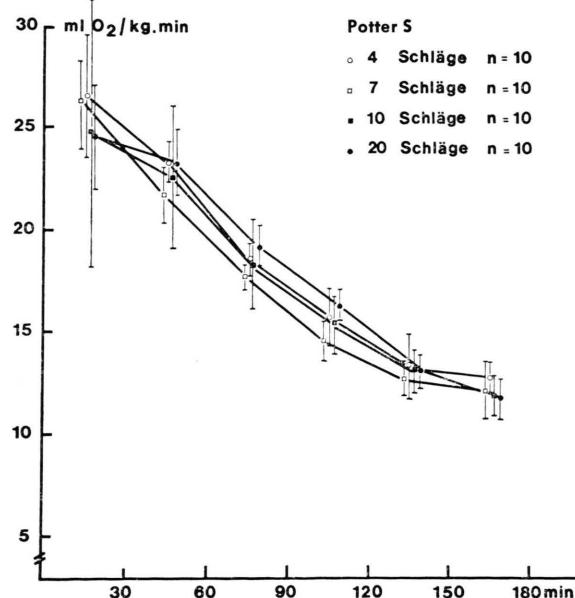


Abb. 5. Homogenisation mit dem Potter-S-Gerät und unterschiedlich intensiver Homogenisierung zwischen 4 und 20 Auf- und Abwärtsbewegungen des Stempels im Glaszyylinder (Schläge).

sichtlich in Abhängigkeit von der Homogenisationszeit bzw. in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Stempels bzw. der verwendeten Lochscheibe zunehmend andere Korngrößen ein, während das Verfahren nach Potter und Elvehjem sich dadurch auszeichnet, daß die Abstandsdimension zwischen Stempel und Pistillwand einigermaßen festgelegt ist. Wir haben die Modifikation der Methode von Potter und Elvehjem, genannt Potter-S, in einer weiteren Versuchsreihe dahingehend untersucht, ob eine wesentliche Zunahme der Homogenisationszeit bzw. -stärke eine Veränderung der Sauerstoffaufnahme bewirkt. Für eine vollkommene Durchhomogenisierung des Lebergewebes sind mindestens 4 Auf- und Abwärtsbewegungen des Teflonstempels im Glaszylinder notwendig. Im simultanen Vergleich von Leberhomogenaten ein und derselben Leber, die mit Hilfe des Potter-S-Gerätes unterschiedlich lang homogenisiert wurden, zeigt sich, daß eine Verfünffachung des Homogenisationsvorganges keine Änderung der absoluten Sauerstoffaufnahme bzw. der Konstanz der Sauerstoffaufnahme des homogenisierten Gewebes mit sich bringt (Abb. 5). Entscheidend für die Beurteilung ist weiterhin, daß bei Homogenisation mit dem Potter-S-Gerät die geringsten und gleichmäßigsten Streuungen der Meßwerte beobachtet wurden. Mit Ausnahme der Werte der 1. Halbstundenperiode betragen die Streuungen in der Regel 6 – 8% des Mittelwertes.

Diskussion

Für die Verwendbarkeit von Gewebshomogenaten als biologische Modelle ist entscheidend, daß das Verhalten der Sauerstoffaufnahme des Homogenates in engen Grenzen reproduzierbar ist. In vielen Untersuchungen (zusammenfassende Darstellungen bei Umbreit und Kleinzeller) stellen Gewebshomogenate die biologischen Modelle für die Erprobung wirksamer Substanzen oder Bedingungen dar. Es gab bisher keine Untersuchung, die die Bedeutung der verschiedenen Homogenisationsverfahren für die Eigenschaften des Homogenates untersucht. Mit keinem der bisher bekannten Homogenisierungsverfahren kann eine konstante O₂-Aufnahme des Gewebes erreicht werden. Für die praktische Aufgabe ist es wesentlich, daß das Homogenat eine geringe Streuung der Sauerstoffaufnahme während der gleichen Messung und ebenso im Vergleich verschiedener Messungen hat. Darüber hinaus ist es wichtig, daß die unvermeidlichen Unterschiede im Grad der Homogenisation die Eigenschaften des Homogenates nicht verändern. Diese Untersuchung zeigt, daß die Unterschiede im Verhalten der O₂-Aufnahme der Homogenate verschiedener Verfahren sehr groß sein können, und daß die Homogenisation mit Hilfe des Potter-S-Gerätes die geforderten Bedingungen am besten erfüllt.

¹ J. Bertheit u. C. D. Duve, Biochem. J. **50**, 174 [1951].

² A. Kleinzeller, Manometrische Methoden, VEB G. Fischer Verlag, Jena 1965; Tschechosl. V. f. Medizin. Literatur, Prag.

³ W. W. Umbreit, Burris u. Stauffer, Manometric Techniques, Burgess, Minneapolis 1964.

⁴ O. Warburg, Biochem. Z. **152**, 51 [1924].

⁵ H. A. Krebs, Biochim. Biophys. Acta **4**, 249 [1950].

⁶ V. R. Potter u. G. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. **114**, 495 [1936].

⁷ A. L. Dounce, in Nucleic Acids, Bd. 2, S. 105 (E. Chargaff u. J. N. Davidson, Hrsg.), Acad. Press, New York 1955.

⁸ D. Pette, Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels, Prak. Enzym. **15** Verlag Müller, Bern, Stuttgart 1968.