

unsere Membranpräparate enthielten Hämoglobin. Wir haben uns die Frage gestellt: Sind die Hämoglobinmoleküle in irgendeiner Membranschicht strukturell eingebaut, oder aber werden sie erst während der Herstellung der Membranen, durch diese, gebunden?

Die zweite Hälfte dieser Frage könnte mit dem folgenden Beispiel aus dem Gebiet der Mikrobiologie illustriert werden. Ein spezifisches Polysaccharid wurde in *B. anthracis*², später auch in den isolierten Zellwandpräparaten dieses Bazillus³ nachgewiesen. Andere Autoren beschreiben ein zweites Polysaccharid⁴, welches aber nur aus Milzbrandbazillen, die auf einem speziellen Nährboden gezüchtet wurden, isoliert werden konnte und nichtspezifische Präzipitinreaktionen ergab⁵. Das zweite Polysaccharid (Hefe-Mannan) wurde von den sich vermehrenden Milzbrandbazillen aus dem Hefeextrakt enthaltenden Nährboden aufgenommen und derart stark gebunden, dass dieses trotz mehrmaligem Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung nicht entfernt werden konnte⁵. Lysozym-behandelte *B. megaterium*-Sporen binden das Lysozym derart stark, dass sie selbst nach fünfmaligem Waschen in Kaninchen auch Lysozymantikörper produzieren⁶.

In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit konnten wir das Hämoglobin aus unseren Erythrocytenmembranpräparaten durch mehrmaliges Waschen nicht entfernen. pH-Änderungen setzten das Hämoglobin aus den Membranen nicht frei. Doch erhielten wir anlässlich der Immunisierung von zahlreichen Kaninchen mit Membranen äusserst selten eine ganz geringfügige Hämoglobin-Antikörperproduktion.

Zu den weiteren Immunisierungen wählten wir kristallisiertes Rinderhämoglobin (Armour, USA). Kaninchen wurden sowohl nach der Freundschen Adjuvans-Methode mit 2% Hämoglobinlösung subkutan als auch ohne Adjuvantien mit 0,1–2% Hämoglobinlösung (in physiologischem NaCl) intravenös behandelt. Mit der Freudschen Depotmethode wurden Antikörper nach 3 bis 7 Injektionen, mit der einfachen intravenösen Methode nach 7 bis 10 Injektionen in genügender Menge produziert.

Die Immunsera gaben eine Hämagglytination mit trypsinisierten Rindererythrocyten in einer Verdünnung bis 1:400 bzw. bis 1:6400. Das Hämoglobin wurde durch diese Immunsera höchstens in einer Verdünnung von 1:64 000 spezifisch präzipitiert.

Der beträchtliche Hämagglytinationstiter durch unsere «Hämoglobinantisera» war für uns überraschend und gleichzeitig bedenklich. Deshalb wurde eine grössere Menge der Hämoglobinlösung in einer Kühlzentrifuge bei

6000 *U* lange Zeit zentrifugiert. Es entstand ein geringes Sediment, in dem phasenoptisch Erythrocytenmembranen festgestellt werden konnten. Die letzteren wurden durch Seitzfilter entfernt. Dieses klare Hämoglobinfiltrat wurde wiederum zur Vorbehandlung von Kaninchen verwendet. Diesmal wurden nur präzipitierende Antikörper gegen das Hämoglobin und keine agglutinierenden Antikörper gegenüber trypsinisierten Rindererythrocyten gebildet.

Diskussion. Wenn das Hämoglobin einen Bestandteil der Erythrocytenmembran – mindestens in die tiefere semipermeable Schicht eingebaut – bilden würde, sollte mit entsprechend präparierten Erythrocyten eine Hämagglytination entstehen. Am einfachsten können die tiefer liegenden Schichten der Erythrocytenmembran mit einer vorsichtig durchgeführten Trypsin- oder Papainverdauung freigelegt werden. Da die derartig vorbehandelten Erythrocyten mit Hämoglobinantikörpern allein nicht agglutiniert werden können, kann das Hämoglobin nicht in die Membran der intakten Erythrocyten strukturell eingebaut sein. Der Hämoglobingehalt der isolierten Erythrocytenmembranen ist wahrscheinlich auf eine Absorption zurückzuführen, die bei der hypotonischen Hämolyse entsteht. Ein Hämoglobinpräparat, welches mit kleinen Mengen von Membranen verunreinigt ist, produziert in Kaninchen zwei Antikörper. Der eine, der Hämoglobinantikörper, gibt nur mit Hämoglobin eine Präzipitinreaktion, der andere, der Membranantikörper, spielt allein eine Rolle in der Hämagglytination.

Summary. A commercial crystallised beef-haemoglobin preparation, freed from membranes, produced in rabbits an immune-serum which gave a specific precipitation reaction with haemoglobin and did not agglutinate the trypsin-treated erythrocytes. The haemoglobin is not a structural element of the erythrocyte membrane but it is absorbed to these secondarily during their preparation.

J. TOMCSIK und MARIANN SCHERRER-GERVAI

Hygiene-Institut der Universität Basel (Schweiz), 25. Mai 1962.

² J. TOMCSIK und H. SZONGOTT, Z. Immunforsch. 76, 214 (1932).

³ J. B. BAUMANN-GRACE, H. KOVACS und J. TOMCSIK, Schweiz. Z. Path. Bakt. 22, 158 (1959).

⁴ J. E. CAVE-BROWN-CAVE, E. S. J. FRY, H. S. EL CADEM und H. N. RYDON, J. chem. Soc. 1954, 3866.

⁵ J. B. BAUMANN-GRACE und J. TOMCSIK, Exper. 15, 305 (1959).

Die Wirkung von Spirolactonen und von Herzglykosiden auf den Natrium- und Kaliumtransport an Erythrocyten¹

Es wird heute allgemein angenommen, dass der hohe Zellkalium- und der niedrige Zelnatriumgehalt durch einen Pumpmechanismus aufrechterhalten wird, der ständig gegen den Konzentrationsgradienten Kalium in die Zellen hinein und Natrium aus den Zellen hinaus pumpt. Dieser aktive Transport kann durch Herzglykoside gehemmt werden^{2–4}. POST et al. und DUNHAM und GLYNN zeigten an Versuchen mit Erythrocytenschatten, dass diese Hemmung mit einer Verminderung eines bestimmten Anteils der ATP-ase-Aktivität in den Erythrocytenmembranen zusammenhängen könnte^{5,6}.

KAGAWA prüfte die Wirkung verschiedener von CELLA⁷ synthetisierter Substanzen, den Spirolactonen, die sowohl den Corticosteroiden (im Grundgerüst), wie den Herzglykosiden (im Lactonring), strukturell ähnlich sind. Sie

¹ Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Stipendium der CIBA für naturwissenschaftliche, medizinische und technische Forschung.

² J. H. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta 11, 346 (1953).

³ V. KOEFOED-JOHNSON, Acta physiol. scand. 42, Suppl. 97 (1952).

⁴ M. MAIZELS und M. REMINGTON, J. Physiol. 140, 61 (1958).

⁵ R. L. POST, C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING und C. D. ALBRIGHT, J. biol. Chem. 233, 1796 (1960).

⁶ E. T. DUNHAM und I. M. GLYNN, J. Physiol. 156, 274 (1961).

⁷ J. A. CELLA, E. A. BROWN und R. R. BURTNER, J. org. Chem. 24, 743 (1959).

erweisen sich, gemessen am Urin-Na/K-Quotienten adrenalektomierter Ratten, als Mineralocorticoid-Antagonisten^{8,9}.

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass Herzglykoside, unabhängig von ihrer cardialen Wirkung, die Na-Rückresorption an der Niere hemmen¹⁰⁻¹². WILDE¹³ zeigte mit Hilfe der Stop-Flow-Technik, dass Ouabain im distalen Tubulus an der gleichen Stelle angreift wie Aldosteron. Überdies konnten GANTENBEIN und SULSER¹⁴ mit der Versuchsanordnung von KAGAWA¹⁵ eine antagonistische Beeinflussung der Cortexonwirkung durch Spirolactone zeigen. Der Gedanke lag somit nahe, dass Spirolactone und Herzglykoside am gleichen Ort in den aktiven Transportmechanismus eingreifen könnten.

Vorliegende Versuche wurden an Menschenblut durchgeführt. Methodisch wurde in Anlehnung an die Versuche von HARRIS¹⁶, SCHATZMANN² und SULSER und WILBRANDT¹⁷ die Änderung des K- und Na-Gehaltes im Inneren der Erythrocyten bestimmt und zur gleichzeitigen Erfassung ihrer gegenläufigen Bewegung der Quotient $[Na]_i/[K]_i$ gebildet. Zur Erfassung des aktiven Na- und K-Transportes wurde 0-10 Tage kaltgelagertes Blut unter Zusatz von Glukose (400 mg%) während 3-5 h bei 37°C inkubiert. Am Anfang und am Ende der Inkubationsperiode wurde der Na- und K-Gehalt im Hämolsat der mit isotonischer $MgCl_2$ -Lösung gewaschenen Erythrocyten flammenphotometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde daneben auch die Änderung des Serumkaliumgehaltes verfolgt. Als Spirolactone wurden SC 5233 und SC 9420 (Aldactone®) verwendet. Sie können mit Hilfe von Alkohol so gelöst werden, dass eine Konzentration von 10^{-5} g/ml Blut erreicht wird, ohne dass der Alkoholgehalt (1%) den Na- und K-Transport stört.

Eine Hemmwirkung dieser Konzentration konnte in Übereinstimmung mit D'AMIGO und CESANO¹⁸ nicht beobachtet werden. Mischt man mit Spirolacton gesättigtes Serum (die maximale Löslichkeit von SC 5233 wurde in Pferdeserum zu 3×10^{-5} g/ml ermittelt) mit Erythrocyten im Verhältnis 1:1, ist auch kein eindeutiger Hemmefekt auf die K- und Na-Pumpe festzustellen.

Hingegen erhielt ich durch Zugabe der Spirolactone in Substanz (1 mg/ml Blut) eine deutliche Verminderung des Na- und K-Transportes. In einer Serie von vier Versuchen war die Na-Innenkonzentration nach 5 h Inkubation im Spirolacton-versetzten Blut um $7,5 \pm 1,08$ mM/l Zellen höher als in der Kontrolle. Der Serumkaliumgehalt erhöhte sich in der gleichen Versuchsserie durch Spirolactonzusatz um $4,1 \pm 1,18$ mM/l Serum und die Differenz zwischen den Na/K-Quotienten der Kontrolle und demjenigen des Spirolactonansatzes betrug $0,105 \pm 0,0075$. Dieser Wert ist mit hoher statistischer Sicherheit von Null verschieden ($P < 0,001$). In Figur 1 ist ein Einzelversuch dargestellt, welcher die Hemmwirkung von 1 mg SC 9420 zeigt. Diese Wirkung unterscheidet sich nicht von derjenigen des SC 5233.

Es wäre denkbar, dass Spirolactone nicht den aktiven Transport von Natrium und Kalium hemmen, sondern durch Erhöhung der passiven Durchlässigkeit der Erythrocytenmembran den Ausgleich der Konzentrationsgradienten von Natrium und Kalium zwischen Zellinnerem und Serum begünstigen. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein. Spirolactonzusatz beschleunigt den passiven Austausch von Na und K in der Kälte nicht.

Der Nachweis einer Spirolactonwirkung auf die Na-K-Pumpe menschlicher Erythrocyten *in vitro* führte zu zwei weiteren Fragen. Als erstes wurde untersucht, ob sich der Hemmefekt der Spirolactone durch Nebennierenrindenhormone antagonisieren lässt. Da die Spirolactone in Substanz zu Blut gegeben wurden, sind auch die beiden ge-

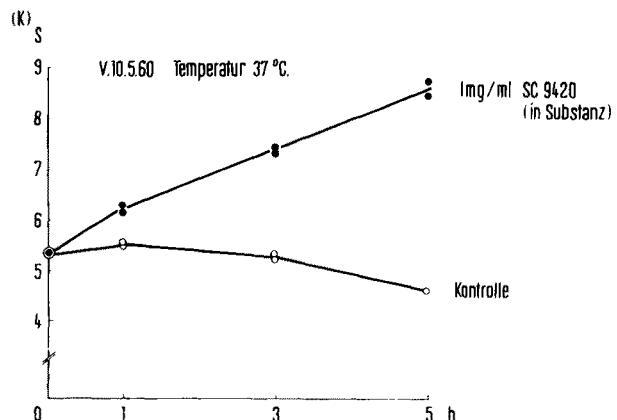


Fig. 1. Kaliumverlust der Erythrocyten in das Serum unter Spirolactonzusatz. Ordinate: Kaliumkonzentration im Serum in $\mu M/l$. Abszisse: Inkubationsdauer.

prüften Corticosteroide, Hydrocortison und Aldosteron, hoch dosiert worden. Nachdem Konzentrationen von 10^{-5} g/ml Blut keinen Effekt zeigten, wurden sie ebenfalls in Substanz in der gleichen Menge pro Ansatz wie SC 9420 dem Blut beigegeben. Auch damit konnte keine antagonistische Wirkung erzielt werden.

Zweitens stellte sich die Frage, ob für die Hemmwirkung der Spirolactone und der Herzglykoside der gleiche Angriffspunkt angenommen werden kann. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass Spirolactonzusatz zu einer maximal hemmend wirkenden Herzglykosidkonzentration ohne Einfluss bleiben würde. Es zeigte sich aber, dass sich der Hemmefekt der Spirolactone zu demjenigen einer maximal wirksamen Ouabainkonzentration addiert. Die Tabelle zeigt einen Einzelversuch. Es geht daraus hervor, dass Ouabain in einer Konzentration von 5×10^{-4} g/ml eine maximale Hemmwirkung auf die Na-K-Pumpe ausübt und dass durch Zusatz eines weiteren Herzglykosides diese Wirkung nicht mehr verstärkt werden kann. Jedoch entfaltet SC 5233 auch in Gegenwart dieser maximal wirkenden Ouabaindosis eine zusätzliche Hemmung. Dasselbe geht aus der Figur 2 hervor: Die Kurve für die Änderung des Na/K-Quotienten unter maximaler Herzglykosidblockierung wird durch die Zugabe von SC 9420 parallel und ziemlich genau um den gleichen Betrag nach unten verschoben wie die Kurve für die Kontrollansätze. Das heisst, dass auch bei maximal möglicher Herzglykosid-

⁸ C. M. KAGAWA, F. M. STURTEVANT und C. G. VAN ARMAN, J. Pharmacol. exp. Therap. 126, 123 (1959).

⁹ C. M. KAGAWA, Endocrinology 67, 125 (1960).

¹⁰ S. J. FARBER, D. J. ALEXANDER, E. D. PELLEGRINO und D. P. EARLE, Circulation 4, 378 (1951).

¹¹ A. L. HYMAN, W. E. JAQUES und E. S. HYMAN, Amer. Heart J. 52, 570 (1956).

¹² J. ORLOFF und M. BURG, Amer. J. Physiol. 199, 49 (1960).

¹³ W. S. WILDE und P. J. HOWARD, J. Pharmacol. exp. Therap. 130, 232 (1960).

¹⁴ F. SULSER, H. A. KUNZ, R. GANTENBEIN und W. WILBRANDT, Arch. exp. Path. Pharmak. 235, 400 (1959).

¹⁵ C. M. KAGAWA, E. G. SHIPLEY und R. K. MEYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 281 (1952).

¹⁶ J. E. HARRIS, J. biol. Chem. 141, 579 (1941).

¹⁷ F. SULSER und W. WILBRANDT, Helv. physiol. Acta 15, C 37 (1957).

¹⁸ G. D'AMIGO und A. CESANO, Exper. 17, 111 (1961).

Versuch 11. 1. 1961 1-Tag-Kälteblut g/ml Blut	Ausgangswerte			Endwerte			$\Delta [Na]_i/[K]_i$ (= 6 - 3)
	Na mM/l Zellen 1	K mM/l Zellen 2	$[Na]_i/[K]_i$ 3	Na mM/l Zellen 4	K mM/l Zellen 5	$[Na]_i/[K]_i$ 6	
Kontrolle	25,0	75,0	0,33	16,5	75,0	0,20	-0,13
Ouabain 5×10^{-4} (gelöst)	26,0	75,0	0,34	16,0	76,5	0,45	+0,11
Ouabain 5×10^{-3} (gelöst)	24,0	71,0	0,34	31,5	69,5	0,46	+0,12
Scillaren A 10^{-3} (in Substanz)	25,0	73,0	0,34	31,5	68,5	0,46	+0,12
Scillaren A 10^{-3} + Ouabain 5×10^{-4}	23,5	67,5	0,34	33,5	72,0	0,46	+0,12
SC 5233 10^{-3} (in Substanz)	25,0	71,5	0,35	30,0	93,0	0,32	-0,03
SC 5233 10^{-3} + Ouabain 5×10^{-4}	23,5	68,5	0,34	41,0	69,5	0,59	+0,25

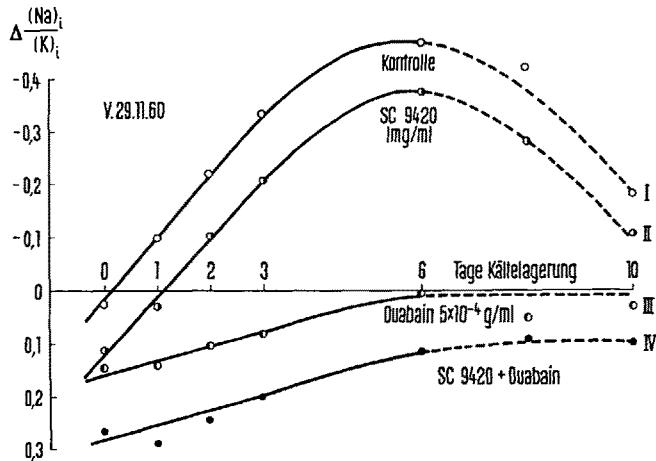


Fig. 2. Additiver Effekt von Spirolactonzusatz (10^{-3} g/ml Blut) zu einer maximal hemmenden Ouabainkonzentration (5×10^{-4} g/ml Blut) auf den Na- und K-Austausch der Erythrocyten. Ordinate: $\Delta [Na]_i/[K]_i$ für täglich wiederholte Versuche mit Blut der gleichen Blutentnahme. Abszisse: Versuchstage nach der Blutentnahme, d.h. Dauer der Kältelagerung vor dem Versuch. $\Delta [Na]_i/[K]_i$: Differenz zwischen End- und Ausgangswert des Verhältnisses $[Na]_i/[K]_i$ der Erythrocyten für 5 h Inkubation bei 37°C . Beachte: Verschlechterung des aktiven Transports in Kontrolle und Spirolactonansatz nach dem 6. Tag.

hemmung des aktiven Transportes dem passiven Ausgleich der Kationenkonzentrationen zwischen innen und aussen noch eine Kraft entgegenwirkt, welche durch Spirolactone beseitigt wird.

Dazu kommt noch ein zweiter augenfälliger Unterschied zwischen Herzglykosid- und Spirolactonwirkung. Mit zunehmender Dauer der Kältelagerung nimmt, wahrscheinlich bedingt durch den zunehmend erhöhten Ausgangswert des Na/K-Quotienten, die absolute Kationenverschiebung während der Wärmeinkubation zu. Im gleichen Masse wächst auch der Strophanthin-hemmbarer Anteil des aktiven Transports an (Differenz zwischen Kurven I und III der Figur). Im Gegensatz dazu bleibt

der Spirolacton-hemmbarer Anteil des aktiven Transportes unabhängig vom Ausgangswert gleich.

Die schlechte Wasserlöslichkeit der Spirolactone hindert leider, dass man ihre Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis untersuchen kann. Der Umstand, dass sie erst wirksam werden, wenn sie zum Teil ungelöst im Ansatz vorhanden sind, lässt vermuten, dass die Erythrocyten davon mehr aufnehmen können, als bei Sättigung im Serum vorhanden ist. Erst bei einer Anreicherung der Substanz in der Membran wird der Na/K-Transport beeinflusst¹⁹.

Summary. Experiments made on human red cells showed that spirolactones (SC 5233 and SC 9420) added to the sample as dry powder (10^{-3} g/ml) exert an inhibitory action on the active transport of sodium and potassium across the cell membrane. Spirolactone at its saturation concentration in serum (1.5×10^{-5} g/ml), however, was ineffective.

The inhibitory action was not affected by aldosterone or hydrocortisone.

Experiments involving exposure of red cells to spirolactone and a cardiac glycoside simultaneously led to the conclusion that these substances do not have the same mechanism of action. The inhibition caused by spirolactone added to the inhibition due to a supramaximal concentration of ouabain (5×10^{-4}).

H. W. IFF

Pharmakologisches Institut der Universität Bern (Schweiz),
29. Mai 1962.

¹⁹ Ich danke der G. D. Searle & Co., Chicago, für die freundliche Überlassung der Spirolactone SC 5233 und SC 9420 und der CIBA AG, Basel, für diejenige der Corticosteroide Aldosteron und Hydrocortison.