

Furthermore the *in vitro* effect of salicylate on human red blood cells were examined. The erythrocytes were incubated in plasma at 37°C in a shaking apparatus. Sodium salicylate was added in a 50 mg% concentration. At the 60th min, glucose was added to produce a 100 mg% increase in glucose level. Erythrocytes from the same person were similarly treated except for adding salicylate. After 2 h, the potassium, sodium and water content and the average diameter of the red blood cells in both systems were determined. After washing the cells 3 times in isotonic glucose, electrolyte measurements were made in the haemolysate using a flame photometer.

On the average (mean of 7 experiments), the salicylate-treated cells extrude 8.14 mEq/l cell potassium ( $0.01 > p > 0.001$ ), take up 1.69 mEq/l cell sodium ( $p < 0.001$ ) and 45 ml/l cell water ( $p < 0.001$ ), their diameter increasing 0.385  $\mu$  ( $0.01 > p > 0.001$ ).

We interpret our findings as a form of the 'tired cell' syndrome described by ELKINTON<sup>5</sup>. Salicylate is known to uncouple oxidative phosphorylation in the cells. Another important consequence is, however, the development of an energy deficiency state (SMITH and JEFFREY<sup>6</sup>, KELEMEN and TANOS<sup>2</sup>). Owing to these alterations, the cells cannot maintain the normal concentration gradient against plasma, i. e. a netto potassium lost from the erythrocyte takes place under salicylate action. In this connection it may be mentioned that the insufficiency to maintain water and electrolyte balance in slices or mitochondrial preparations of hyperthyreotic animals—as manifested both in swelling and in potassium lost—was interpreted by AEBI and ABELIN<sup>7</sup> on the base of the insufficiency of high energy phosphate bonds, produced by uncoupling of oxidative phosphorylation in the hyperthyreotic subject.

Changes in water and electrolyte content of human red blood cells produced by salicylate

	Difference in electrolyte content in mEq/l erythrocytes		Increase in water content in ml/l cells	Increase in erythrocyte diameter in $\mu$
	K	Na		
<i>In vivo</i> . . .	– 11.95	+ 4.22	+ 37	+ 0.46
<i>In vitro</i> . . .	– 8.14	+ 1.69	+ 45	+ 0.385

The present observations suggest, that these effects of salicylate are due to a direct action on the cell requiring no mobilisation of endocrine or other mediating factors.

K. WALTNER, JR., M. CSERNOVSZKY,  
and E. KELEMEN

1st Department of Medicine, University Medical School,  
Szeged (Hungary), May 14, 1958.

#### Zusammenfassung

Es wird gezeigt, dass Natriumsalicylat *in vitro* auf menschliche Erythrozyten einen *direkten* Einfluss ausübt, indem es den Kaliumgehalt vermindert und den Natrium- sowie den Wassergehalt vermehrt. Diese Wirkung, die auch *in vivo* beobachtet werden kann, dürfte die Folge einer Energieverarmung sein, die durch eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung zustande kommt.

<sup>5</sup> J. R. ELKINTON, *Circulation* 14, 1027 (1956).

<sup>6</sup> M. J. H. SMITH and S. W. JEFFREY, *Biochem. J.* 64, 589 (1956).

<sup>7</sup> H. AEBI and J. ABELIN, *Biochem. Z.* 324, 364 (1953).

## Beziehung zwischen Nebenniere und aktivem Kationentransport

Untersuchungen zur Abklärung der durch Herzglykoside hervorgerufenen Hemmung des aktiven Kationentransportes durch die Erythrozytenmembran haben gezeigt, dass diese Blockierung nicht auf einer energetischen Insuffizienz der Zelle im Sinne einer Abnahme energiereicher Phosphatverbindungen beruht, sondern dass ein direkter Angriffspunkt am Membrantransportmechanismus wahrscheinlich ist<sup>1</sup>. Es wurde die Interpretation der Verdrängung eines Steroidchelats durch Herzglykoside vorgeschlagen und diese experimentell durch den Nachweis einer antagonistischen Beeinflussung der Hemmwirkung von k-Strophanthosid auf den aktiven Natriumtransport durch gewisse Corticosteroide am «Kälte-Erythrozyten»<sup>2</sup> und durch eine antagonistische Wirkung von Herzglykosid und Corticosteroid auf die renale Natriumausscheidung an der adrenalektomierten Ratte gestützt<sup>3</sup>. Ausgehend von der Annahme, dass «genuine» Corticosteroide Trägermoleküle für den aktiven Kationentransport darstellen könnten, wurde der Einfluss beidseitiger Adrenalektomie auf den aktiven Natrium-Kaliumtransport beim «Kälte-Erythrozyten» neben-nierenloser Ratten und die Hemmbarkeit des aktiven Kationentransportes durch Herzglykoside im Zustand der Insuffizienz geprüft.

**Methodik.** 120–140 g schwere männliche Albinoratten wurden durch Dekapitation getötet. Das ausfliessende Blut wurde durch Rühren mit Kunststoffstäbchen defibriniert, der Hämatokritwert bestimmt und während 4–6 Tagen bei 4°C aufbewahrt. Die nachfolgenden Untersuchungen über aktiven Transport erfolgten nach der früher angegebenen Methode<sup>4</sup>. Die totale Hämolysse wurde durch Zusatz von Digitonin erreicht. Die bilaterale Adrenalektomie erfolgte nach BURN<sup>5</sup>. Da akzessorische Nebennieren nach erfolgtem Eingriff relativ häufig zu beobachten sind, wurden nur Tiere in ausgesprochenem Insuffizienz-zustand (Gewichtsabnahme, Adynamie, hoher Hämatokritwert) für die Versuche verwendet.

**Resultate.** Vergleicht man die aktive Natriumverschiebung durch die Erythrozytenmembran normaler Ratten mit derjenigen insuffizienter adrenalektomierter Tiere, so ergibt sich für die letztere Gruppe eine statistisch hoch signifikante Verlangsamung dieses Austauschvorganges. Ein Beispiel zeigt Abbildung 1. Die mittlere Stundengeschwindigkeit des Natriumaustretisses in der ersten Stunde beträgt bei intakten Kontrolltieren in meq Natrium/l Zellen  $9.89 \pm 0.90^6$  ( $n = 13$ ), bei adrenalektomierten Tieren  $2.98 \pm 0.28^6$  ( $n = 11$ ) bei einer Zufallswahrscheinlichkeit des Unterschiedes von  $P \ll 0.001$ .

In Abbildung 2 ist die mittlere Stundengeschwindigkeit des aktiven Netto-Auswärtstransportes von Natrium, bzw. des Netto-Einwärtstransportes von Kalium bei Erythrozyten normaler und adrenalektomierter Tiere gegen den Hämatokritwert aufgetragen. Ist die Verschiebung des Hämatokritwertes ein Mass für den Insuffizienz-zustand adrenalektomierter Tiere, so geht die Verlang-

<sup>1</sup> H. A. KUNZ und F. SULSER, *Exper.* 13, 365 (1957). – R. WHIT-TAM, *J. Physiol.* 137, 13 P (1957).

<sup>2</sup> F. SULSER und W. WILBRANDT, *Helv. physiol. Acta* 15, C37 (1957).

<sup>3</sup> R. GANTENBEIN, F. SULSER und W. WILBRANDT, *Helv. physiol. Acta* 15, C 64 (1957).

<sup>4</sup> H. A. KUNZ und F. SULSER, *Exper.* 13, 365 (1957).

<sup>5</sup> J. H. BURN, *Biological Standardization* (Oxford University Press, London 1950).

<sup>6</sup> Mittlerer Fehler des Mittelwertes.

samung des aktiven Natriumtransportes beim Kälteerythrozyten der Schwere der Insuffizienz parallel. Für den aktiven Kaliumtransport lässt sich diese Beziehung nicht nachweisen. Die mittlere Stundengeschwindigkeit des

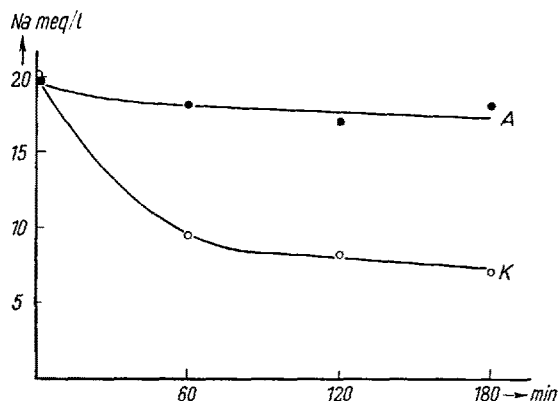


Abb. 1. Hemmung des aktiven Natriumtransportes nach Adrenalectomie. Ordinate: Natrium in meq/l Zellen. Abszisse: Inkubationszeit in Minuten. A = Blut einer adrenalectomierten Ratte, 6 Tage bei 4°C, Hämatokritwert = 0,52. K = Blut einer normalen Ratte, 6 Tage bei 4°C, Hämatokritwert = 0,15.

Kaliumeintrittes in der ersten Stunde beträgt bei den Kontrolltieren in meq K/l Zellen  $6,63 \pm 1,81^6$  ( $n = 13$ ), bei adrenalectomierten Tieren  $11,36 \pm 3,35^6$  ( $n = 11$ ). Die Unterschiede sind der grossen Streuung wegen nicht

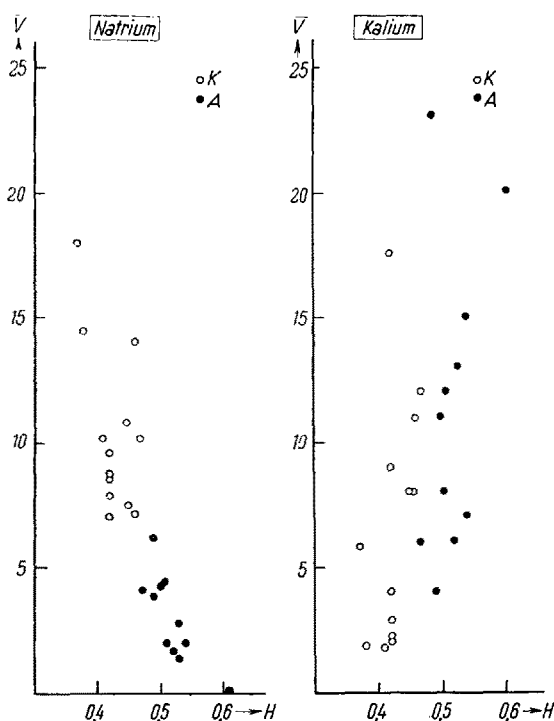


Abb. 2. Beziehung zwischen aktivem Natrium- bzw. Kaliumtransport und Hämatokritwert. Ordinate:  $\bar{V}$  = mittlere Geschwindigkeit des Natriumaustrittes (links) bzw. des Kaliumeintrittes (rechts) in der ersten Stunde in meq/l Zellen. Abszisse:  $H$  = Hämatokritwert. A = adrenalectomierte Tiere. K = Kontrolltiere.

signifikant ( $P > 0,05$ ). Auch in Versuchen mit Blut adrenalectomierter Tiere, bei welchen praktisch kein aktiver Natriumtransport mehr zu beobachten war,

wurde die Kaliumpumpe nicht beeinflusst, zumindest nicht in der ersten Stunde, wo noch keine Hämolyse die Bestimmung der gewanderten Kaliummenge erschwerte. (Eine ausführliche Darstellung dieser Entkoppelungsphänomene erfolgt an anderer Stelle<sup>7</sup>.)

Da die beobachteten Effekte Bilanzen zwischen aktivem Transport des Natriums entgegen dem elektrochemischen Gradienten und passiver Verschiebung entsprechend dem Konzentrationsgradienten darstellen, so wäre dasselbe Ergebnis denkbar nicht nur durch eine Hemmung des aktiven Transportes, sondern auch durch eine Beschleunigung des passiven Einstroms von Natrium. Orientierende Versuche zeigten, dass während der Kaltlagerung des Blutes hinsichtlich Geschwindigkeit der passiven Natriumeinwanderung in die Zellen keine Unterschiede zu bestehen scheinen zwischen Erythrozyten normaler und adrenalectomierter Tiere. Eine stärkere Hemmwirkung auf den aktiven Natriumtransport bei Erythrozyten nebennierenloser Tiere durch herzwirksame Glykoside, wie man sie hätte erwarten können, liess sich nicht eindeutig beurteilen, da nach Adrenalectomie allein schon eine sehr ausgeprägte Abnahme des aktiven Natriumaustrittes zu beobachten war. Hingegen fiel bei diesen Versuchen auf, dass k-Strophanthosid sowohl bei Erythrozyten normaler wie adrenalectomierter Tiere selektiv den aktiven Natriumtransport hemmt, während der aktive Kaliumeinstrom unbeeinflusst bleibt.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse an Erythrozyten nebennierenloser Ratten bilden eine weitere Stütze für die Vorstellung, dass «genuine» Corticosteroide als Trägermoleküle für den aktiven Natriumtransport dienen könnten. Auch die Resultate andersartiger Versuche von WOODBURY und KOCH<sup>8</sup> und von GROLLMAN<sup>9</sup> könnten in gleicher Richtung interpretiert werden. Die von SCHATZMANN<sup>10</sup> und SHERWOOD JONES<sup>11</sup> beobachtete Hemmwirkung gewisser Nebennierensteroiden in hoher Konzentration auf den aktiven Kationentransport *in vitro* beruhen möglicherweise darauf, dass unter bestimmten experimentellen Bedingungen nicht «genuine» Corticosteroide eine Verdrängung der physiologischen Corticoide und damit digitalisähnliche Effekte bewirken können. Entsprechende Befunde hinsichtlich renaler Elektrolytausscheidung bei der Ratte wurden in gleicher Weise gedeutet<sup>12</sup>.

H. A. KUNZ und F. SULSER

Pharmakologisches Institut der Universität Bern, 24. Mai 1958.

### Summary

The active sodium transport through the membrane of coldstored red cells of adrenalectomized rats is significantly decreased, whereas the rate of active exchange of potassium is not influenced by adrenalectomy. Cardiac glycosides likewise slow down only the active sodium exchange in the blood of both the normal and adrenalectomized animals in contrast to their action on human red cells.

<sup>7</sup> H. A. KUNZ und F. SULSER, *Helv. physiol. Acta* 1958, im Druck.

<sup>8</sup> D. M. WOODBURY und A. KOCH, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **94**, 720 (1957).

<sup>9</sup> A. GROLLMAN, *Amer. J. Physiol.* **179**, 36 (1954).

<sup>10</sup> H. J. SCHATZMANN, *Exper.* **10**, 189 (1954).

<sup>11</sup> E. SHERWOOD JONES, *Nature* **176**, 269 (1955); *Exper.* **14**, 72 (1958).

<sup>12</sup> F. SULSER und R. GANTENBEIN, in Vorbereitung. – J. BRONSTEIN, F. SULSER, H. A. KUNZ und W. WILBRANDT, *Helv. physiol. Acta* 1958, im Druck.