

Über die Bestimmung des Extracellulärtraumes mit ^{51}Cr -EDTA an der Vorhofsmuskulatur des Meerschweinchens

Die genaue Kenntnis des Extracellulärtraumes (ECR) ist zur Berechnung der intracellulären Kationenkonzentrationen und entsprechend zur Prüfung funktionsabhängiger Elektrolytverschiebungen erforderlich. Im allgemeinen wird der ECR als Inulinraum¹⁻⁴ bestimmt; die Methode ist aufwendig und hat den entscheidenden Nachteil, dass nicht am gleichen Präparat ECR und intracelluläre Kationenkonzentrationen ermittelt werden können.

Methode. Die Präparation der isolierten linken und rechten Herzvorhöfe erfolgte in üblicher Weise. Die Inkubation wurde bei konstanter Temperatur in Carbogen-durchperlter Tyrode, die zusätzlich ^{51}Cr -EDTA enthielt (400 $\mu\text{Ci}/100\text{ ml}$) durchgeführt. ^{51}Cr -EDTA-

Komplex bezogen wir in Lösung von der Fa. Hoechst (spezifische Aktivität: 40 mCi/mg Cr). Nach Ablauf der verschiedenen langen Inkubationszeiten wurden die Präparate 90 sec lang bei einer Belastung von 250 g zwischen Blaubandfilterpapier abgepresst und in Durangläser eingewogen. Die ermittelten Feuchtgewichte betrugen bei den linken $35,40 \pm 0,51\text{ mg}$ ($n = 262$) bei den rechten Vorhöfen $21,95 \pm 1,05\text{ mg}$ ($n = 27$). Aus der «aktiven» Tyrodelösung entnehmen wir am Ende der Inkubationszeit mindestens 6 Proben zu 0,1 ml. Die Aktivität dieser Proben und der Gewebestücke wurde im Bohrloch gemessen und dann nach folgender Formel die Grösse des ECR ermittelt:

$$\text{ECR } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Impulse/min}_{\text{Gewebestück}} \times 100}{\text{Impulse/min}_{0,1\text{ ml Probe}}}$$

Das Ergebnis wird dann unter Berücksichtigung des jeweiligen Feuchtgewichtes in Prozent angegeben.

Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (mM/l): NaCl 149, KCl 5,4, CaCl_2 1,8, MgCl_2 1,05, NaHCO_3 11,9, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,42 und Glucose 5,5. Die statistischen Angaben in den Abbildungen erfolgen als Mittelwerte \pm mittlere Fehler der Mittelwerte ($\bar{x} \pm \bar{s}$). Als Vertrauensgrenze für einen signifikanten Unterschied (homogener t -Test) werden p -Werte von 0,05 angesehen.

Ergebnisse. Wie Figur 1 zeigt, verläuft der Aufnahme-prozess in 2 Phasen, spätestens nach 90 min ist ein Plateau erreicht, das nachweislich bis 180 min Inkubationsdauer bleibt. Erst nach 5 h zeigt ein deutlicher Anstieg die Membranschädigung mit der damit verbundenen Diffusion in die Zelle. Als optimale Inkubationszeit für die Bestimmung des ^{51}Cr -EDTA-Raumes, den

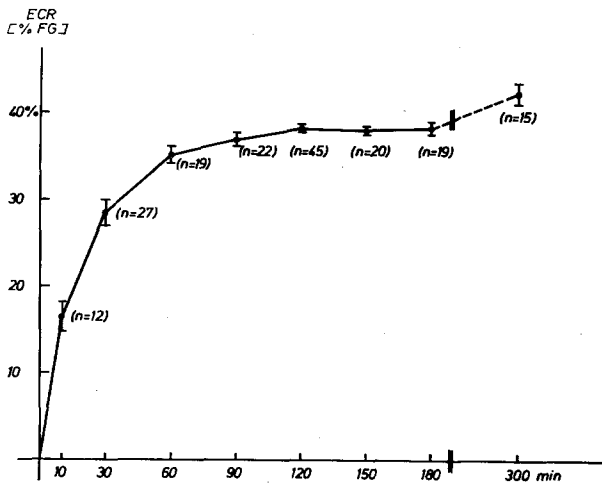


Fig. 1. Extracellulärraum (in % Feuchtgewicht) isolierter linker Meerschweinchenvorhöfe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in ^{51}Cr -EDTA-haltiger Tyrodelösung.

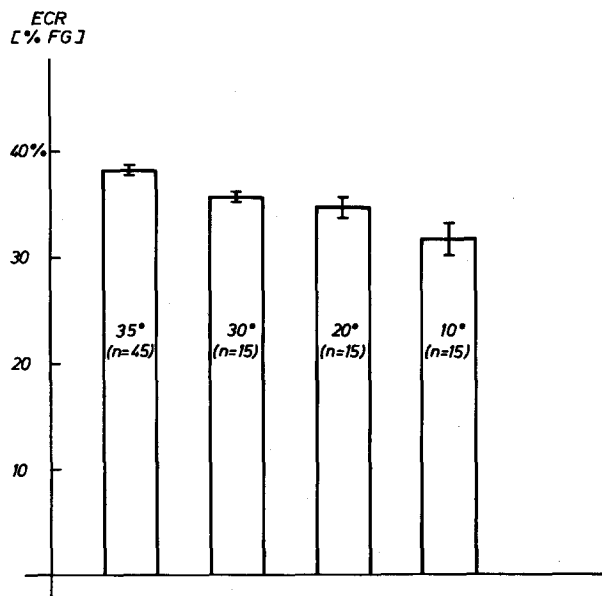


Fig. 2. Extracellulärraum in Abhängigkeit von der Temperatur der Inkubationsflüssigkeit.

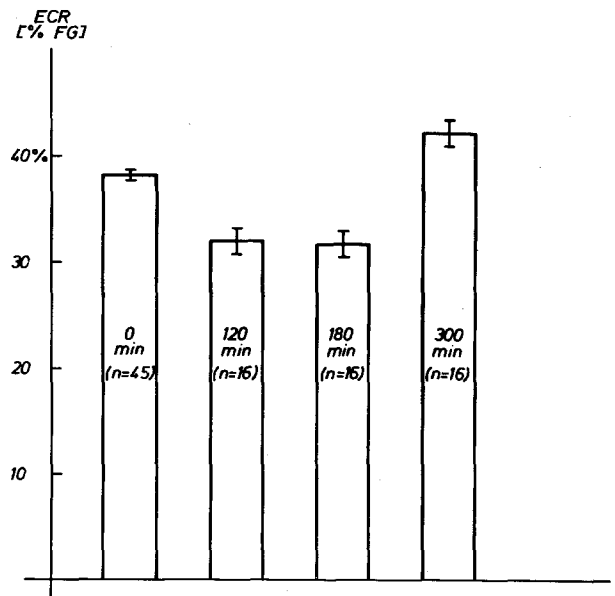


Fig. 3. Extracellulärraum isolierter linker Herzvorhöfe unter Kontroll- und Hypoxie-Bedingungen.

¹ H. G. GLITSCH, Pflügers Arch. 307, 29 (1969).

² H. HOCHREIN, M. REINERT und B. KRIEGSMANN, Z. ges. exp. Med. 139, 79 (1965).

³ E. PAGE und A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 44, 327 (1960).

⁴ B. RAYNER und M. WEATHERALL, Br. J. Pharmac. 12, 371 (1957)

wir im Rahmen unserer Methode mit den ECR gleichsetzen, nehmen wir 120 min an. Danach beträgt der ECR an linken $38,15 \pm 0,60$ und an rechten Vorhöfen $36,63 \pm 0,73\%$ Feuchtgewicht.

Wie auch bei der Inulinraumbestimmung sind konstante Temperatur^{1,3} und ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes wesentliche Voraussetzung: mit fallender Temperatur der Inkubationslösung (Figur 2) wird der ECR signifikant kleiner ($30^\circ\text{C } p < 0,025$, $20^\circ\text{C } p < 0,005$ und $10^\circ\text{C } p < 0,0005$). Ferner kommt es unter Hypoxiebedingungen zu einer deutlichen Verringerung des ECR ($120 \text{ min } p < 0,0005$ und $180 \text{ min } p < 0,0005$) – nach 5 Stunden dürfte auch bei diesen Untersuchungen eine beträchtliche Membranschädigung vorliegen.

Diskussion. In der Literatur werden über die Grösse des ECR von Herzmuskulargewebe unterschiedliche Angaben gemacht – sie schwanken von 9%² bis 44%⁴. Abgesehen von methodischen Problemen liegen offensichtlich Speziesunterschiede vor, ferner Unterschiede zwischen Vorhof- und Kammermuskulatur⁵. Bei vergleichbaren Versuchsbedingungen ergaben sich für linke Meerschweinchenvorhöfe Werte um 35% FG^{1,6-8}; da der Verteilungsraum extracellulärer Kationen nicht unbedingt dem Inulinraum entsprechen braucht, wird sogar ein maximaler ECR von 45% diskutiert¹. Folglich stehen unsere eigenen vorliegenden Ergebnisse mit den Literaturangaben in guter Übereinstimmung.

⁵¹Cr-EDTA erfüllt wesentliche Voraussetzungen, die an eine Substanz zur ECR-Bestimmung zu stellen sind: es dringt nicht in die Zelle ein⁹⁻¹³ und ist wie Inulin weitgehend inert, es findet also kein Metabolismus statt¹⁴. Der Komplex hat sich bei verschiedenen Untersuchungen als stabil erwiesen¹⁵, die Plasmabindung ist gering^{10,13,14} oder wird vollkommen negiert¹². Weiterhin garantiert das niedrige Molekulargewicht (343 gegenüber 5100 beim Inulin) eine ausreichend grosse Diffusionsgeschwindigkeit bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichtes. Die Vorteile der Verwendung von ⁵¹Cr-EDTA bestehen in der einfachen Messtechnik, in der guten Reproduzierbarkeit, dann in der mit 27,8 Tagen günstigen Halbwertszeit und

ferner insbesondere darin, dass man am gleichen Präparat Extracellulärraum und Kationenkonzentration bestimmen kann^{16,17}.

Summary. The extracellular space of isolated guinea-pig left auricles was studied by using ⁵¹Cr-EDTA. Under this condition, we measured the extracellular space as $38.15 \pm 0.60\%$ at 35°C . Under hypothermic and hypoxaemic conditions, we observed significant decrease of the extracellular space.

R. PRIGNITZ, U. MÜLLER und
G. HOFFMEISTER¹⁸

*Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Röntgendiagnostik der Universität,
Robert-Koch-Strasse 8a,
D-3550 Marburg/Lahn (Deutschland), 12. Oktober 1972.*

- ⁵ J. A. BARCLAY, E. J. HAMLEY und H. HOUGHTON, *Circulation Res.* 8, 1264 (1960).
- ⁶ H. BAUER, H. LÜLLMANN und M. RICHTER, *Pflügers Arch.* 227, 48 (1963).
- ⁷ P. J. GOODFORD und H. LÜLLMANN, *J. Physiol., Lond.* 161, 54 (1962).
- ⁸ H. G. LAHRTZ, H. LÜLLMANN und P. A. VAN ZWIETEN, *Biochim. biophys. Acta* 135, 701 (1967).
- ⁹ T. G. BRIEN, R. O. HAGAN und F. P. MULDOWNNEY, *Acta radiol.* 8, 523 (1969).
- ¹⁰ H. CH. BURCK, *Klin. Wschr.* 48, 105 (1970).
- ¹¹ C. E. CHANTLER E. S. GARNETT, V. PARSONS und N. VEALL, *Clin. Sci.* 37, 169 (1969).
- ¹² E. S. GARNETT, V. PARSONS und N. VEALL, *Lancet* 1, 818 (1967).
- ¹³ H. U. PIXBERG, *Strahlentherapie* 136, 700 (1968).
- ¹⁴ B. D. STACY und G. D. THORBURN, *Science* 152, 1076 (1966).
- ¹⁵ H. UTHGENANNT, L. HESSE und W. FÖRSTER, *Fortschr. Röntgenstrahlen* 109, 360 (1965).
- ¹⁶ C. BIANCHI und P. TONI, *Experientia* 20, 148 (1964).
- ¹⁷ D. A. HEATH, M. S. KNAPP und W. H. WALKER, *Lancet* 2, 1110 (1968).
- ¹⁸ Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Circadian Rhythm in Cerebral Blood Volume of Mouse

The superior cervical ganglion appears to be unique among the sympathetic ganglia in that it receives direct information about environmental lighting conditions via a pathway which, in the rat, is well elucidated¹. Accordingly, a diurnal rhythm controlled by light has been demonstrated for norepinephrine in the rat pineal² and submaxillary³ glands which are supplied by postganglionic fibres from these ganglia⁴⁻⁷. The superior cervical ganglia also give rise to adrenergic nerves innervating the pial and brain vascular beds^{8,9}. Estimation of the over-all cerebrovascular response by recording changes in cerebral blood volume (CBV) after sympathetic nerve stimulation and denervation, or after administration of sympathomimetic amines, has revealed a definite adrenergic vasoconstrictor influence on the intracranial vessels¹⁰. Against this background it could be assumed that the cerebral vascular bed was another region directly influenced by environmental light and, as a first step to test this hypothesis, CBV in mice was measured under various lighting conditions to reveal any diurnal rhythmicity.

Experiments were performed during January-February on 66 adult male NMRI mice (Anticimex, Sweden), approximately 25 g body weight. They were housed at 21°C in clear plastic cages with wire top and were fed

freely with standard pellet food and tap water. The following groups were studied: a) Animals kept on a 12 h light/12 h darkness schedule during 3 weeks (light source: 40 watt daylight fluorescent tubes giving an animal exposure of 100–150 lux; lights on: 06.00 h; lights off: 18.00 h). The animals were killed at various times during the last dark/light period (Figure). b) Animals maintained in the same way but killed after 6–8 h in the last light period (corresponding to between noon and 14.00 h). c) Animals

- ¹ R. J. WURTMAN, J. AXELROD und D. E. KELLY, *The Pineal* (Academic Press, New York and London 1968).
- ² R. J. WURTMAN, J. AXELROD, G. SEDVALL und R. Y. MOORE, *J. Pharmac. exp. Ther.* 157, 487 (1967).
- ³ R. Y. MOORE und R. A. SMITH, *Neuropharmacology* 10, 315 (1971).
- ⁴ J. ARIENS KAPPERS, *Z. Zellforsch.* 52, 163 (1960).
- ⁵ B. EHINGER, J. R. GARRETT und P. OHLIN, *Experientia* 23, 924 (1967).
- ⁶ K.-A. NORBERG, T. HÖKFELT und C.-M. ENEROTH, *J. Neuroviscer. Relat.* 37, 280 (1969).
- ⁷ CH. OWMAN, *J. Neuropharmac.* 3, 105 (1964).
- ⁸ H. KAJIKAWA, *Arch. Japan. Chir.* 38, 227 (1969).
- ⁹ K. C. NIELSEN und CH. OWMAN, *Brain Res.* 6, 773 (1967).
- ¹⁰ L. EDVINSSON, K. C. NIELSEN, CH. OWMAN und K. A. WEST, *Europ. Neurol.* 6, 193 (1971).