

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer neu entwickelten spektrophotometrischen Methode wurde die Diffusion von Myoglobin in intakten Skelettmuskelzellen untersucht, um die Bedeutung myoglobinvermittelter erleichterter Sauerstoffdiffusion in der Muskulatur abschätzen zu können.

Als Probenmaterial dienten Ausschnitte aus der Pars costalis von Rattenzwerchfellen. Die Muskelproben wurden unmittelbar nach Abschluß einer 15-minütigen blutfreien Perfusion aus den Tierkörpern entnommen. Die einzelne Probe wurde anschließend in einer Meßkammer fixiert und mit 20°C warmer carbogenäquilibrierter Ringerlösung kontinuierlich superfundiert.

Im Meßstrahlengang eines rechnergesteuerten Mikroskop-Photometers wurden die Kammer und die darin befindliche Probe mit dem sichtbaren Licht einer Halogen-Lampe durchstrahlt. Über einen zweiten Strahlengang des Mikroskop-Photometers wurden UV-Bestrahlungen von mikroskopisch kleinen Arealen der Muskelprobe vorgenommen. Die photometrischen Messungen wurden in einem schmalen Meßfeld durchgeführt, das in der Mitte des bestrahlten Gebietes lag und quer über mehrere parallel laufende Muskelfasern reichte. Das Meßsignal wurde so über mehrere Fasern gemittelt.

Die bis zu 2 s währenden UV-Bestrahlungen führten zu einer teilweisen Photooxidation des Oxymyoglobins ( $\text{MbO}_2$ ) im exponierten Bereich. Die Photooxidation verursachte eine Erniedrigung der Extinktion bei 420 nm, einer Wellenlänge in der Soretbande des Myoglobinspektrums, bei welcher der Extinktionskoeffizient von Metmyoglobin (MetMb) deutlich niedriger ist als jener des  $\text{MbO}_2$ .

Im Anschluß an die UV-Bestrahlung wurden Extinktionskinetiken bei 420 und 473 nm registriert. Die Meßkurve bei 473 nm, einer isosbestischen Wellenlänge für  $\text{MbO}_2$  und MetMb, wurde auf Änderungen der Lichtstreuung im Gewebe zurückgeführt, die in das Signal bei 420 nm ebenso eingingen. Durch simultane Messungen bei beiden Wellenlängen konnte die bei 420 nm aufgezeichnete Kinetik mittels der bei 473 nm vorgenommenen Registrierung korrigiert werden.

Die korrigierten Kinetiken der Extinktion bei 420 nm waren Ausdruck zweier zeitgleich ablaufender Prozesse; erstens einer longitudinalen Translationsdiffusion von  $\text{MbO}_2$  und MetMb entlang der Achse der Muskelfasern und zweitens einer Reduktion des erzeugten MetMb in den Muskelzellen.

Die als UV-Quelle genutzte Quecksilberhöchstdruckdampfampe produzierte innerhalb der bestrahlten Gewebebezirke Gradienten der UV-Bestrahlungsstärke. Entlang der Achse der Muskelfasern verlief das UV-Intensitätsprofil ähnlich einer Gaußschen Verteilungskurve, während es quer zur Achse der Fasern in einem Bereich von 230  $\mu\text{m}$  ein Plateau aufwies. Dies führte zu entsprechenden initialen Konzentrationsgradienten des durch die UV-Strahlung entstehenden MetMb. Daher wurde die maximale Höhe des Meßfeldes kleiner als 230  $\mu\text{m}$  gewählt. Durch Variationen der Breite des UV-bestrahlten Areal zwischen 71 und 497  $\mu\text{m}$  entstanden verschiedene Profile der UV-Bestrahlungsstärke entlang der Achse der Muskelfasern. Mit Hilfe eines an das Mikroskop-Photometer angefügten Imaging-Systems wurden diese Profile aufgenommen und anschließend digital verarbeitet. Die derart erfaßten Profile wurden bei der Auswertung der betreffenden Kinetiken als Anfangsbedingung berücksichtigt.

Die korrigierte Extinktionskinetik wurde mit einer Differentialgleichung beschrieben, welche für die jeweilige Anfangsbedingung und die angenommenen Randbedingungen mit Hilfe des Crank-Nicolson-Algorithmus numerisch gelöst wurde. Der Myoglobindiffusionskoeffizient wurde durch die Anpassung der gefundenen Lösung an die korrigierte Meßkurve nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadratsumme ermittelt.

Unter Berücksichtigung der MetMb-Reduktion wurde aus 76 Messungen an Muskelproben von sechs Ratten ein mittlerer  $D_{\text{Mb}}$  von  $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $20^\circ\text{C}$ ) mit einem Standardfehler von  $0,08 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  bestimmt. Dieser Wert liegt in der Nähe des von MOLL (1968) publizierten Wertes für die Diffusion von Myoglobin in Schichten aus Homogenaten von Herz- und Skelettmuskulatur der Ratte und nahe an dem von BAYLOR und PAPE (1988) angegebenen Wert für die longitudinale Diffusion von MetMb in Froschmuskelfasern. Er ist aber nur etwa ein Fünftel so groß wie der Selbstdiffusionskoeffizient von Myoglobin in 18 g%iger wäßriger Lösung (RIVEROS-MORENO u. WITTENBERG 1972), einem Wert der von zahlreichen Autoren für Modellrechnungen zur Sauerstoffversorgung des Muskelgewebes verwendet wird.

Der Anteil myoglobinvermittelter erleichterter  $\text{O}_2$ -Diffusion am gesamten intrazellulären  $\text{O}_2$ -Transport in Muskelgewebe wurde mit dem hier bestimmten  $D_{\text{Mb}}$  für verschiedene angenommene Myoglobinkonzentrationen und intrazelluläre  $\text{O}_2$ -Partialdruckgradienten berechnet. Für eine Myoglobinkonzentration von 261  $\mu\text{mol/l}$ , wie sie in Rattenzwerchfellen gefunden wurde und einen  $\text{O}_2$ -Partialdruckgradienten von 20 auf 0 mmHg (2,66 - 0 kPa) wurde eine myoglobinvermittelte erleichterte Sauerstoffdiffusion errechnet, die bei  $37^\circ\text{C}$  etwa 16% der freien Sauerstoffdiffusion betrug. Bei sehr niedrigen Sauerstoffpartialdrücken jedoch (wie sie bei Hypoxie des Gewebes auftreten) verbessert nach diesen Berechnungen die myoglobinvermittelte erleichterte  $\text{O}_2$ -Diffusion, trotz des hier gefundenen niedrigen Diffusionskoeffizienten des Myoglobins, die Sauerstoffversorgung der Zelle erheblich. Hierin mag die eigentliche Bedeutung der erleichterten  $\text{O}_2$ -Diffusion in Muskelzellen liegen.

**Th. Peters: The determination of the myoglobin diffusion coefficient in intact skeletal muscle cells with a new spectrophotometrical method.**

## **8 SUMMARY**

A new method was developed to measure the diffusion coefficient of myoglobin ( $D_{Mb}$ ) in intact skeletal muscle cells in order to evaluate the importance of myoglobin facilitated oxygen diffusion in such cells.

Pieces of bloodfree perfused rat diaphragms were used as samples. Each sample was immediately dissected from the rat after perfusion and mounted into a chamber in which it was continuously superfused with Ringer solution equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 20°C. The chamber was placed in a computer equipped microscope spectrophotometer and the sample was transilluminated by visible light from a halogen bulb. Partial photooxidation of oxymyoglobin was accomplished in a microscopic rectangular area by an UV-light pulse with a maximal duration of 2 s.

Photometric measurements were made in a narrow rectangular field in the center of the irradiated region. The photometric field extended, perpendicular to the fiber axes, over a few muscle fibers. Thus the recorded signal was a mean of several fibers.

UV-irradiation resulted in a light absorbance change at 420 nm, a wavelength in the Soret band at which the extinction coefficients of oxy- and metmyoglobin are markedly different. The subsequent appearing absorbance kinetic at 420 nm was caused by the translational diffusion of met- and oxymyoglobin along the axes of the muscle fibers as well as by the reduction of metmyoglobin in the muscle cells.

A simultaneous measurement at 473 nm, an isosbestic wavelength for met- and oxymyoglobin, was used to correct the recording at 420 nm for artifacts, presumably due to provoked changes of light scattering within the sample.

The UV-irradiation produced an initial distribution profile of metmyoglobin depending on the irradiance distribution caused by the mercury super pressure arc lamp, which was used as UV-source. Perpendicular to the axes of the parallel muscle fibers the irradiance was almost constant over a distance of 230  $\mu\text{m}$ . In contrast the arc lamp generated an approximately gaussian irradiance distribution along the axes of the muscle fibers. In consequence the maximal height of the photometric field was chosen smaller than 230  $\mu\text{m}$ . The width of the irradiated area was varied between 71 and 497  $\mu\text{m}$ . Therefrom resulting different UV-light intensity

profiles along the axes of the muscle fibers were determined with an imaging system attached to the microscope and considered as the initial condition for the evaluation of the concerning diffusion kinetics.

The differential equation, which described the absorbance kinetics, was numerically solved for this initial condition and the respective boundary conditions with the Crank-Nicolson algorithm. The value of  $D_{Mb}$  was optimized by a least square fit of the found solution of the differential equation to the corrected absorbance curve.

When metmyoglobin reduction was taken into account, the value of  $D_{Mb}$ , obtained from 76 measurements made with muscle samples out of 6 diaphragms of the rat, was found to be  $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  at  $20^\circ\text{C}$  ( $\text{SEM} = 0,08 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ). This value is in the range of those, which have been reported by MOLL (1968) for layers of rat heart and skeletal muscle homogenates and by BAYLOR and PAPE (1988) for longitudinal diffusion of metmyoglobin in muscle fibers of the frog. It is about one fifth of the self-diffusion coefficient of myoglobin in an aqueous solution of 18 g% (RIVEROS-MORENO and WITTENBERG 1972), which is often used in model calculations of  $\text{O}_2$  supply to muscle tissue.

Using the value of  $D_{Mb}$  determined here, myoglobin facilitated oxygen diffusion was calculated considering different myoglobin concentrations and intracellular oxygen pressure gradients. For a myoglobin concentration of  $261 \mu\text{mol/l}$ , which was determined in rat diaphragms, and an intracellular  $\text{pO}_2$  gradient from 20 to 0 mmHg (2,66 - 0 kPa) the myoglobin facilitated oxygen diffusion at  $37^\circ\text{C}$  was found to be only about 16% of the free oxygen diffusion in the muscle tissue. However, at very low oxygen pressure, occurring for example during hypoxia of the tissue, myoglobin facilitated oxygen diffusion can substantially improve oxygen delivery to the muscle cells. Perhaps this is the main function of myoglobin facilitated oxygen diffusion in this cells.