

## Änderung des Glukosetransports frischer menschlicher Erythrozyten bei längerer Inkubation

FAUST<sup>1</sup> hat gefunden, dass die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) für den Glukoseeintritt in menschliche Erythrozyten verlängert wird, wenn die Erythrozytensuspension länger als 3 h steht (ohne Temperaturangabe). Ähnliche Beobachtungen sind von BANG und ØRSKOV<sup>2</sup>, MELDAHL und ØRSKOV<sup>3</sup> und von MAWE<sup>4</sup> beschrieben worden.

Auf Grund dieser Befunde stellt sich die Frage, ob bei der Inkubation das Glukosetransportsystem selbst verändert wird, oder ob es sich um eine indirekte Wirkung über andere Faktoren handelt.

WEED et al.<sup>5</sup> haben eingehende Untersuchungen an menschlichen Erythrozyten durchgeführt, die sie im Serum über längere Zeit inkubierten. Hierbei treten im Erythrozytenstoffwechsel und bei den physikalischen Eigenschaften der Membran eine Reihe von Veränderungen auf: Nach 5 h ist das ATP in den Erythrozyten auf 74% und nach 10 h auf 15% abgesunken. Die Rigidität der Membran nimmt nach 4 h zu und nach 5 h setzt eine stetige Verminderung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten durch engporige Filter ein. Nach 10 h beginnt ein zunehmender Anstieg der Viskosität der Erythrozytensuspension und eine Zunahme des Calciumgehaltes. Außerdem nimmt das Zellvolumen zu, um nach etwa 20 h wieder abzusinken. Alle diese Veränderungen lassen sich durch eine 2stündige Inkubation mit 30 mM/l Adenosin wieder rückgängig machen. Adenosin bewirkt eine schnelle Regeneration von ATP in den Erythrozyten<sup>6</sup>. Es schien möglich, dass die von den genannten Autoren beobachtete Änderung des Glukosetransportes mit der von WEED et al.<sup>5</sup> beschriebenen Volumenzunahme zusammenhängt.

**Material und Methoden.** Blut aus der Armvene wurde unter sterilen Bedingungen defibriniert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Blutproben aus dem Inkubationsansatz entnommen, um das Erythrozytvolumen und die Glukosepermeation durch die Erythrozytenmembran zu untersuchen.

Die Erythrozyten wurden zentrifugiert und das Erythrozytensediment wurde nach dem Zentrifugieren 3mal in einer 300 mosm/l NaCl-Phosphatlösung, pH 7,4, gewaschen. Die Lösung bestand aus einem Teil isotonischen Natriumphosphatpuffer<sup>7</sup> und 9 Teilen 163 mM/l NaCl-Lösung. Die genaue Osmolarität wurde jedesmal mit einem Fiske-Osmometer bestimmt.

Das Erythrozytvolumen wurde mit zwei verschiedenen Methoden gemessen, einmal mit Hilfe des Hämatokrits und zweitens durch Messung der osmotischen Resistenz. Der Hämatokrit wurde bei 12000 g und mit geeichten Mikrohämatokritröhren (Firma Hilpenberg, Malsfeld, Deutschland) jeweils 6mal bestimmt (Standardabweichung  $\pm 0.4\%$ ). Vom abgelesenen Hämatokritwert wurden jeweils 3% Zwischenflüssigkeitsvolumen und das Hämoglobinvolumen (zu 35% des Volumens der Blutzellen angenommen, s. PONDER<sup>8</sup>) abgezogen, um das Volumen des Wasser-Raumes ( $V_{H_2O}$ ) zu erhalten. Wie auch bei der osmotischen Volumenbestimmung wird für  $V_{H_2O}$  der Nativzellen der Wert 1 angenommen. Die osmotische Volumenbestimmung benutzt die seitliche Parallelverschiebung der osmotischen Resistenzkurven unter der Annahme osmotischer Schwellung (Volumenzunahme durch Anstieg des osmotisch wirksamen, nicht-penetrierenden Zellinhaltes  $n$ ). Wenn gleiche Lichtstreuung gleiches Volumen und gleiches  $n$  angibt, gilt:  $n_1:n_2 = c_1:c_2$ , wobei  $c_1$  und  $c_2$  die Salz-Konzentrationen mit gleicher Lichtstreuung vor und nach der Schwellung bedeuten).

Für die Analyse des Glukosetransportes wurde eine Streulichtmethode zur Messung des Austrittes von Glukose benutzt (Fig. 1). Das von den Erythrozyten im

rechten Winkel gestreute Licht (L) wurde von einem Photomultiplier (PM) gemessen und der resultierende Strom mit einem Zeitschreiber (RG) registriert. Die Erythrozyten wurden in der Küvette durch einen Magnetstab (MR) gerührt. Dadurch treten infolge von Schlierenbildung schnelle Stromschwankungen auf. Durch Vorschalten einer geeigneten Kapazität konnten diese Schwankungen gedämpft werden, ohne das Resultat zu beeinflussen. Die Temperatur in der Messküvette wurde durch einen mit thermoreguliertem Wasser durchströmten Mantel (WM) auf 20°C konstant gehalten.

Für die Messung des Glukoseaustrittes wurden die gewaschenen Erythrozyten zunächst mit 150 mM/l Glukose äquilibriert. Dies geschah in einer 300 mosm/l Phosphatpufferlösung mit 150 mM/l Glukose (10% ige Erythrozytensuspension) bei 37°C für mindestens  $1/2$  h. Danach wurden die Erythrozyten noch 2mal in der gleichen Lösung gewaschen, um die während der Inkubation erfolgte geringe pH-Änderung zu korrigieren. Jetzt wurden jeweils 0,15 ml der 10%igen Erythrozytensuspension in die Messküvette (F) mit 15 ml Austrittslösung gespritzt, so dass sich in der Küvette eine Zellkonzentration von etwa 1:1000 ergab. Es wurden 3 verschiedene Austrittslösungen verwendet, mit Endkonzentrationen (nach Zugabe der Erythrozytensuspension) von 1,5, 3,0 oder 4,5 mM/l Glukose. Die Austrittslösung bestand weiter aus 300 mosm/l Phosphatpufferlösung und hatte außerdem einen Zusatz von 150 mosm/l NaCl, so dass die gesamte Elektrolytomsolarität der Austrittslösung 450 mosm/l betrug. Dies hat den Vorteil, dass zu Beginn des Glukoseaustrittes die Osmolarität in der Außenlösung und in den Erythrozyten etwa gleich ist, so dass initiale Volumensänderungen vermieden wurden.

Die Eichung erfolgte mit einer Erythrozytensuspension (1:1000) nach Glukoseaustritt in 300 mosm/l NaCl-Phosphatlösung durch stufenweisen Zusatz kleiner Volu-

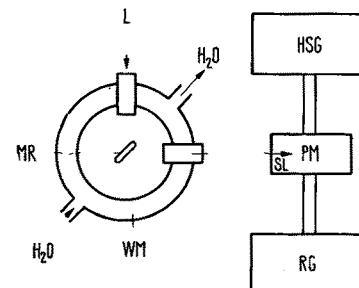


Fig. 1. Schematische Darstellung der Streulichtapparatur. L, Lichtquelle; SL, Streulicht; PM, Photomultiplier; HSG, Hochspannungsgerät; RG, Registriergerät; WM, Wassermantel der Küvette und MR, Magnetührstab. Weiteres siehe Text.

<sup>1</sup> R. G. FAUST, J. Cell. comp. Physiol. 56, 103 (1960).

<sup>2</sup> O. BANG and S. L. ØRSKOV, J. clin. Invest. 16, 279 (1937).

<sup>3</sup> K. F. MELDAHL and S. L. ØRSKOV, Skand. Arch. Physiol. 83, 266 (1940).

<sup>4</sup> R. C. MAWE, J. Cell. comp. Physiol. 47, 177 (1956).

<sup>5</sup> R. I. WEED, P. L. LACELLE and E. W. MERRILL, J. clin. Invest. 48, 795 (1969).

<sup>6</sup> C. BISHOP and D. M. SURGENOR, The Red Blood Cell, Academic Press, New York and London (1964), p. 174.

<sup>7</sup> A. V. MURALT, Einführung in die praktische Physiologie (Springer-Verlag, Berlin, 1944), S. 252.

<sup>8</sup> E. PONDER, Hemolysis and Related Phenomena (Grune and Stratton, New York 1948), p. 25.

men einer nahezu gesättigten NaCl-Lösung (etwa 5 M/l NaCl).

Die genaue Osmolarität wurde jeweils im Fiske-Osmometer gemessen. Die Zuordnung einer gegebenen Lichtstreuung zu einer Glukoseinnenkonzentration  $S_i$  (in mosm/l) ergibt sich aus den Gleichungen für osmotisches Gleichgewicht im Penetrationsversuch und bei der Eichung:

$$1. \frac{n}{V} = S_a + 450 - S_i \quad (\text{Austrittsversuch})$$

$$2. \frac{n}{V} = 300 + \Delta N \quad (\text{Eichkurve})$$

mit:  $n$  = Menge des nichtpenetrierenden osmotischen Inhaltes der Erythrozyten;  $V$  = Erythrozytenvolumen;  $S_i$  = Glukoseinnenkonzentration in den Erythrozyten;  $S_a$  = Aussenkonzentration an Glukose;  $\Delta N$  = mosm/l der zutritierten NaCl-Lösung ( $N$  = Gesamtsalzkonzentration in mosm/l aussen). Also:  $S_i = S_a + 150 - \Delta N$ .

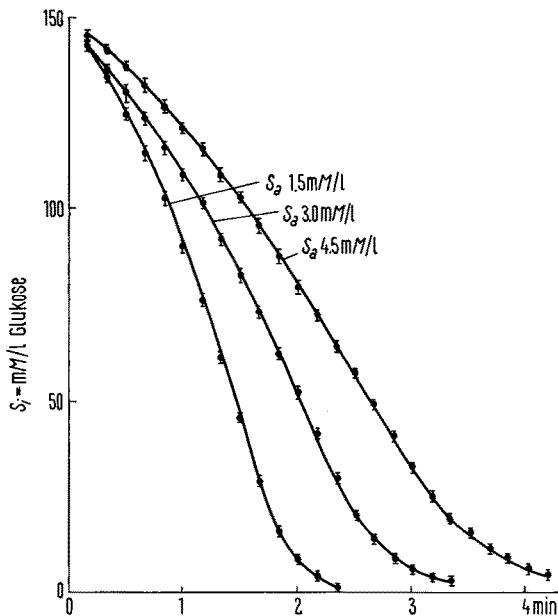


Fig. 2. Glukose-Austrittsversuch: Zeitliche Änderung der Glukoseinnenkonzentration ( $S_i$ ) bei konstanten Glukoseaussenkonzentrationen von 1.5, 3.0 und 4.5 mM/l. Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus 6 Einzelversuchen. Temperatur 20°C, pH 7.4.

Die bei der Titration mit konzentrierter NaCl-Lösung entstehende geringe Verdünnung der Erythrozytensuspension beeinflusst die Streulichtmessung nicht merklich. Es muss aber darauf geachtet werden, dass hierbei das pH in der Messküvette konstant bleibt. Dies kann durch einen entsprechenden experimentell ausprobierten Zusatz von NaOH zu der konzentrierten NaCl-Lösung erreicht werden. Die Figur 2 gibt das Resultat eines so ausgewerteten Austrittsversuches wieder.

Die Auswertung gibt somit die Änderung der Innenkonzentration (nicht der Innenmenge!) mit der Zeit wieder. Infolgedessen ist es notwendig, die übliche kinetische Gleichung in die entsprechende Form zu bringen.

Rasche Reaktionen zwischen Substrat ( $S$ ) und Träger ( $C$ ) sowie gleiche Beweglichkeit von  $C$  und  $CS$  vorausgesetzt, ergibt sich die für den stationären Zustand häufig benutzte Beziehung:

$$3. \frac{d(m_s)}{dt} = V_{\max} \left( \frac{S_i}{S_i + K_{CS}} - \frac{S_a}{S_a + K_{CS}} \right)$$

mit:  $m_s$  = intrazelluläre Substratmenge;  $t$  = Zeit;  $K_{CS}$  = Dissoziationskonstante von  $CS$ .

Zur Umwandlung in  $dS_i/dt = f(S_i, S_a)$  benutzt man  $S_i = m_s/V$  und die Beziehung für osmotisches Gleichgewicht  $(n + m_s)/V = S_a + N$ , und erhält schliesslich:

$$4. \frac{dS_i}{dt} = \frac{(S_a + N - S_i)^2}{(S_a + N) \cdot n} \cdot V_{\max} \cdot \left( \frac{S_i}{S_i + K_{CS}} - \frac{S_a}{S_a + K_{CS}} \right)$$

oder nach Integration zwischen  $S_{i_{t=0}}$  und  $S_i$

$$5. t = n \cdot \frac{(S_a + N)(S_a + K_{CS})}{V_{\max} K_{CS} N} \left[ \frac{S_{i_{t=0}} - S_i}{(N + K_{CS} + S_a) \frac{(S_a + N - S_{i_{t=0}})(S_a + N - S_i)}{(S_a + N - S_{i_{t=0}})(S_a + N - S_i)}} \right. \\ \left. + \frac{K_{CS} + S_a}{N} \ln \frac{(S_a + N - S_i)(S_a - S_{i_{t=0}})}{(S_a + N - S_{i_{t=0}})(S_a - S_i)} \right].$$

Der Faktor  $(S_a + N - S_i)^2 / (S_a + N) \cdot n$  der Gleichung 4. hat wie zu erwarten die Dimension Volumen<sup>-1</sup>. Er bedingt (wegen seiner Zunahme mit abnehmenden  $S_i$ ) den S-förmigen Verlauf der Kurven (siehe Figur 2) im Vergleich zur initialen Linearität von  $m_s = f(t)$ <sup>9,10</sup>. Gleichung 5. zeigt, dass bei Zunahme von  $n$  (z.B. durch Eintritt von  $Na^+$ )  $t$  direkt proportional zu  $n$  ansteigt, was eine Verlangsamung der Penetration bedeutet.

<sup>9</sup> W. WILBRANDT, Symp. Soc. exp. Biol. 8, 155, Fig. 8 (1954).

<sup>10</sup> K. SEN and W. F. WIDDAS, J. Physiol., Lond. 160, 392 (1962).

Tabelle I. Zeitpunkt  $t$  (in min), bei dem präinkubierte Erythrozyten eine Innenkonzentration ( $S_i$ ) von 125, 100, 75, 50 und 25 mM/l Glukose bei einer konstanten Aussenkonzentration ( $S_a$ ) von 1.5 mM/l Glukose erreichen

| Innenkonzentration<br>$S_i$ | Aussenkonzentration<br>$S_a$ | Präinkubationszeit bei 37°C (h) |              |              |              |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                             |                              | 0                               | 3            | 6            | 9            |
| mM/l Glukose                | mM/l Glukose                 | $t$                             | $t$          | $t$          | $t$          |
| 125                         | 1.5                          | 0.43 ± 0.04                     | 0.48 ± 0.03  | 0.47 ± 0.05  | 0.51 ± 0.05  |
| 100                         | 1.5                          | 0.81 ± 0.03                     | 0.87 ± 0.02  | 0.88 ± 0.04  | 0.95 ± 0.04* |
| 75                          | 1.5                          | 1.15 ± 0.02                     | 1.22 ± 0.02  | 1.24 ± 0.03  | 1.33 ± 0.03* |
| 50                          | 1.5                          | 1.46 ± 0.02                     | 1.52 ± 0.02* | 1.57 ± 0.02* | 1.66 ± 0.02* |
| 25                          | 1.5                          | 1.76 ± 0.01                     | 1.83 ± 0.02* | 1.92 ± 0.03* | 1.99 ± 0.02* |

Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus 6 Einzelversuchen, Temperatur 20°C und pH 7.4. \*P > 0.05, \*\*P > 0.01 und \*\*\*P > 0.001 gegenüber Präinkubation bei 0 h.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Beobachtungen über Volumenzunahme und solchen am Zuckertransport: Wenn die Verlangsamung des Zuckertransports mit der Volumenzunahme durch Anstieg von  $n$  zusammenhängt, muss  $t/n_0 = n/t_0$  sein, wo  $t$  und  $t_0$  Zeiten bis zur Erreichung gleicher Glukoseinnenkonzentration vor der Änderung ( $t_0$ ) und nach der Änderung ( $t$ ) bedeuten und  $n$  und  $n_0$  die zugehörigen osmotisch wirksamen Inhalte sind. Zur experimentellen Prüfung haben wir  $n$  unter Annahme dieser Beziehung aus der Verlangsamung  $t/t_0$  berechnet und mit der direkten Volumenbestimmung ( $V_{H_2O}$ ) verglichen.

Die Gleichungen für den Zuckertransport in der Erythrozytenmembran sind heute auf Grund eingehender kinetischer Untersuchungen durch komplexere Gleichungen ersetzt worden, die eine verschiedene Beweglichkeit des mit Zucker beladenen und des unbeladenen Carriers voraussetzen<sup>10</sup> und endliche Reaktionsgeschwindigkeiten von Carrier mit Substrat beinhalten<sup>11</sup>. Diese Gleichungen besitzen jedoch ebenfalls die direkte Proportionalität von  $t$  und  $n$ .

**Ergebnisse und Diskussion.** Zuerst wurde die Glukosepenetration durch die Erythrozytenmembran in Abhängigkeit von einer Präinkubation frisch gewonnener Erythrozyten bei 37°C während 0, 3, 6 und 9 h gemessen. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle I dargestellt. Die Tabelle gibt die Zeit an, bei der die verschieden lang präinkubierten Erythrozyten, die anschliessend mit Glukose aufgefüllt worden waren, bei einer konstanten Aussenkonzentration von 1,5 mM/l Glukose eine bestimmte Innenkonzentration an Glukose erreichen. Diese Zeitdauer nimmt nach 6- und 9stündiger Präinkubation signifikant zu. Die Zunahme der Zeit ist im Anfang des Versuchs (hohe Innenkonzentration) noch verhältnismässig gering, wird aber im weiteren Verlauf hoch signifikant. Ein qualitativ ähnliches Ergebnis wie oben beschrieben wurde ebenfalls bei einer Aussenkonzentration von 4,5 mM/l Glukose erzielt. Die Zunahme der Penetrationszeit nach einer längeren Inkubation frisch gewonnener Erythrozyten steht somit in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von FAUST<sup>1</sup> und anderen Autoren<sup>2-4</sup>.

Die Tabelle II gibt die Änderung des Volumens ( $V_{H_2O}$ ) in dem in Tabelle I dargestellten Versuch wieder. Die Werte von  $V_{H_2O}$  der Gruppen I und II stimmen befriedigend überein. Es ergibt sich ein deutlicher Anstieg der  $V_{H_2O}$ -Werte nach 6- und 9stündiger Präinkubation.

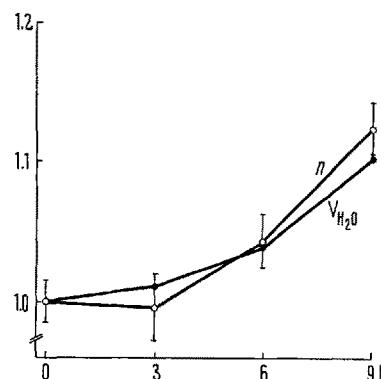


Fig. 3. Volumen ( $V_{H_2O}$ ) und nicht-penetrierender osmotischer Inhalt ( $n$ ) von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit bei 37°C. ●—●,  $V_{H_2O}$  aus der osmotischen Resistenz berechnet; ○—○,  $n$  aus den Glukoseaustauschkurven nach der Beziehung  $\sum t/t_0 = \sum n/n_0$  gewonnen. (Mittelwert und mittlere Fehler des Mittelwertes aus 12 Austrittskurven.)

Tabelle II.  $V_{H_2O}$ -Bestimmung aus osmotischer Resistenz und Hämatokrit an in Salzlösung gewaschenen Erythrozyten

| Präinkubationszeit (h) | 0     | 3     | 6     | 9     |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|
| I Osmotische Methode   | 1,000 | 1,010 | 1,043 | 1,102 |
| II Hämatokrit          | 1,000 | 0,997 | 1,031 | 1,090 |

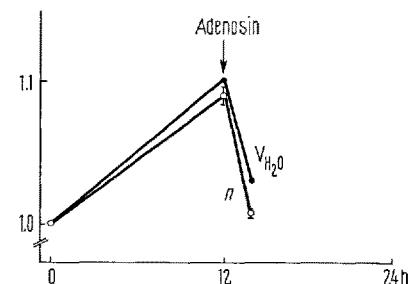


Fig. 4. Reversion der Zunahme von Volumen ( $V_{H_2O}$ ) und osmotischem Inhalt ( $n$ ) nach Zusatz von Adenosin. Im angegebenen Zeitpunkt wurden den bei 37°C präinkubierten Erythrozyten 30 mM/l Adenosin zugesetzt. ●—●,  $V_{H_2O}$  aus dem Hämatokrit berechnet; ○—○,  $n$  aus der Proportionalität von  $n$  und  $t$  gewonnen bei Glukoseinnenkonzentrationen ( $S_t$ ) (Mittelwert aus 6 Einzelversuchen) von 25, 50 und 75 mM/l (Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes aus 9 Messpunkten).

Die Figur 3 zeigt, dass zwischen der direkt bestimmten Volumenzunahme und den aus der Penetrationsverlangsamung errechneten Werten von  $n$  (Menge des nicht-penetrierenden Inhaltes der Erythrozyten) eine deutliche Parallele besteht. Dies äussert sich nicht nur im gleichartigen zeitlichen Verlauf von  $V_{H_2O}$  und  $n$ , sondern vor allem auch in ihrer gleichartigen Reversion nach Zusatz von Adenosin (Figur 4). Danach ist die Verlangsamung des Glukosetransportes auf die gemessene Volumenzunahme zu beziehen<sup>12,13</sup>.

**Summary.** Incubation of fresh defibrinated blood at 37°C increases the volume of red cells and decreases their permeation rate for glucose. The kinetics of sugar transport show direct proportionality between rate and the osmotic content of red cells. The measured volume changes and the changes of osmotic content calculated from the glucose permeation curves are in good agreement. Adenosine reconstitutes the increased volume and the decreased permeation rate in red cells. Therefore the decrease in permeation rate is explained by the increase in volume.

G. F. FUHRMANN, P. LIGGENSTORFER und W. WILBRANDT

Pharmakologisches Institut der Universität Bern,  
Friedbühlstrasse 49, CH-3000 Bern (Schweiz),  
12. Juli 1971.

<sup>11</sup> M. LEVINE and W. D. STEIN, Biochim. biophys. Acta 127, 179 (1966).

<sup>12</sup> W. WILBRANDT and G. F. FUHRMANN, in Vorbereitung.

<sup>13</sup> Frau S. FREI möchten wir für die Durchführung der osmotischen Resistenzbestimmungen und für die Blutspende danken. Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds, Projekt Nr. 3.265.69, durchgeführt.