

## Zur Wirkung hypertoner Lösungen auf die markhaltige Nervenfaser<sup>1</sup>

Erhöhung des osmotischen Druckes der Aussenlösung durch Zusatz von Saccharose, Glucose oder Glycerin führt an der markhaltigen Nervenfaser des Kaltblüters zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und des Aktionsstroms<sup>2-4</sup>. Im Gegensatz dazu wird das lange plateauförmige Aktionspotential des Froschherzens durch hypertone Aussenlösung verkürzt<sup>5-7</sup>. Durch Abkühlung der Aussenlösung und gleichzeitige Einwirkung von 0,1-1,0 mM NiCl<sub>2</sub> kann das Aktionspotential der markhaltigen Nervenfaser in ein «herzmuskelähnliches» langes plateauförmiges Aktionspotential verwandelt werden. Im Laufe eingehender Untersuchungen<sup>8</sup> über den Entstehungsmechanismus dieser plateauförmigen Aktionspotentiale der markhaltigen Nervenfaser wurde gefunden, dass Erhöhung des osmotischen Druckes der Aussenlösung unter diesen Versuchsbedingungen ebenso wie an der Herzmuskelfaser eine Verkürzung des Aktionspotentials hervorruft. Über diese Beobachtungen, die möglicherweise einen näheren Einblick in die Wirkung hypertoner Lösungen auf erregbare Membranen gestatten, wird im folgenden berichtet.

**Methodik.** Ein einzelner Ranvierscher Schnürring einer isolierten motorischen Nervenfaser von *Rana esculenta* wurde kontinuierlich mit den zu untersuchenden Lösungen bespült. Das Aktionspotential des Schnürrings wurde mit der Gegenkopplungsmethode von FRANKENHAEUSER<sup>9</sup> registriert (vgl. 8, 10). Die als normale Aussenlösung verwendete Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung in mMol/l: NaCl 110,5; KCl 2,5; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 2,4. Als hypertone Testlösung wurde Ringerlösung mit 428 mM Saccharose benutzt; der osmotische Druck dieser Lösung ist 3mal so gross wie der der normalen Ringerlösung. In einigen Versuchen wurde ausserdem saccharosefreie hypertone Ringerlösung mit 3facher NaCl-Konzentration (331,5 mMol/l) verwendet. Die hypertone Lösung wirkte im allgemeinen 2 min auf den Schnürring ein.

**Ergebnisse.** Figur 1 A und B zeigt die bekannte Verlängerung des Aktionspotentials durch hypertone Ringerlösung bei Zimmertemperatur; die Verlängerung betrifft ausschliesslich die abfallende Phase des Aktionspotentials. In Figur 1C wurde der Ringerlösung 0,1 mM NiCl<sub>2</sub> zugesetzt und die Temperatur auf 4°C erniedrigt; das Aktionspotential wurde dadurch auf etwa 30 msec verlängert und bekam einen plateauförmigen Verlauf. Wenn jetzt der osmotische Druck der Aussenlösung durch Zusatz von Saccharose erhöht wurde, nahm die Dauer des Aktionspotentials ab (Figur 1D). Die Verkürzung beruhte auf einer Vergrösserung der Repolarisationsgeschwindigkeit während des Plateaus und einer gleichzeitigen Erhöhung der Repolarisationsschwelle am Plateauende.

In Figur 2 ist die Änderung der Dauer der abfallenden Phase des Aktionspotentials, die in 10 Versuchen durch Erhöhung des osmotischen Druckes der Aussenlösung bewirkt wurde, in Abhängigkeit von der bei normalem osmotischem Druck gemessenen Dauer der abfallenden Phase aufgetragen. Die Dauer der abfallenden Phase bei normalem osmotischem Druck wurde durch Zusatz von 0,1-1,0 mM NiCl<sub>2</sub> zur Aussenlösung und durch Herabsetzung der Temperatur variiert. Sie betrug bei NiCl<sub>2</sub>-freier Ringerlösung von 20-25 bzw. 4°C 0,4-0,6 bzw. 4-6 msec und bei NiCl<sub>2</sub>-haltiger Ringerlösung 1-4 bzw. 30-60 msec. Erhöhung des osmotischen Druckes der Aussenlösung bewirkte bei den kurzen Aktionspotentialen in NiCl<sub>2</sub>-freier Ringerlösung von Zimmertemperatur eine Verlängerung der Dauer der abfallenden Phase um 15-

166%; dies stimmt mit den Angaben von STÄMPFLI<sup>2</sup> und KITAMURA<sup>4</sup> gut überein, die auch auf die grosse Streuung des Effekts hinweisen. Bei den längeren Aktionspotentialen in NiCl<sub>2</sub>-haltiger Ringerlösung von Zimmertemperatur oder NiCl<sub>2</sub>-freier Ringerlösung von 4°C führte Erhöhung des osmotischen Druckes zu einer viel geringeren Verlängerung oder teilweise sogar zu einer leichten Verkürzung. Eine deutliche Verkürzung um 10-30% trat bei den langen Aktionspotentialen in NiCl<sub>2</sub>-haltiger Ringerlösung von 4°C auf.

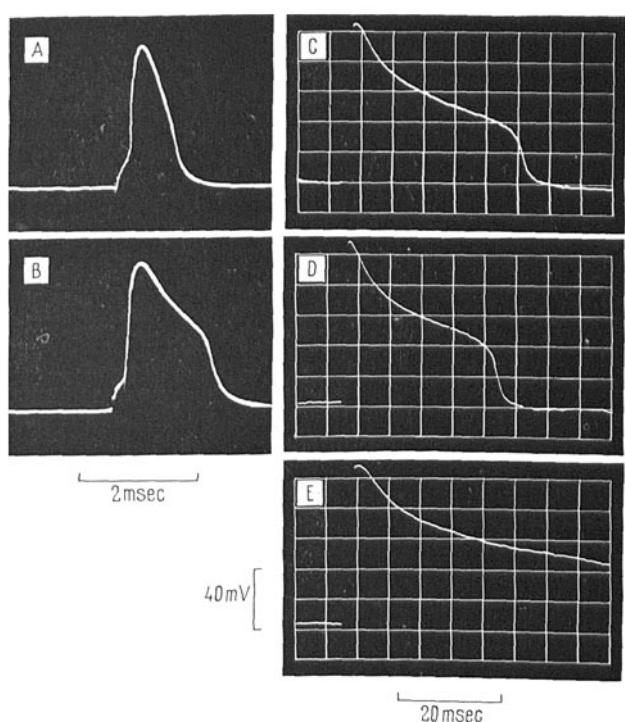


Fig. 1. Aktionspotential des Ranvierschen Schnürrings bei isotoner und hypertoner Aussenlösung. A: isotoner Ringerlösung bei 20,5°C. B: hypertone Ringerlösung mit 428 mM Saccharose bei 20,5°C. C: isotoner Ringerlösung mit 0,1 mM NiCl<sub>2</sub> bei 4°C. D: hypertone Ringerlösung mit 428 mM Saccharose und 0,1 mM NiCl<sub>2</sub> bei 4°C. E: hypertone Ringerlösung mit 331,5 mM NaCl und 0,1 mM NiCl<sub>2</sub> bei 4°C. Aufnahmen B, D und E 60 sec, 75 sec bzw. 130 sec nach Einschalten der hypertonen Lösung. A-B und C-E stammen von zwei verschiedenen Schnürringen (x bzw. ● in Figur 2).

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

<sup>2</sup> R. STÄMPFLI, Coll. Internat. C.N.R.S. 67, 159 (1955).

<sup>3</sup> P. MUELLER, J. gen. Physiol. 42, 137 (1958).

<sup>4</sup> S. KITAMURA, Jap. J. Physiol. 10, 51 (1960).

<sup>5</sup> E. CARMELIET und L. LACQUET, Arch. int. Physiol. Biochim. 66, 1 (1958).

<sup>6</sup> A. J. BRADY und J. W. WOODBURY, J. Physiol. (Lond.) 154, 385 (1960).

<sup>7</sup> N. SPERELAKIS, T. HOSHIKO, R. F. KELLER und R. M. BERNE, Amer. J. Physiol. 198, 135 (1960).

<sup>8</sup> H. MEVES, Pflügers Arch. ges. Physiol., 278, 273 (1963).

<sup>9</sup> B. FRANKENHÄUSER, J. Physiol. (Lond.) 135, 550 (1957).

<sup>10</sup> H. MEVES und R. STÄMPFLI, Helv. physiol. Acta 18, C 38 (1960).

Die Zeilen 1-3 der Tabelle geben die Mittelwerte für die prozentuale Änderung  $\Delta T$  der Dauer der abfallenden Phase nach 1 und 2 min langer Einwirkung der hypertonen Lösung sowie für die Änderung  $\Delta V_A$  des Spitzententials durch Hypertonie. Die Wirkung der hypertonen Aussenlösung auf die Dauer der abfallenden Phase war zeitabhängig: Sowohl die Verlängerung bei  $\text{NiCl}_2$ -freier Ringerlösung von Zimmertemperatur als auch die Verkürzung bei  $\text{NiCl}_2$ -haltiger Ringerlösung von  $4^\circ\text{C}$  gingen im Laufe der Zeit etwas zurück. Hypertonie bewirkte bei Ringerlösung von Zimmertemperatur eine geringfügige Zunahme des Spitzententials, während sie bei Gegenwart von  $\text{NiCl}_2$  oder herabgesetzter Temperatur das Spitzentpotential etwas verkleinerte. Das Ruhepotential wurde innerhalb der Versuchszeit nicht nachweisbar verändert. Die Effekte der hypertonen Lösungen waren voll reversibel.

Eine vollständige theoretische Deutung des doppelten Effekts hypertoner Aussenlösung auf die Dauer der Repolarisationsphase ist nicht möglich. Einige Hinweise ergeben sich jedoch aus folgenden zusätzlichen Beobachtungen:

(1) Die Depolarisation durch  $20 \text{ mM KCl}$  ( $V_{20 \text{ KCl}}$ ), die bei isotoner Aussenlösung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen  $15-28 \text{ mV}$  betrug, war bei hypertoner Aussenlösung um  $13-20\%$  herabgesetzt (Zeile 4 der Tabelle); das entspricht früheren Beobachtungen von SCHMIDT und STÄMPFLI<sup>11</sup> am Faserbündel. Die Herabsetzung der K-Depolarisation könnte darauf beruhen, dass die Zunahme der K-Permeabilität, die normalerweise bei Depolarisation eintritt, durch Hypertonie gehemmt wird. Diese Schlussfolgerung wurde gestützt durch Messungen des Widerstandes der nodalen Membran mit langen anodischen Testimpulsen, die das Membranpotential um  $13-23 \text{ mV}$  in anodischer Richtung verschoben. Während bei normaler K-Konzentration kein Einfluss hypertoner Aussenlösung auf den Membranwiderstand festzustellen war, wurde bei  $20 \text{ mM KCl}$  eine Vergrößerung des Membranwiderstands um  $12-34\%$  durch Erhöhung des osmotischen Druckes der Aussenlösung gefunden (Zeile 5 der Tabelle).

(2) Die bei kathodischer Polarisation um  $8-10 \text{ mV}$  mit einem RC-Glied (Zeitkonstante  $3,6 \mu\text{sec}$ ) gemessene maximale Anstiegssteilheit  $\dot{V}_{\text{max}}$  des Aktionspotentials wurde durch hypertone Aussenlösung um  $33$  bzw.  $24\%$  herabgesetzt (Zeile 6 der Tabelle), d.h. die durch kathodische Polarisation bewirkte Inaktivierung des  $\text{Na}^+$ -Systems wurde durch hypertone Aussenlösung verstärkt. Bei nor-

malem Ruhepotential bewirkte dagegen Erhöhung des osmotischen Druckes nur eine geringe Abnahme von  $\dot{V}_{\text{max}}$ , die bei 8 Versuchen im Mittel  $11,3\%$  betrug.

(3) Die durch hypertone Aussenlösung hervorgerufene Wasserbewegung durch die nodale Membran (und möglicherweise auch durch die Markscheide<sup>12</sup>) führt zu einem langsamem Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Innenkonzentration, der sich in einer Abnahme des  $\text{Na}^+$ -Potentials ausdrückt<sup>13</sup>. Änderungen des  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradienten zwischen Aussen- und Innenlösung haben ihrerseits einen deutlichen

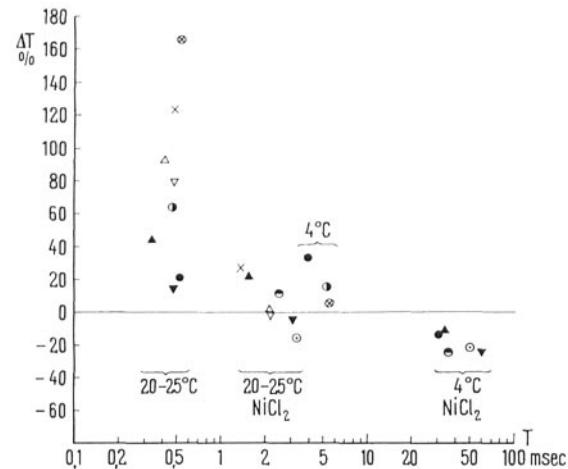


Fig. 2. Änderung der Dauer der abfallenden Phase des Aktionspotentials durch hypertone Aussenlösung unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Abszisse:  $T$  = Dauer der abfallenden Phase des Aktionspotentials in logarithmischem Maßstab bei isotoner Ringerlösung von  $20-25$  bzw.  $4^\circ\text{C}$  mit oder ohne  $\text{NiCl}_2$ . Ordinate:  $\Delta T$  = Änderung der Dauer der abfallenden Phase durch 2 min lange Einwirkung von hypertoner Aussenlösung mit  $428 \text{ mM}$  Saccharose, ausgedrückt in % der bei isotoner Aussenlösung gemessenen Dauer  $T$ . Die Dauer der abfallenden Phase ist die Zeit zwischen Spitze des Aktionspotentials und Beginn der steilen Repolarisationsphase. Messwerte aus 10 Versuchen, die durch verschiedene Symbole bezeichnet sind.  $\text{NiCl}_2$ -Konzentration bei  $\bullet$  und  $\circ$   $0,1$ , sonst  $1,0 \text{ mMol/l}$ .

<sup>11</sup> H. SCHMIDT und R. STÄMPFLI, Helv. physiol. Acta 17, 219 (1959).

<sup>12</sup> L. GARBY und P. NORDQUIST, Acta physiol. scand. 34, 162 (1955).

<sup>13</sup> B. FRANKENHAEUSER, J. Physiol. (Lond.) 160, 40 (1962).

Einfluss erhöhten osmotischen Druckes der Aussenlösung auf die elektrischen Eigenschaften des Ranvierschen Schnürrings unter verschiedenen Versuchsbedingungen

|                                 | Ringerlösung bei $20-25^\circ\text{C}$ | $\text{NiCl}_2$ -Ringerlösung bei $20-25^\circ\text{C}$ | Ringerlösung bei $4^\circ\text{C}$ | $\text{NiCl}_2$ -Ringerlösung bei $4^\circ\text{C}$ |
|---------------------------------|--|---|------------------------------------|---|
| 1 $\Delta T_1 \text{ min}$      | +73,5% (9)                             | + 0,6% (6)  | +10,0% (4)                         | -31,0% (5)  |
| 2 $\Delta T_2 \text{ min}$      | +68,3% (9)                             | + 5,1% (6)  | +12,5% (4)                         | -24,5% (5)  |
| 3 $\Delta V_A$                  | + 1,5% (11)                            | - 4,9% (8)  | - 5,9% (7)                         | - 3,2% (7)  |
| 4 $\Delta V_{20 \text{ KCl}}$   | -13,0% (2)                             | -19,0% (2)  | -18,0% (1)                         | -20,0% (2)  |
| 5 $\Delta R_{20 \text{ KCl}}$   | +34,0% (2)                             | +30,0% (2)  | +12,0% (1)                         | +21,0% (2)  |
| 6 $\Delta \dot{V}_{\text{max}}$ | -33,0% (3)                             | -24,0% (2)  |                                    |   |

$\Delta T$  = Änderung der Dauer der abfallenden Phase des Aktionspotentials.  $\Delta V_A$  = Änderung der Amplitude des Aktionspotentials.  $\Delta V_{20 \text{ KCl}}$  = Änderung der Depolarisation durch  $20 \text{ mM KCl}$ .  $\Delta R_{20 \text{ KCl}}$  = Änderung des Membranwiderstands, gemessen bei Aussenlösung mit  $20 \text{ mM KCl}$ .  $\Delta \dot{V}_{\text{max}}$  = Änderung der maximalen Anstiegssteilheit des Aktionspotentials, gemessen bei kathodischer Polarisation um  $8-10 \text{ mV}$ . Alle Änderungen sind in % des bei isotoner Lösung gemessenen Wertes angegeben; Messung 1 min (Zeile 1) bzw. 2 min (Zeile 2-6) nach Einschalten der hypertonen Lösung; Zahl der Versuche in Klammern;  $\text{NiCl}_2$ -Konzentration  $0,1-1,0 \text{ mMol/l}$ .

Einfluss auf die Dauer des Aktionspotentials: Wenn der osmotische Druck der Aussenlösung nicht durch Zusatz von 428 mM Saccharose, sondern durch Zusatz von 221 mM NaCl erhöht wurde, wurde das Aktionspotential, das bereits durch 0,1 mM-NiCl<sub>2</sub>-Ringerlösung von 4°C stark verlängert war, noch weiter verlängert (Figur 1E), wobei gleichzeitig eine leichte Depolarisation und eine nur wenige sec anhaltende Zunahme des Spitzenspotentials auftrat; der gleiche Effekt wird bei NiCl<sub>2</sub>-freier Ringerlösung von Zimmertemperatur beobachtet<sup>14,15</sup>. Umgekehrt führte Herabsetzung der Na<sup>+</sup>-Aussenkonzentration zu einer Verkürzung des Aktionspotentials<sup>8</sup>.

Die Geschwindigkeit der Repolarisation in der abfallenden Phase des Aktionspotentials hängt von der Geschwindigkeit und dem Ausmass der Inaktivierung der Na<sup>+</sup>-Permeabilität und der Aktivierung der K<sup>+</sup>-Permeabilität ab. Die unter (1) diskutierte Hemmung der K<sup>+</sup>-Permeabilitätszunahme durch hypertone Aussenlösung müsste die Repolarisation verlangsamen, während umgekehrt die unter (2) beschriebene Verstärkung der Inaktivierung den Repolarisationsvorgang beschleunigen und die Repolarisationsschwelle erhöhen würde; in der gleichen Richtung müsste nach den unter (3) angeführten Beobachtungen die Vergrößerung der Na<sup>+</sup>-Innenkonzentration wirken. Man müsste annehmen, dass je nach den Versuchsbedingungen entweder der die abfallende Phase verlängernde (und das Spitzenspotential erhöhende) Ef-

fekt (1) oder die im entgegengesetzten Sinne wirkenden Effekte (2) und (3) überwiegen. Die Richtigkeit dieser Arbeitshypothese wäre durch weitere Versuche zu prüfen.

**Summary.** The effect of hypertonic solutions on the action potential of single myelinated nerve fibres is described. Hypertonicity mainly changes the duration of the action potential: Short action potentials obtained in normal Ringer's solution at room temperature are prolonged, long action potentials due to 0.1-1.0 mM NiCl<sub>2</sub>-Ringer's solution and low temperature are shortened by hypertonicity. The changes in action potential duration are accompanied by small changes in action potential amplitude. In addition, hypertonicity reduces the depolarization produced by 20 mM KCl; inactivation of the sodium-carrying system under cathodal polarization is enhanced.

H. MEVES

1. Physiologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar, Deutschland), 30. August 1963.

<sup>14</sup> I. TASAKI, J. Neurophysiol. 13, 177 (1950).

<sup>15</sup> R. STÄMPFLI, J. Physiol. (Paris) 48, 710 (1956).

### The Relation Between Ionic Fluxes and the Action of Drugs on Smooth Muscle

The exact mechanism by which drugs such as adrenaline, noradrenaline, and acetylcholine act on smooth muscle is not known, but most theories propose an action on the cell membrane altering the permeability to ions<sup>1-3</sup>. Bradykinin and angiotensin are said to be active on the outside of the cell membrane probably by changing the flux of ions across the membrane<sup>4</sup>. Frog's stomach muscle is remarkable in that it contracts spontaneously and reacts to electrical and chemical stimulation for about 24 h when soaked in isotonic or half-isotonic solution of sucrose<sup>5-9</sup>; sodium is completely washed out of frog's stomach muscle by sucrose in about 1 h<sup>8</sup>. It is relaxed by adrenaline and

noradrenaline, and contracted by acetylcholine<sup>8,7</sup>, 5-hydroxytryptamine, histamine and substance P<sup>10</sup>. As there is no intracellular or extracellular sodium<sup>8</sup>, and no other extracellular ion, such as calcium or potassium, it is clear that the above drugs act directly and not by changing ionic fluxes across the membrane. Frog's heart perfused with half-isotonic solution of sucrose, is inhibited by acetylcholine, adrenaline and noradrenaline<sup>11</sup>, in such a heart sodium is completely washed out in about 1 h. Frog's rectus abdominis soaked in isotonic solution of sucrose, responds by relaxation when treated with acetylcholine<sup>12,13</sup>.

In further experiments it has been found that the stomach muscle of the frog, *Rana tigrina*, when soaked in half isotonic solution, 0.112 M, of sucrose, is caused to contract by synthetic bradykinin, kallidin and angiotensin, all 10<sup>-6</sup> g/ml. It is thus clear that these polypeptides

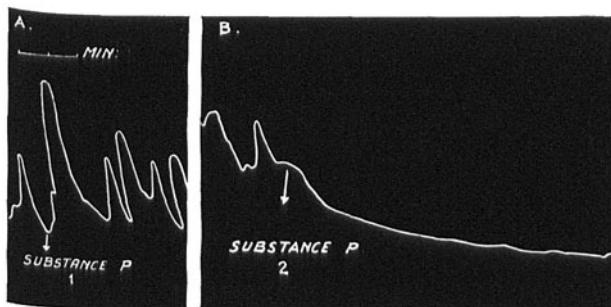


Fig. 1. The effect of substance P, 0.1 U/ml, on a transverse strip of frog's stomach muscle soaked for 2 h in half-isotonic (0.112 M) solution of sucrose, which was renewed every 15 min. A shows contraction produced by substance P. B shows the inhibitory effect of substance P in the presence of 3 mM Ca in the sucrose solution. Muscle immersed for 30 min in Ca-sucrose.

<sup>1</sup> G. BURNSTOCK, J. Physiology 143, 183 (1958).

<sup>2</sup> J. AXELSSON, E. BUEDING, and E. BULBRING, J. Physiol. 166, 857 (1961).

<sup>3</sup> E. BULBRING, Physiol. Rev. 42, Suppl. 5, 160 (1962).

<sup>4</sup> P. A. KHAIRALLAH and I. H. PAGE, Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 212 (1963).

<sup>5</sup> I. SINGH and S. I. SINGH, Proc. Ind. Acad. Sci. 18, 58 (1943).

<sup>6</sup> I. SINGH and J. V. BHATT, Proc. Ind. Acad. Sci. 45, 64 (1957).

<sup>7</sup> I. SINGH and A. K. ACHARYA, Proc. Ind. Acad. Sci. 46, 285 (1957).

<sup>8</sup> E. BOZLER, Amer. J. Physiol. 199, 299 (1960).

<sup>9</sup> R. L. KOLODNY and W. G. VAN DER KLOOT, Nature 190, 786 (1961).

<sup>10</sup> I. SINGH, Arch. int. Physiol. 71, 361 (1963).

<sup>11</sup> I. SINGH, Amer. J. Physiol. 203, 422 (1962).

<sup>12</sup> M. R. SWIFT, H. P. GORDON, and W. G. VAN DER KLOOT, Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1415 (1960).

<sup>13</sup> W. G. VAN DER KLOOT, *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions* (American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C. 1961), p. 317.