Besprechung der Ergebnisse. Mehrere Forscher befassten sich mit der Frage, ob der Temperaturanstieg nach bakteriellen Pyrogenen primär auf einer Verminderung der Wärmeabgabe oder auf einer Stoffwechselsteigerung beruht[5]. Die schon von anderen Autoren beschriebene[6], hyperglykämisierende Wirkung der Pyrogene sowie die Senkung des Milchsäurespiegels sind statistisch signifikant und weisen auf eine Aktivierung des Stoffwechsels hin. Es ist dabei an die Arbeit von HAMRICK *et al.*[7] zu erinnern, in welcher über eine Beschleunigung des Stoffwechsels im Splanchicusgebiet berichtet wird.

Unsere in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen zeigen, dass der Sauerstoffverbrauch der Leber nach Pyrogengaben signifikant vergrössert wird und zwar nicht nur *in vivo*, was unter Umständen ein Sekundäreffekt sein könnte, sondern auch *in vitro*, was mit Sicherheit auf einen primären Angriffspunkt hinweist. Besonders interessant erscheint uns, dass der Sauerstoffmehrverbrauch nur stattfindet, wenn Serum mit Pyrogen inkubiert wurde. Wir vermuten, dass, wie schon andere Forscher annahmen[8], die Pyrogene an Bluteiweisskörper gebunden werden und damit die eigentlichen, endogenen Pyrogene entstehen. Das Fehlen einer ähnlichen Wirkung auf die Niere oder sogar eine Verminderung der Atmung ist vorläufig schwer zu erklären. Die von uns erzielten Resultate weisen in der Richtung, dass der Stoffwechselsteigerung eine wesentliche und primäre Rolle beim Temperaturanstieg zukommt.

J. VENULET und ANNA DESPERAK

Anstalt für Pharmakologie, Arzneimittelforschungsinstitut, Warschau, den 3. Juni 1957.

Summary

It has been established that pyrogen causes hyperglycemia and diminution of the lactic acid level in the blood. In *in vitro* investigations, oxygen requirements of the liver slices show marked increase. The results are regarded as showing a primary action of the pyrogens on metabolism.

[5] E. EICHENBERGER, M. SCHMIDHAUSER-KOPP, H. HURNI, M. FRICSAY und O. WESTPHAL, Schweiz. med. Wschr. *85*, 1213 (1955). – R. GRANT und W. J. WHALEN, Amer. J. Physiol. *173*, 47 (1955). – H. SIEDEK und H. HÄUSLER, dtsch. med. Wschr. *80*, 1128 (1955).

[6] P. B. BEESON, J. exper. Med. *86*, 29 (1947).

[7] L. W. HAMRICK jr. und J. D. MYERS, J. Lab. clin. Med. *45*, 568 (1955).

[8] R. GRANT und W. J. WHALEN, Amer. J. Physiol. *173*, 47 (1955). – V. MENKIN, J. Lab. clin. Med. *46*, 423 (1955).

Über die Hemmung des aktiven Kationentransportes durch Herzglykoside

Aus den Untersuchungen von FLECKENSTEIN *et al.*[1] geht hervor, dass bei Hemmung des aktiven Kationentransportes durch Zellmembranen unter der Einwirkung von Atmungs-, Glykolyse- und Phosphorylierungsgiften gleichzeitig eine Erschöpfung des Zellvorrates an energiereichem Phosphat (Adenosintriphosphat, Kreatinphosphat) eintritt. Da die Herzglykoside und deren Aglykone den aktiven Kalium-Natrium-Austausch durch die Erythrozytenmembran blockieren[2], wurde zur weiteren Klärung ihres Wirkungsmechanismus die Frage geprüft, ob auch diese Hemmung auf eine energetische Insuffizienz der Zelle zurückzuführen ist.

Methoden. Menschliches defibriniertes Frischblut oder «Kälteblut» (nach HARRIS[3] 6 Tage bei 4°C aufbewahrt) wurden nach Zusatz von Glucose (500 mg%) und Testsubstanzen in gleichem Gesamtvolumen aller Ansätze (4,8 ml Blut + 0,2 ml Lösungsmittel) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Blut zentrifugiert und das Serum durch Absaugen entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit isotonischer $MgCl_2$-Lösung wurden die Erythrozyten mit quarzdestilliertem Wasser hämolysiert und der Kalium- und Natriumgehalt des Hämolysats flammenphotometrisch bestimmt. Ausserdem wurde für jede Inkubationszeit der Hämatokritwert gemessen. Die Analyse der energiereichen Phosphatverbindungen erfolgte nach dem von FLECKENSTEIN *et al.*[4] angegebenen Verfahren, wobei die Erythrozyten von 1 ml Blut bei 0°C nach Abzentrifugieren des Serums zweimal mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und anschliessend 10 min mit 1,5 ml 5%iger Trichloressigsäure extrahiert wurden. Eine weitere Modifikation bestand darin, dass bei der Chromatographie nach dem Trennungsgang im ersten Lösungsmittel das Papier in grösserem Abstand (8 cm) von der Startlinie abgeschnitten wurde. Dadurch konnte die 2,3-Diphosphoglycerinsäure (2,3-DPGS) nach Anwendung des zweiten Lösungsmittels ebenfalls lokalisiert und bestimmt werden.

$$Q = \frac{\text{meq Na/l}}{\text{meq K/l}}$$

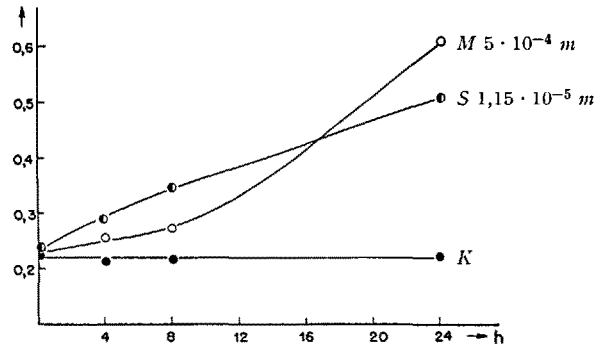

Abb. 1. Hemmung des aktiven Kationentransportes bei Inkubation von Frischblut. Ordinate: Q gibt das Verhältnis Natriumgehalt/Kaliumgehalt der Erythrozyten an, gemessen in Milliäquivalenten pro Liter Zellen. Abszisse: Inkubationszeit in Stunden. K = Kontrollansatz, M = Monojodacetat $5 \cdot 10^{-4}$ m, S = k-Strophanthosid $1{,}15 \cdot 10^{-5}$ m (10^{-5} g/ml).

Resultate. Bei der Inkubation von Frischblut (Abb. 1) bleibt der normale Elektrolytgehalt der Erythrozyten während 24 h unverändert erhalten. Durch aktiven Transport wird also dauernd Natrium nach aussen und Kalium nach innen befördert. Bei Hemmung des aktiven Kationentransportes durch Monojodessigsäure (MJE) oder k-Strophanthosid überwiegen die «passiven» Ionenverschiebungen entsprechend dem Konzentrations-

[1] A. FLECKENSTEIN, *Der Kalium-Natrium-Austausch* (Springer Verlag, Berlin 1955). – E. GERLACH, Arch. exp. Path. Pharmakol. *228*, 128 (1956). – A. FLECKENSTEIN, E. GERLACH und J. JANKE, Schweiz. med. Wschr. *86*, 1041 (1956).

[2] H.-J. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta *11*, 346 (1953).

[3] J. E. HARRIS, J. biol. Chem. *141*, 579 (1941).

[4] A. FLECKENSTEIN, *Der Kalium-Natrium-Austausch* (Springer-Verlag, Berlin 1955). – E. GERLACH, A. FLECKENSTEIN und K. J. FREUNDT, Pflügers Arch. ges. Physiol. *263*, 682 (1957).

Tabelle I

Inkubation von Frischblut. Gleicher Versuch wie Abbildung 1 und 2. Die Werte sind in γ/ml Erythrozyten angegeben. Übrige Angaben siehe Abbildung 1 und 2.

	K_0	M_0	S_0	K_8	M_8	S_8	K_{24}	M_{24}	S_{24}
ATP	171	179	185	212	—	227	238	—	249
ADP	96	94	89	22	24	15	—	—	—
2,3-DPGS	585	500	552	542	28	525	69	—	77
Anorganischer P (H_3PO_4)	13	20	17	16	180	19	219	330	204

Tabelle II

Inkubation von «Kälteblut». Gleicher Versuch wie Abbildung 3. Die Werte sind in γ/ml Erythrozyten angegeben. Übrige Angaben siehe Abbildung 1 und 2.

	K_0	M_0	S_0	K_4	M_4	S_4	K_8	M_8	S_8
ATP	104	98	113	82	—	86	95	—	87
ADP	42	37	47	—	—	—	—	—	—
2,3-DPGS	973	956	930	552	573	570	565	156	551
Anorganischer P (H_3PO_4)	59	62	54	153	242	139	171	314	152

gradienten zwischen Serum und Erythrozyten, was sich in einer Erhöhung des intrazellulären Natriums und einer Abnahme des Kaliums äussert (Zunahme von Q). Aus Abbildung 2 und Tabelle I ist ersichtlich, dass der Stoffwechsel des energiereichen Phosphats in den Erythrozyten nur durch MJE, nicht aber durch das Herzglykosid beeinflusst wird. Innerhalb der Genauigkeit der Methode besteht eine völlige Übereinstimmung zwischen Kontroll- und k-Strophanthosidansätzen: der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) steigt im Laufe der Inkubation über 24 h sogar noch an, während er unter der Einwirkung von MJE nach 8 h auf Null abgesunken ist. Ebenso verschwindet die 2,3-DPGS in den MJE-Ansätzen schneller, da sie infolge der Hemmung der Oxydation des Phosphoglycerinaldehyds durch MJE gar nicht mehr gebildet wird. Nach 24 h sind aber auch in den Kontrollansätzen nur noch Spuren von 2,3-DPGS – bei gleichzeitig erhöhtem ATP-Gehalt – vorhanden. Dieser Befund zeigt übrigens mit aller Deutlichkeit, dass der aktive Kationentransport der Erythro-

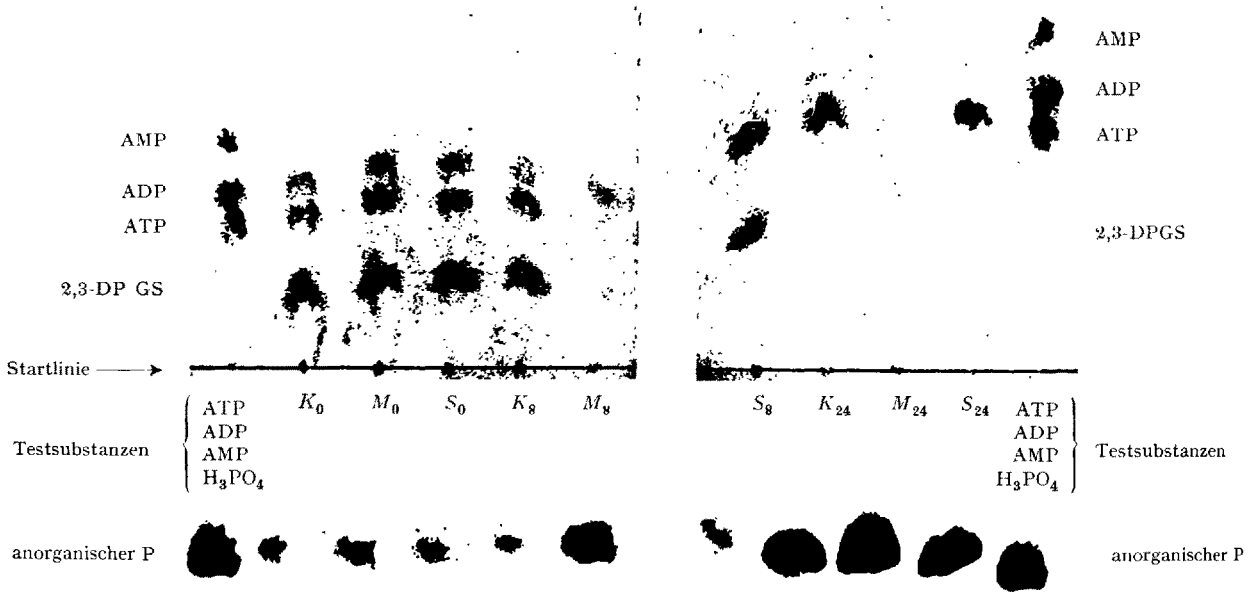

Abb. 2. Chromatogramme der Erythrozyten-Extrakte nach Entwicklung mit Molybdatreagens nach HANES und ISHERWOOD[5]. Gleicher Versuch wie Abbildung 1. Die Indices von K, M und S geben die Inkubationsdauer in Stunden an. ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, 2,3-DPGS = 2,3-Diphosphoglycerinsäure. Übrige Angaben siehe Abbildung 1.

[5] C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD, Nature *164*, 1107 (1949).

zyten in unmittelbarer Weise vom ATP abhängt[6]. Das anorganische Phosphat steigt beim Verschwinden der organischen Phosphorverbindungen entsprechend an.

$$Q = \frac{\text{meq Na/l}}{\text{meq K/l}}$$

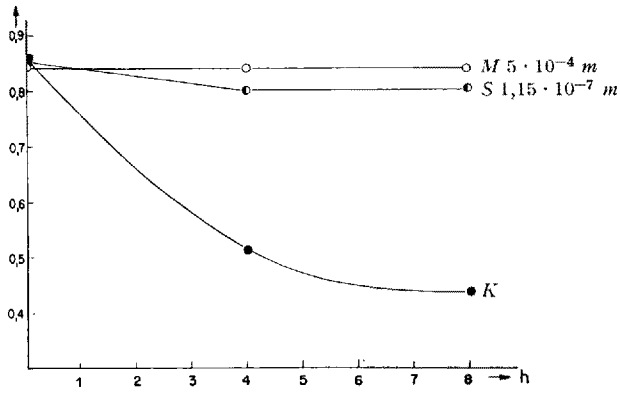

Abb. 3. Hemmung des aktiven Kationentransportes bei Inkubation von «Kälteblut» (gleiches Blut wie Versuch der Abbildung 1, 6 Tage bei 4°C aufbewahrt). S = k-Strophanthosid $1{,}15 \cdot 10^{-7}$ m (10^{-7} g/ml). Übrige Angaben siehe Abbildung 1.

Bei Inkubation von «Kälteblut» (Abb. 3) wird die normale Kationenverteilung zwischen Zellen und Serum durch aktiven Transport wieder hergestellt, das heisst, der anfänglich hohe Quotient Q der relativ natriumreichen und kaliumarmen «Kälteerythrozyten» fällt im Laufe der Inkubation ab und nähert sich wiederum dem «Normalwert». In Gegenwart von MJE oder k-Strophanthosid bleibt dieser Abfall von Q aus. Auch beim «Kälteblut» lässt sich keine Wirkung des Herzglykosids auf den Phosphatstoffwechsel nachweisen (Tab. II): ATP verschwindet wiederum nur in den MJE-Ansätzen. Die «Kälteerythrozyten» enthalten weniger ATP und Adenosindiphosphat (ADP), hingegen mehr 2,3-DPGS und anorganisches Phosphat. Ebenso nimmt der Gehalt von 2,3-DPGS bei Zusatz von MJE schneller ab.

MJE und Herzglykoside greifen also an zwei ganz verschiedenen Stellen in den Ablauf der Reaktionen ein, welche dem aktiven Transport zugrunde liegen. Die vorliegenden Befunde weisen darauf hin, dass die Hemmung des aktiven Kalium-Natrium-Austausches durch Herzglykoside nicht auf einer Blockierung energieliefernder Vorgänge, sondern auf einer direkten Wirkung auf den Membrantransportmechanismus, das «Carrier-System», beruht.

Beim Abschluss der Arbeit erhielten wir Kenntnis vom Autorreferat von R. WHITTAM für das Programm der Englischen Physiologentagung vom 29. bis 30. März 1957, auf welcher er über ähnliche Untersuchungsergebnisse berichtet hat.

H. A. KUNZ und F. SULSER

Pharmakologisches Institut der Universität Bern, 31. Mai 1957.

Summary

Inhibition of active cation transport through the red cell membrane by cardiac glycosides is not accompanied by alteration of phosphate metabolism (ATP, ADP, 2,3-diphosphoglyceric acid) in contrast to the action of iodoacetate. This fact suggests that the cardiac glycosides act directly on the membrane transport mechanism.

[6] G. GARDOS, Acta physiol. Acad. Sci. Hungar. *6*, 191 (1954).

Studies of Lipid Extracts from Red Blood Cells

A lipid extract obtained from Rh positive human red blood cells was reported by the writer in 1947[1] and other findings have been published since[2]. Recently a study[3] of the specificity of such an extract was made by means of quantitative nitrogen assays of Rh antibody adsorbed on to the lipid particle. It has been suggested[4] that the amount of specific substance produced by the methods employed is so slight as to be negligible. Since other findings tend to refute this[5], it was resolved to investigate use of identical methods with other than human red cells in order to see if comparable specific material could be derived by the same techniques.

Accordingly, it was decided to choose for this purpose beef red cells and to attempt to extract from them the lipid-carbohydrate complex which has been characterized[6] as the antigen reacting with antibody produced in the human as a result of infectious mononucleosis. The use of beef rather than sheep cell extractives rules out the Forssman antigen, which complicates the picture in red cell agglutination tests with antibody from infectious mononucleosis patients. The surface blood cell antigens have been described[7] as chemically similar to the heterophile antigens. Therefore, methods of extraction and assay for the one might prove valid for the other. Although the main objective was to test the value of the extraction method, it was hoped also that an assay using complement fixation technique might be derived which would detect the presence of heterophile antibodies earlier in the course of disease than is now possible.

BARNARD[8] has confirmed the specificity of the hapten extracted from human red cells. This hapten was assayed by him, as well as in this laboratory, through complement fixation techniques. The sample studied by BARNARD was prepared by the writer using techniques reported elsewhere[3]. Beef cells were treated in an identical manner, i.e., one volume of fresh cells is precipitated by two volumes of 95% ethyl alcohol. This is allowed to stand over night at room temperature, then the precipitate is separated by filtration and added to two volumes of dichloromethane. This is mixed and kept at room temperature for 6 h or longer. The liquid is evaporated, leaving a lipid fraction.

The residue is dissolved in a proportion of 100 mg lipid per 1 ml alcohol. This is stable for several months at room temperature. For a complement fixation assay,

[1] B. B. CARTER, Amer. J. clin. Path. *17*, 646 (1947).
[2] B. B. CARTER, J. Immunol. *61*, 79 (1949).
[3] B. B. CARTER, Exper. *12*, 150 (1956).
[4] C. HOWE and R. RUSTIGIAN, J. Immunol. *64*, 505 (1950).
[5] C. J. EHRENBERG, J. Lancet *75*, 275 (1955). – E. MAYR, Geburtsh. Frauenheilk. *11*, 239 (1951). – J. W. GOLDSMITH, Amer. J. Obst. Gyn. *59*, 172 (1950).
[6] J. TOMCSIK and H. SCHWARZWEISS, Proc. Soc. exp. Biol. *69*, 562 (1948).
[7] P. L. CARPENTER, *Immunology and Serology* (W. B. Saunders, Philadelphia 1956), p. 171.
[8] R. L. BARNARD, 5th Int. Congr. Blood Transfusion (1955), p. 85.