ÜBER DIE AKKUMULATION DER KALIUMIONEN DURCH MENSCHLICHE BLUTKÖRPERCHEN

Von

F. B. STRAUB

MEDIZINISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 9. Februar 1953)

Es konnte auf Grund zweier experimenteller Beweise gefolgert werden, dass die Blutkörperchen ihren K-Überschuss durch ständige Akkumulation aufrechterhalten. Erstens konnte vielfach nachgewiesen werden, dass irgendeine Hemmung oder Vernichtung des Stoffwechsels einen Konzentrationsausgleich zur Folge hat. Zweitens zeigen die Messungen des K-Austausches mit Hilfe des radioaktiven K-Isotops, dass pro Stunde und pro Liter Zellen 1,6 mM K ausgetauscht werden, d. h. dass soviel K in der Richtung des Gradienten verloren geht und dass wieder ebensoviel gegen den Gradienten aufgenommen wird. Keine dieser Methoden erwies sich aber als geeignet, um einen näheren Einblick in den Mechanismus dieser Akkumulationsprozesse zu gewähren. Obwohl verschiedene Theorien entwickelt wurden, ist diese Frage bisher überhaupt nicht gelöst. Die von uns hier beschriebene Methode gestattet, diese Erscheinung *kinetisch* zu untersuchen, was für die weitere Erforschung des Mechanismus unentbehrlich scheint.

Székely, *Mányai* und *Straub* (1) haben gefunden, dass menschliche Blutkörperchen nach partieller Hämolyse ihre Kationimpermeabilität bewahren. Werden die Zellen mit *wenig* Wasser bei 0° hämolysiert und stellt man dann die Isotonie durch Zugabe der entsprechenden Menge KCl oder NaCl her, so erhält man sogenannte »revertierte Zellen«, die im Zellinneren K- oder Na-Ionen enthalten. Solche Zellen verlieren das K oder Na durch Waschen nicht mehr. Es wurde nachgewiesen, dass die Zellmembrane im hypotonischen Zustand meistens erhalten bleiben, dass sie sich aber während dieser Hypotonie für einige Ionen, wie K^+, Na^+ und Phosphat — vorübergehend — als permeabel erweisen.

Diese Beobachtung gestattete uns eine experimentelle Untersuchung der Ionenakkumulation. Es wurde ein System geschaffen, in welchem mehr Na- als K-enthaltende menschliche Blutkörperchen — »revertierte Na-Zellen« dargestellt wurden. Wenn diese in einer isotonischen Flüssigkeit suspendiert wurden, so konnten sie bei 37° *gegen* den Konzentrationsgradienten mehrere Stunden lang K anhäufen.

Methoden

Menschliches Blut wird defibriniert, durch Baumwolle filtriert, wonach die Zellen abzentrifugiert werden. Der Zellbrei wird auf 0° gekühlt und mit 1,2 Volumen eiskaltem Wasser schnell verrührt. Die Mischung erscheint lackfarbig. Nach 15 Minuten gibt man 1/9 Volumen (des zugesetzten Wassers) 9% NaCl bei, worauf sich die Mischung trübt. Die »revertierten Zellen« werden abzentrifugiert und mit der gleichen Menge 0,9% NaCl ein- oder zweimal gewaschen. Sie werden dann in einer isotonischen Lösung suspendiert, so dass der scheinbare Hämatokritwert zwischen 40—60% liegt. Wenn es nötig war, ionisierte Substanzen ausser NaCl in die Zelle einzuschliessen (siehe unten), so wurden diese mit dem zur Hämolyse dienenden Wasser vermischt, nachdem ihre isotonischen Lösungen entsprechend (d. h. durch Zugabe von 1,2 Volumen Wasser) verdünnt wurden.

Die Suspension der derart präparierten Zellen wurde bei 37° inkubiert. Nach je 30 Minuten wurde eine kleine Probe genommen, zentrifugiert und aus der überstehenden Flüssigkeit K mit dem Flammenphotometer bestimmt. Milchsäure wurde mit der Methode von *Barker* und *Summerson* (2), ATP mit unserer spezifischen Mikromethode (3) bestimmt. Der scheinbare Hämatokritwert betrug meistens 40—60%. — Fruktosediphosphorsäure wurde enzymatisch dargestellt und gereinigt.

Ergebnisse

Werden die Zellen *ohne Substrat* in der oben beschriebenen Weise behandelt und dann in einer isotonischen Salzlösung (0,147 *M* NaCl und 0,08 *M* $KHCO_3$)

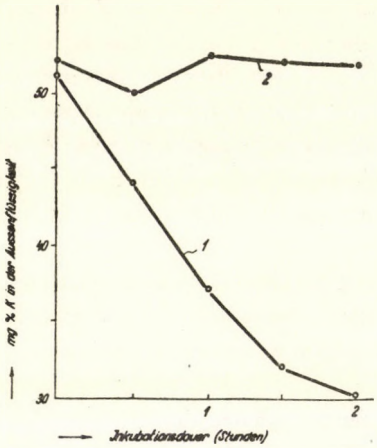

Abb. 1. Kaliumaufnahme von »revertierten Na-Zellen«
Kurve 1.: In Gegenwart von 100 mg% Fruktosediphosphat hämolysierte Zellen.
Kurve 2.: Ohne Zusatz von Substrat hämolysierte Zellen. Inkubation bei 37°.

bei 37° inkubiert, so findet man keine wesentliche Änderung der Verteilung des Kaliums. (S. Abb. 1., Kurve 2).

Führt man alle oben beschriebenen Manipulationen in Gegenwart von 100 mg% *Glukose* aus und inkubiert man die Zellen in Gegenwart von Glukose bei 37°, so findet man variable Ergebnisse. In einigen Fällen findet eine Akkumulation des K durch die Zelle (d. h. ständiges Abnehmen des Aussenkaliums)

statt, wie im Exp. 1 der Tab. I. In den meisten Fällen erfolgt aber nur eine kleine Akkumulation in der ersten halben Stunde, worauf sie dann vollständig aufhört. (Exp. 2 der Tab. I.) Die Milchsäurebestimmungen beweisen, dass es in den Fällen, wo keine Akkumulation stattfindet, keine Glykolyse mehr gibt, wird aber Milchsäure gebildet, so findet man eine ständige Akkumulation.

Wird aber an Stelle der Glukose während des hypotonischen Zustandes 100 mg% *fruktosediphosphorsaures Na* den Zellen zugegeben und wäscht man die »revertierten Zellen« mit einer isotonischen Salzlösung und inkubiert man sie in derselben Salzlösung* (0,147 *M* NaCl und 0,08 *M* $KHCO_3$), so findet man eine ständige, mehrere Stunden andauernde Akkumulation der K-Ionen. (S. *Abb*, 1. Kurve 1, sowie Exp. 1—3 der Tab. I.)

TABELLE I

*K-Akkumulation und Milchsäurebildung in »revertierten Na-Zellen«***

Exp. 1

Zusatz	100 mg % Glukose			100 mg % Fruktose-diphosphat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit	48,4	43,2	38,7	50,5	39,9	35,3
Berechnet mg% K in den »Zellen«	89,3	—	109	82,8	—	105
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	+ 19,7	—	—	+ 22,5
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,039	0,177	0,219	0,048	0,195	0,210

Exp. 2

Zusatz	100 mg % Glukose			100 mg % Fruktose-diphosphat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit.....	47,3	48,1	47,1	50,8	45,7	39,3
Berechnet mg% K in den »Zellen«	74	—	71,6	65,6	—	75,1
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	(—2,4)	—	—	+ 9,5
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,030	0,078	0,078	0,048	0,102	0,180

* Zugabe von Fruktosediphosphat *nach* der Herstellung der Isotonie ist überflüssig da die Zellen im *isotonischen* Zustande dafür impermeabel sind. Während der Hypotonie ist ein Teil des Fruktosediphosphats in die Zellen geraten, dieser Anteil kann später mit der Salzlösung nicht ausgewaschen werden.

** Wahrscheinlich werden auch geschädigte Zellen, die für K und Na leicht permeabel sind, im Hämatokritwert mitbestimmt. Somit sind die auf Grund des scheinbaren Hämatokritwertes berechneten Werte für Zellkalium stets kleiner als die tatsächlichen. — Der Hämatokritwert wurde zu Beginn wie auch am Ende der Inkubation bestimmt.

Exp. 3

Zusatz	100 mg % Fruktose-diphosphat			100 mg % Fruktose-diphosphat + 0,0025 M Arsenat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit.....	45,5	41,6	38,9	50,8	49,7	49,0
Berechnet mg% K in den »Zellen«	53,7	58,2	61,5	52,8	53,6	53,8
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	+ 7,8	—	—	+ 1,0
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,052	0,102	0,135	0,084	0,150	0,196
ATP gefunden mg/ml Suspension	0,040	0,060	—	0,00	0,00	—

In den weiteren Experimenten wurde die Fermentation mit Fruktosediphosphat aufrechterhalten. Es gelang nun sehr leicht zu zeigen, dass nicht die Fermentation selbst oder einer ihrer Einzelprozesse für die Akkumulation nötig ist, sondern nur die dadurch erzeugten makroergischen Phosphatverbindungen. Dies ist ganz klar aus den Ergebnissen zu sehen, die wir durch Zugabe von *Arsenat* gewonnen haben. Arsenat wird durch die menschlichen Blutkörperchen (ebenso wie Phosphat) nur sehr langsam durchgelassen. Wird aber Arsenat in dem oben beschriebenen hypotonischen Zustande den Zellen hinzugefügt, so wird es fast gleichmässig zwischen den Zellen und der Aussenflüssigkeit verteilt. Wegen der wenn auch schwachen Permeabilität für Arsenat haben wir dieselbe Konzentration Arsenat auch den Wasch- und Suspensionflüssigkeiten zugesetzt. Exp. 3 der Tab. I zeigt, dass in Gegenwart von 0,0025 *M* Arsenat die Milchsäurebildung aus Fruktosediphosphat sogar gesteigert wird, dass aber trotzdem keine K-Akkumulation erfolgt. Dagegen ist in den arsenathaltigen »Zellen« schon zu Beginn der Inkubation kein ATP vorhanden.

Diskussion

Eingangs sei angeführt, warum Fruktosediphosphat als Gärungssubstrat benützt wurde. Die Glykolyse der Blutkörperchen geht nur in jenem Falle vor sich, wo ATP vorhanden ist. Eine kleinere Konzentration des Fluorids, welche die Gärung anderer Zellarten — die eine grössere Reserve an ATP besitzen — nur noch um weniger als 50% hemmt, verursacht in 45—60 Minuten einen völligen Stillstand der Glykolyse, da während dieser Zeit alles ATP verschwindet (5). Das Ausschalten der ATP-Generation schaltet also unbedingt auch die Glykolyse aus. Das ist aber nicht der Fall, wenn man von Fruktosediphosphat ausgeht, denn in diesem Falle ist keine einleitende Phosphorylierung mehr nötig.

Während der beschriebenen Methode der Darstellung der »revertierten Na-Zellen« findet ferner eine leichtere oder schwerere Schädigung der Zellen statt. Diese Schädigung führt eventuell zur Aktivierung der normalerweise inaktiven ATPase des Blutkörperchens [siehe (4) und (5)]. Damit wird das ATP hydrolytisch gespalten, dies führt dann zum Stillstand der Hexokinasereaktion und die Glykolyse kann nicht mehr vor sich gehen (wie in Exp. 2, Tab. I). Dagegen wird die Fermentation aus Fruktosediphosphat durch die Aktivierung der ATPase überhaupt nicht gestört.

Die rechnerische Analyse aller Versuche zeigt (siehe Tab. I), dass in unseren Experimenten tatsächlich eine Akkumulation des Kaliums stattfindet. Mit der Ausnahme des Versuches, wo Arsenat vorhanden ist, ist die Akkumulation mit einer Milchsäurebildung, d. h. mit dem Stoffwechsel verbunden.

Aus dem Obengesagten ist es nun ganz klar geworden, dass nicht die Gesamtheit der Glykolyse oder irgendeine ihrer Einzelreaktionen für die Akkumulation des Kaliums verantwortlich ist. Für die Akkumulation ist nur das durch die Glykolyse erzeugte Adenosintriphosphat nötig. Wird die Phosphorylierung durch Arsenat unterbunden, so bleibt die Akkumulation völlig aus, obwohl alle Vorgänge der Glykolyse bis zur Bildung von Milchsäure vor sich gehen.

Obwohl im Arsenatversuch nur Fruktosediphosphat und keine Glukose zugegeben wurde, ist es dennoch möglich, dass das Fruktosediphosphat als Verunreinigung eine kleine Menge von freier Hexose enthielt. In diesem Falle könnte man sich vorstellen, dass die Hexokinasereaktion mit der Akkumulation verbunden ist und dass Arsenat die Akkumulation dadurch hemmt, dass es durch Ausschalten des ATP die Hexokinasereaktion vernichtet. Wäre dies der Fall, so könnte man erwarten, dass die Akkumulation des Kaliums durch Zugabe von Glukose + Fruktosediphosphat gefördert wird. Da dies nicht zu beobachten war, so haben wir die Möglichkeit einer Teilnahme der Hexokinase im Anhäufungsprozess ausgeschlossen.

Es wurde von mehreren Autoren [z. B. (6)] auf die merkwürdige Übereinstimmung der Geschwindigkeit des Glukoseverbrauchs und der Kaliumakkumulation hingewiesen. Bei 37° C verbrauchen 1 Liter menschliche Blutkörperchen pro Stunde 1,6 m*M* Glukose und häufen (während eines dynamischen Gleichgewichtes unter normalen Verhältnissen) eben 1,6 m äquivalentes K an. Daraus kann man auf einen engen Zusammenhang zwischen Glykolyse und K-Akkumulation schliessen. Die Milchsäurebildung in unseren »revertierten Na-Zellen« ist kleiner als in den intakten Blutkörperchen, da ein Teil der Enzyme und Kofaktoren während der Hämolyse entfernt wird. In diesen revertierten Zellen wurde nicht das oben geschilderte stöchiometrische Verhältnis gefunden, in einem Falle war sogar das Verhältnis der gebildeten Milchsäure zum akkumulierten Kalium kleiner als 1 : 5 (anstatt des erwarteten 2 : 1).

Die nächste Aufgabe besteht nun in der Verfolgung der weiteren Reaktionen, die unter Verwertung des ATP zur Akkumulation des Kaliums führen.

Es sei hier *I. Sztehlo* und *E. Horváth* der beste Dank für ihre wertvolle Hilfe ausgesprochen.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, mit deren Hilfe Na-haltige menschliche Blutkörperchen dargestellt werden können, die bei 37° gegen einen Konzentrationsgradienten K anhäufen. Damit kann die biologische Kaliumakkumulation *kinetisch* untersucht werden.

2. Die Blutkörperchen akkumulieren K auf Kosten des vorhandenen ATP. Die Akkumulation ist mit den glykolytischen Prozessen nicht direkt verbunden.

LITERATUR

1. *Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 571 (1952).
2. *Barker, S. B., Summerson, W. H.:* J. Biol. Chem. **138**, 535 (1941).
3. *Kramer, M., Pettkó, E., Straub, F. B.:* Kísérletes Orvostudomány **1**, 114 (1949).
4. *Straub, F. B.:* Magyar Tudományos Akadémia Orvosi Tudományok Osztályának Közleményei **3**, 31 (1952).
5. *Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 31, (1953).
6. *Weller, J. M., Taylor, I. M.:* Ann. intern. Med. **33**, 607 (1950).

НАКОПЛЕНИЕ K В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭРИТРОЦИТАХ

Ф. Б. Штрауб

Медицинско-химический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

На основе ранее произведенных исследований осмотического гемолиза человеческих эритроцитов автором описан метод, с помощью которого возможно кинетическое исследование K накопляющей функции эритроцитов. Метод основан на явлении т. н. »обратимого гемолиза« ; в течение гемолиза водой объемом приблизительно в 1,4 оболочка клеток становится проницаемой, например, в отношении к K, Na, фосфату, фруктозодифосфату. Восстанавливая изотонию добавлением Nacl проницаемость оболочек возвращается на нормальный уровень. Таким образом можно получить »клетки«, содержащие фруктозодифосфат, в содержимом которых количество Na превышает количество K. Суспендируя эти клетки в изотоническом растворе, содержащем приблизительно 40—50 мг% K, при температуре в 37°, в течение 2 часов в клетках накопляется значительное количество K, несмотря на то, что их исходная концентрация K было выше концентрации K в среде.