

Aus dem Pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. W. DOERR) und dem Physiologisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. H. NETTER) der Universität Kiel

**Die Zellschwellung als Folge des passiven Wasserwechsels\***  
**Ionenbilanzstudien an inkubierten Leberschnitten**

Von

**HANS-CHRISTIAN BURCK**

Mit 7 Textabbildungen

*(Eingegangen am 3. September 1962)*

Zwei grundlegende Probleme der physikalisch-chemischen Zellorganisation sind bisher nicht eindeutig gelöst: die Frage nach der Höhe des intracellulären osmotischen Druckes und die nach dem Regulationsmechanismus für die Aufrechterhaltung eines einigermaßen konstanten intracellulären Wassergehaltes. Ob sich bei allen Zellen das gleiche stabilisierende Prinzip auswirkt, steht ebenfalls noch dahin. Je nach der Leistung kann man zwei große Gruppen bilden: einmal handelt es sich um Zellen, die mit der Wasser- und Elektrolytsteuerung des Organismus aktiv in Zusammenhang stehen oder die eine exkretorische oder resorptive Aufgabe haben; diese werden an zwei Seiten mit Flüssigkeit unterschiedlichen osmotischen Druckes umspült. In die andere Gruppe gehören jene Zellen, die eine Stütz-, Arbeits-, Stoffwechsel-, Speicher- oder eine nervale Steuerungsfunktion ausüben und Wasser nur im Rahmen des Zellstoffwechsels austauschen; ihre Membranen trennen sie allseits von der gleichen Außenflüssigkeit. Nur nach Kenntnis der Mechanismen des Zellwasserwechsels dürfte eine Antwort darauf gefunden werden können, ob für die beiden verschiedenen Zelltypen unterschiedliche regulative Prozesse angenommen werden müssen.

Da mit einfachen Schwellungsversuchen eine Klärung der Frage, ob zwischen Zellinnerem und -äußerem unter physiologischen Bedingungen ein Wassergradient bestehe, nicht erreicht werden kann, habe ich zu ihrer Klärung gleichzeitig die Veränderungen des Na-, K- und Wassergehaltes inkubierter Rattenleberschnitte mit verschiedenen Versuchsanordnungen gemessen. Dabei war unsere Fragestellung, ob Wasserverschiebungen nur in Abhängigkeit adäquater Ionenrückverteilungen induzierbar seien oder ob einer der beteiligten Faktoren auch isoliert einer Änderung unterworfen werden könne. Denn der Beweis eines aktiven Wassertransports, der noch immer aussteht, kann nur dann als erbracht angesehen werden, wenn es gelungen ist, Wasserveränderungen ohne quantitativ hinreichende Mitwirkung von Elektrolyten zu provozieren. Eine etwaige „Wasserpumpe“ müßte dann isoliert gehemmt oder stimuliert werden können. Spielt sich hingegen die Wasserregulation als passive — damit rein osmotische — Folge eines Ionentransportes ab, so müßte die alleinige Inhibition oder Aktivierung des

\* Ausgeführt mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Transportes von Na oder K ihren Ausdruck in einer Wasserbewegung finden. Eine durch diese Änderung induzierte neue Donnan-Verteilung muß natürlich entsprechend berücksichtigt werden. Experimentell erzeugte Änderungen der Elektrolytverteilung müßten dann bei Vorliegen einer passiven Wasserregulation eine neue Einstellung der Wasserbilanz bewirken. Für die Verwirklichung dieser Überlegung bot sich in der Anwendung von Natrium-azid eine Möglichkeit, da hierdurch eine Hemmung des Kalium-Carrier-Systems bei Hefezellen nachgewiesen werden konnte (FOULKES).

### Methodik

**A. Versuchsansatz.** Maximal 0,4 mm dicke Leberschnitte nach der Methode von DEUTSCH wurden von insgesamt 60 normal ernährten und getränkten Wistar-Rattenweibchen (150 bis 200 g Gewicht) angefertigt, nachdem die Tiere nach einer Nahrungskarenz<sup>1</sup> von 12 Std getötet worden waren. Die sofort entnommenen Lebern wurden durch einmaliges kurzes Eintauchen in Eiswasser von anhaftenden Tierhaaren befreit und durch anschließendes 30 sec dauerndes Einbringen in *eisgekühltes* Medium abgekühlt. Für die Einzelheiten verweise ich auf unsere früheren Untersuchungen (BURCK 1958, BURCK u. NETTER). Hier waren alle 12 Gefäße mit 15 ml des gleichen Medium gefüllt und bereits vor dem Versuche in dem Luftthermostaten, in dem die Inkubation bei  $38 \pm 1^{\circ}$  vorgenommen wurde, bei perlendem Gasgemisch vorgewärmt worden. Für langdauernde Versuche änderten wir diesmal die Versuchsanordnung nicht ab. Nach guter Einarbeitung betrug die Vorbereitungszeit vom Augenblick des Tötens bis zum Einbringen des letzten Schnittes meistens um 11 min.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurden vier Schnitte aus jedem Gefäß mit einem Pinsel auf Filterpapier ausgebreitet, nach der früheren Methode abgetrocknet und zur Bestimmung des Feuchtgewichts am Versuchsende auf 1 mg genau gewogen. Der fünfte Schnitt wurde zur histologischen Untersuchung in Susa fixiert. Die morphologischen Ergebnisse sind einer eigenen Arbeit vorbehalten worden. Hatte sich während eines längeren Versuches im Inkubationsgefäß Schaum gebildet, so wurde er nicht mitgewogen.

Nach 22stündiger Trocknung im Ofen bei  $105 \pm 5^{\circ}$  und einer mindestens einstündigen Abkühlung in einem Exsiccator unter leichtem Vakuum wurden die Aluminiumschälchen mit den getrockneten Schnitten auf 0,1 mg genau gewogen. Dann wurde das Trockengewebe in die Kolben zur Veraschung gekippt. Die leeren Töpfchen wurden erneut auf die Waage gestellt, so daß sich das Gewicht des veraschten Materials aus der Differenz der Wiegewerte ergab.

Da wir nach Ablauf der angegebenen Versuchszeit je zwei Einheiten dem Luftthermostaten entnahmen, stellt *jeder Versuchswert das Mittel aus sechs Einzelmessungen mit je vier Schnitten dar*. Die Zahlenangabe für Versuche ( $n$ ) in den Tabellen bezieht sich also nicht auf die Einzelmessung, sondern auf die Tierversuche mit je sechs Bestimmungen. Durch diese große Zahl konnte der methodische Fehler der Ergebnisse möglichst klein gehalten werden.

**B. Auswertung der Versuche.** Aus dem Feucht- und Trockengewicht wurde der prozentuale Wassergehalt der Schnitte zu Versuchsbeginn ( $W_{gb}$ ; nicht inkubierte Kontrolle) und zu Versuchsende ( $W_{ge}$ ) errechnet. Nach unserem Prinzip der „*indirekten gravimetrischen Gewebsosmometrie*“ gibt dann die Differenz dieser Werte des prozentualen Wassergehaltes ( $\Delta H_2O$ ) ein Maß für das osmotische Verhalten der Schnitte; für Wasser ist seine Maßeinheit Prozent des Feuchtgewichtes:

$$\Delta H_2O = W_{ge} - W_{gb} > 0 \text{ bedeutet Schwellung}$$

$$\Delta H_2O = W_{ge} - W_{gb} < 0 \text{ bedeutet Schrumpfung}$$

$$\Delta H_2O = W_{ge} - W_{gb} = 0 \text{ bedeutet osmotisches Gleichgewicht}$$

<sup>1</sup> Es ist inzwischen nachgewiesen worden, daß eine kurz vor dem Versuch vorgenommene Fütterung der Tiere bei Wasserbilanzversuchen zu Fehlern führt (OPPE 1961 b).

Daß die drei ungeschnittenen Leberkontrollen mit den Schnitten vergleichbar sind und daher als Ausgangswert zu Versuchsbeginn gelten können, hatte ich bereits in Voruntersuchungen nachgewiesen und darüber berichtet. Was dort für den Wassergehalt ermittelt wurde, soll hier für den Na- und K-Gehalt unterstellt werden.

Wir übertrugen das Prinzip der Auswertung in analoger Weise auf die Bestimmung von Na und K, indem wir ebenfalls durch Bildung der Differenzen ( $\Delta_{\text{Na}}$ ,  $\Delta_{\text{K}}$ ) der Werte bei Versuchsbeginn und -ende ein Maß für die Ionenverschiebungen (in mval/kg Feuchtgewicht) erhielten.

Da die so errechneten Ergebnisse eine Aussage über die aktuelle Zu- oder Abnahme des Schnittes an Ionen machen, übernahm ich dafür die Bezeichnung *Netto-Natriumgehalt* und *Netto-Kaliumgehalt*. Weil sich die gemeinsame Anwesenheit von Na und K in oder außerhalb der Zelle für das osmotische Verhalten überlebender Schnitte addiert, wurde jeweils auch die Summe dieser Ionen errechnet ( $\Sigma_{\text{Na}+\text{K}}$ ) und in Anlehnung an das Schrifttum als Gesamtbase (*total base*) bezeichnet. Auch aus dem Wert der Gesamtbase kann nur mit Hilfe ihrer aktuellen Veränderung ein Bild über die osmotische Situation der Leberschnitte erhalten werden. Daher wurde aus der Differenz der Gesamtbase zu Versuchsbeginn und -ende der *Netto-Gehalt an Gesamtbase* ( $\Delta_{\text{Na}+\text{K}}$ ), der kurz *Netto-Gesamtbase* genannt werden soll, errechnet.

Um die Netto-Gesamtbase mit dem Gesamtbasengehalt der Medien in Beziehung setzen zu können, im Medium aber keine Verschiebungen gemessen wurden, weil bei dem Verhältnis von 400 mg frischem Lebergewebe zu 15 ml Medium meßbare Änderungen nicht zu erwarten waren, bestimmte ich einen sog. *hypothetischen Netto-Gesamtbasengehalt* der Medien: die Bestimmung der Gesamtbase an 43 normalen Lebern vor der Inkubation hatte einen Gehalt von 100,0 mval/kg Feuchtgewicht ergeben. Durchschnittlich wurde also jeder nach einer Inkubationszeit ermittelte Wert des Gehaltes an Gesamtbase um diesen Index bei der Errechnung der Netto-Gesamtbase vermindert. Für die Vergleiche der Netto-Gesamtbase der Schnitte mit dem Gesamtbasengehalt der Medien reduzierten wir deren Gehalt um einen hypothetischen Wert 100,0 mval/l und bezeichneten diese Zahl als hypothetische Netto-Gesamtbase der Medien. Es handelt sich folglich um einen rein rechnerischen Begriff.

Zur Berechnung des *intracellulären Gehaltes an Na* ( $\text{Na}_i$ ) und *K* ( $\text{K}_i$ ) griff ich auf Literaturangaben über die Bestimmung des extracellulären Raumes zurück. Denn da sich eine geringe Abweichung der mutmaßlichen Größe des extracellulären Raumes um einige Prozent nur unwesentlich bei der Errechnung intracellulärer Ionenkonzentrationen auswirkt und da eine Reihe von Messungen des extracellulären Raumes vorliegen, glaubte ich, auf eine eigene Bestimmung verzichten zu können. Nach ähnlichen Erwägungen nahmen RIECKER u. Mitarb. 15% des Gesamtfeuchtgewichtes zur Grundlage ihrer Berechnungen an der Leber. Von vielen von mir nachgeschlagenen Zahlenangaben seien auszugsweise nur folgende angeführt: allgemein 20% (ROBINSON 1953), Muskulatur 15% (MCLENNAN), Uterus dioestrisch 20%, oestrisch 12,5% (BREUER), Gehirn 32% (PAPPIUS u. ELLIOTT), Leber 19,2% (DULCE u. GÜNTHER<sup>1</sup>).

Bei meinen Berechnungen ging ich zunächst von der Hypothese aus, daß die ionale Konzentration des extracellulären extravasalen Raumes im Organismus mit der des Serum, *in vitro* mit der des Inkubationsmedium identisch sei und daß sich bei Änderungen in der Zusammensetzung sofort ein Ausgleich einstelle. Ferner postulierte ich eine geringe Zunahme des extracellulären Raumes durch die Inkubation, wie es auch in der Literatur beschrieben wird. So wurde zur Grundlage für die Berechnung der Leber *in situ* ein Extracellulärraum von 15% des Feuchtgewichtes und für die Leberschnitte nach der Inkubation 20% gewählt.

Die Gegenüberstellung der beiden Mikrophotogramme einer normalen Leber und eines Leberschnittes, der 90 min in Medium C<sup>2</sup> inkubiert war, stützt die Richtigkeit meiner Unterstellung vom Morphologischen (Abb. 1 u. 2), unterbaut sie jedoch nicht quantitativ.

**C. Medien.** Der größte Teil der Versuche wurde in dem von mir früher zusammengestellten Medium C<sup>2</sup> (BURCK 1958) durchgeführt. Vergleichsuntersuchungen unternahm ich mit

<sup>1</sup> Die Angabe lag erst nach Eingang bei der Redaktion vor.

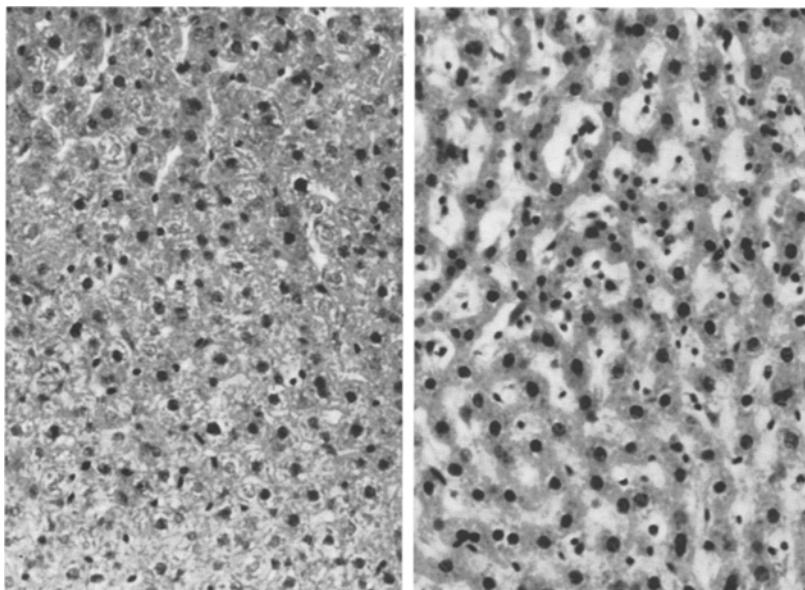


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Rattenleber. Kontrollschnitt mit dichtem Gefüge der Leberepithelien, Disse'sche Spalten geschlossen (unmittelbar nach Entnahme in Susa fixiert, HE-Färbung, Vergr. 1:250, Mikrophotogramm)

Abb. 2. Rattenleber. 90 min Inkubation in Medium C<sup>2</sup>. Die Leberepithelien stehen in Reihen (räumlich in Platten), zwischen denen die Disse'schen Spalten weit eröffnet sind. Damit dürfte der extracelluläre Raum größer geworden sein (Technik wie bei Abb. 1)

der von KREBS als Medium III angegebenen Lösung. Diese Nährflüssigkeiten haben folgende Zusammensetzung:

Medium III (KREBS)	Medium C <sup>2</sup> (BURCK)
95 Teile 0,9 % NaCl	80 Teile 1,35 % NaCl
4 Teile 1,15 % KCl	4 Teile 1,15 % KCl
3 Teile 1,22 % CaCl <sub>2</sub>	3 Teile 1,22 % CaCl <sub>2</sub>
1 Teil 2,11 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 Teil 2,11 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 Teil 3,82 % MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 Teil 3,82 % MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
3 Teile 1,3 % NaHCO <sub>3</sub>	21 Teile 2,6 % NaHCO <sub>3</sub> (pH 7,4)
3 Teile Natrium-phosphat-puffer (pH 7,4) (s. unten)	
	4 Teile 0,16 M Na-pyruvat
	7 Teile 0,1 M Na-fumarat
	4 Teile 0,16 M Na-L-glutamat
	5 Teile 0,3 M d-Glucose

Na-Phosphatpuffer: 100 Teile 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
25 Teile 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Einzelheiten zur Herstellung sind in den früheren Arbeiten nachzulesen. Insgesamt enthielten die Medien an Na und K:

Medium III: 145,7 mval/l Na; 5,93 mval/l K  
Medium C<sup>2</sup>: 218,0 mval/l Na; 5,93 mval/l K

Das Krebs-Medium wurde mit reinem O<sub>2</sub>, das Medium C<sup>2</sup> mit einem Gasgemisch aus 10 % CO<sub>2</sub>-Rest O<sub>2</sub> durchströmt, was nach der Henderson-Hasselbachschen Gleichung ein pH von 7,4 aufrechterhält.

Bei den Versuchen mit dem KREBS-Milieu waren entsprechend auch die Vorbereitungsgefäß mit dieser Flüssigkeit gefüllt. Auf Parallelversuche einer Inkubation in KREBS III und Medium C<sup>2</sup> von Schnitten derselben Ratte habe ich verzichtet.

**D. Azid-Versuche.** Zur Prüfung der Wirkung von Natrium-azid auf die Schnitte setzte ich jeweils nur dem in die Inkubationsgefäß einpippettierten Medium C<sup>2</sup> NaN<sub>3</sub> in einer Endkonzentration von  $1,645 \cdot 10^{-4}$  Mol zu. Die Vorbereitungsgefäß enthielten also reines Nährmedium.

**E. Bestimmung von Natrium und Kalium.** Die flammenphotometrische Schnellmethode ist bereits ausführlich beschrieben worden (BURCK 1961). Der Ionengehalt wurde auf das Feuchtgewicht (F) bezogen.

### Versuchsergebnisse

**1. Wasser-, Natrium- und Kaliumgehalt normaler Lebern.** Alle an den frisch entnommenen Lebern als Ausgangswerte ermittelten Ergebnisse, die mir den Gehalt zu Versuchsbeginn angaben, wurden zu einem Durchschnittswert zusammengefaßt, auf den die beobachteten Veränderungen des Wasser-, Na- und K-Gehaltes bezogen werden konnten. Als Durchschnittswert an 43 Lebern weiblicher Ratten kann ich folgende Zahlen mitteilen: 71,3% (39,6 Mol/kg F) Wassergehalt, 24,7 mval/kg F Na, 75,3 mval/kg F K und somit 100 mval/kg F Gesamtbasis im Organgewebe; bei Zugrundelegung eines extracellulären Raumes von 15% betrugen die Konzentrationen des intracellulären Na 3,5 mval/kg F, die des K 87,6 mval/kg F, was mit den Angaben von DULCE und GÜNTHER ausgezeichnet übereinstimmt.

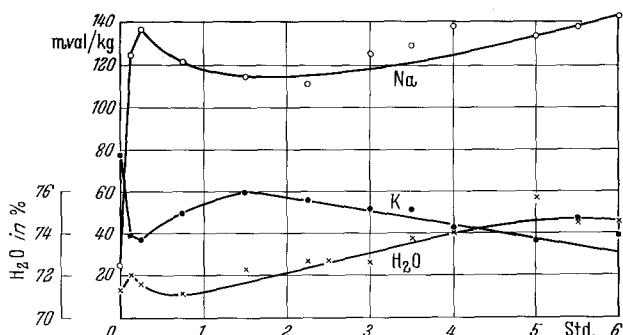


Abb. 3. Der Gehalt an Wasser, Natrium und Kalium von in Medium C<sup>2</sup> inkubierten Rattenleberschnitten bezogen auf das Feuchtgewicht

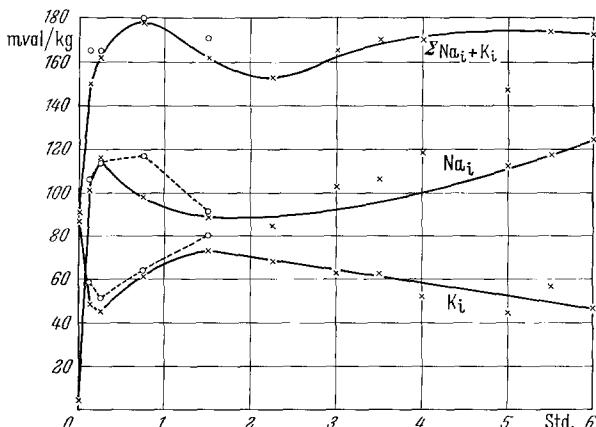


Abb. 4. Der intracelluläre Natrium-, Kalium- und Gesamtbasengehalt von in Medium C<sup>2</sup> inkubierten Rattenleberschnitten

reitungsmethode inkubierte ich zunächst analog der früheren Versuche Leberschnitte in dem von mir zusammengestellten Medium C<sup>2</sup> zwischen 7,5 und 360 min und bestimmte in unterschiedlichen Zeitabschnitten den Gehalt der Schnitte an Wasser, Na und K (Abb. 3 und 4). Dabei wird eine initiale rapide Na-Aufnahme

und K-Abgabe vor allem des intracellulären Elektrolytbestandes deutlich, denen rückläufige Tendenzen folgen. Erst bei längerer Versuchsdauer ist die intracelluläre „Hypernatriocytose“ und „Hypokaliocytose“ (BURCK 1960) bedeutsam und irreversibel. Bemerkenswerterweise tritt kein vollständiger Angleich des Elektrolytgehaltes der Zellen an die Konzentration des Medium ein; die Unterschiede betragen auch am Versuchsende nach 6 Std für Na noch 74,2 mval/kg F,

Tabelle 1. Vergleich des Na- und K-Gehaltes nach 6stündiger Inkubation in Medium C<sup>2</sup> mit dem Gehalt der Medien

	Na	Na <sub>i</sub>	K	K <sub>i</sub>
	mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F
Medium C <sup>2</sup>	218,0		5,93	
Medium III	145,7		5,93	
Schnitte 6 Std in Medium C <sup>2</sup>	143,8   125,3		39,5   47,8	

für K 33,6 mval/kg F (Tabelle 1). Vergleicht man aber den Na-Gehalt der Schnitte nach 6stündiger Inkubation mit jenem des Medium III, so erreicht er nicht einmal den Wert dieses Milieus. Ob diese Annäherung in unserem Medium bei länger dauernder Inkubation noch erfolgt oder sogar überschritten, oder ob eine biologische Grenze erreicht wird, ist nicht geprüft worden.

Die Berechnung der Differenz zwischen den Werten der Kontrollen und der inkubierten Schnitte läßt die Austauschvorgänge bei der Inkubation anschaulicher werden ( $\Delta H_2O$ ,  $\Delta Na$ ,  $\Delta Na_i$ ,  $\Delta K$ ,  $\Delta K_i$ ), da hierbei die reinen Nettoveränderungen erfaßt werden (Abb. 5). Außerdem tritt wegen der Subtraktion die Bedeutung des extracellulären Raumes zurück, so daß diese Vergleiche an Aussagekraft gewinnen. Die günstige Regulation des Wasserhaushaltes, wie sie bereits mitgeteilt werden konnte, läßt sich nun mindestens über 3 Std aufrechterhalten und bleibt sogar bis 6 Std auf 4 % für  $\Delta H_2O$  begrenzt. Dieser ausgeglichenen Wasserbilanz stehen erstaunlicherweise größere Änderungen des K- und Na-Gehaltes gegenüber. Dabei muß das Unvermögen der Schnitte, während der „Erholungsphase“ (15. bis 90. min) die Normwerte nicht einmal für intracelluläres K zu erreichen, hervorgehoben werden. Errechnet man die Netto-Ionenverschiebung für die Gesamtbase, so kommt es in der Zeit des Wassergleichgewichtes zu einer Ionenzunahme von etwas über 50 % des Ausgangswertes. Im weiteren Verlaufe des Versuches

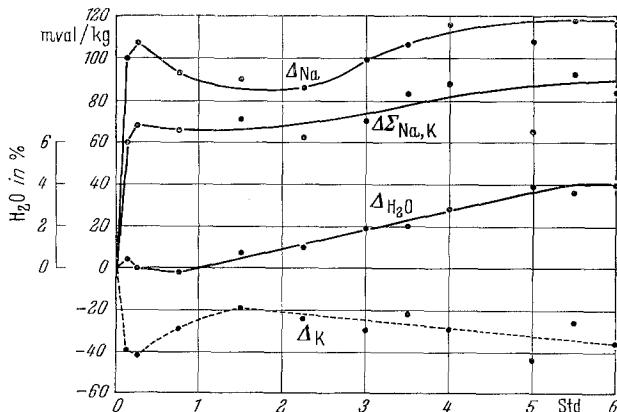


Abb. 5. Veränderung des Gehaltes an Natrium, Kalium, Wasser und Gesamtbase von in Medium C<sup>2</sup> inkubierten Rattenleberschnitten

wirkt sich die kontinuierliche Netto-Zunahme an Elektrolyten in einer mäßigen, langsam aber stetig fortschreitenden und der Aufnahme von Mineralien etwa parallel gehenden Einwässerung aus.

**3. Inkubation von Leberschnitten in Medium III.** Nicht nur die unterschiedliche Osmolarität verschiedener Medien, sondern auch die abweichende Wirkungsweise einer Phosphat- oder Bicarbonatpufferung wurde früher schon von uns bearbeitet. In diesem Zusammenhang hatten wir die vergleichsweise zu dem bicarbonat-gepufferten Medium C<sup>2</sup> erhöhte Wasserzunahme der Leberschnitte

im phosphat-gepufferten Medium III beschrieben (BURCK 1958, BURCK u. NETTER). Bei diesen Versuchen konnte ich das differente osmotische Verhalten bestätigen. Unser Augenmerk richtete sich hier auf die damit verbundenen Änderungen der Alkali-Ionen unter der Fragestellung, ob sich die abweichende Einwässerung in einer unterschiedlichen Aufnahme von Na und Abgabe von K widerspiegeln.

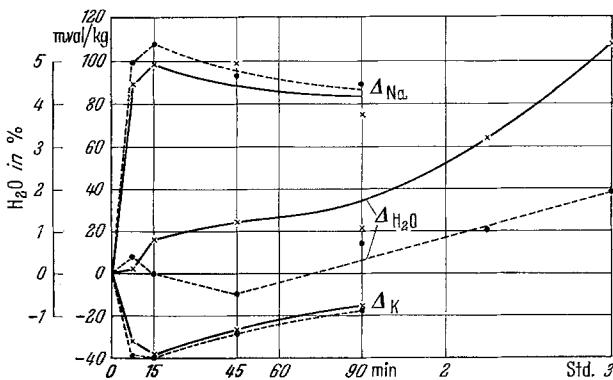


Abb. 6. Vergleich zwischen der Änderung des Natrium-, Kalium- und Wassergehaltes von Rattenleberschnitten, die in Medium III (KREBS) (—) und in Medium C<sup>2</sup> (BURCK) (---) inkubiert wurden

Diese gegensätzliche Reaktion konnte nicht beobachtet werden. Der K-Verlust und die Na-Aufnahme sind, obwohl die Wasserbilanz verschieden ist, während 90 min in den verglichenen Medien praktisch identisch gewesen (Abb. 4 und 6). Besonders bei dem Vergleiche des intracellulären Ionengehaltes ergeben sich auffällige Übereinstimmungen. Daß sich zu diesen

Entnahmzeiten auch keine verwertbaren Unterschiede in der Konzentration der Gesamtbase ergeben — wie es in Tabelle 2 gegenübergestellt wurde —, unterstreicht das prinzipiell ähnliche Verhalten der Schnitte in den verschiedenen Lösungen. Auch im Medium III kommt es zu einer derartigen Zunahme von (Na + K), daß sie den Ausgangswert um etwa 50 % übersteigt. Dies stimmt mit den neuen

Tabelle 2. Gegenüberstellung der Netto-Gesamtbase (mval/kg F) bei Inkubation in Medium C<sup>2</sup> und Medium III

Minuten	Medium C <sup>2</sup>	Medium III
7,5	60,7	55,6
15	67,9	59,6
45	66,1	70,4
90	70,9	65,1

Ergebnissen von BROOME und OPIE überein, bei denen ich aus den angegebenen Zahlen in Medium III ebenfalls eine Zunahme der Netto-Gesamtbase von 55 mval/kg F errechnen konnte.

Die grundsätzlich gleiche Konstellation der Elektrolytverteilung in Medium III und C<sup>2</sup> kommt vor allem auch bei Betrachtung nach der Differenzberechnung zum Ausdruck, welche in Tabelle 3 zusammengestellt ist.

Ich habe schließlich für die Zeit zwischen 7 und 45 min einen durchschnittlichen Gehalt der Schnitte an Netto-Gesamtbase ( $\Delta_{Na+K}$ ) ermittelt und ihn dem

Tabelle 3. Änderung des Wasser- und Elektrolytgehaltes inkubierter Rattenleberschnitte  
Werte der „indirekten Osmometrie“ (vgl. auch Anmerkung der Tabelle 1).

t min	n	$\Delta H_2O$ %	$\Delta Na$	$\Delta Na_i$	$\Delta K$	$\Delta K_i$	$\Delta Na + K$	$\Delta Na_i + K_i$
			mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F	mval/kg F
Inkubation in Medium C <sup>2</sup> (BURCK)								
7,5	6	0,4	99,7	98,1	-38,7	-39,3	60,7	58,8
15	6	0,0	107,9	113,0	-40,9	-41,8	67,9	71,2
45	6	-0,5	93,1	94,7	-28,8	-26,6	66,1	68,1
90	6	0,7	89,6	85,5	-18,8	-14,1	70,9	71,4
135	3	1,0	86,3	81,7	-23,6	-19,1	62,6	62,6
180	3	1,9	99,3	99,5	-29,2	-24,2	70,1	75,3
210	3	2,0	106,9	104,2	-22,2	-24,2	83,7	80,0
240	3	2,8	116,1	115,5	-28,6	-34,8	87,4	80,7
300	2	3,9	107,5	110,0	-43,1	-42,8	64,4	67,2
330	2	3,6	117,8	115,4	-25,6	-29,8	92,5	85,6
360	3	4,0	116,3	121,8	-36,3	-39,8	83,3	82,0
Inkubation in Medium III (KREBS)								
7,5	2	0,1	88,5	103,2	-32,9	-29,1	55,6	74,1
15	3	0,8	97,7	111,1	-39,2	-36,6	59,6	74,5
45	3	1,2	99,9	114,3	-27,6	-23,6	70,4	90,7
90	2	1,1	75,9	87,5	-15,8	-7,6	65,1	79,9

hypothetischen Netto-Gesamtbasengehalt der Medien (s. Methodik) gegenübergestellt (Tabelle 4). Trotz eines wesentlich höheren Gehaltes an ( $\Delta_{Na+K}$ ) im Medium C<sup>2</sup> kommt es in den ersten 45 min zu keiner unterschiedlichen Alkali-Ionenzunahme der Leberschnitte in den beiden verglichenen Medien. Nach der Inkubation in beiden Lösungen fällt eine leichte Erhöhung des Nettogehaltes an Gesamtbase der Leber gegenüber dem blutähnlichen Wert des Medium III auf. Diese absolute Ionenzunahme überschreitet den methodischen Fehler. Zusammenfassend halten wir fest, daß die Schnitte nicht nur Wasser, sondern auch in besonderer Beziehung dazu Elektrolyte ausgetauscht haben.

Tabelle 4. Durchschnittlicher Netto-Gesamtbasengehalt von Leberschnitten zwischen 7 und 45 min Inkubation und hypothetischer Netto-Gesamtbasengehalt der Medien (in mval/kg F bzw. mval/l)

	$\Delta Na+K$		$\Delta Na+K$
Leber in Medium III	61,9	Medium III . . .	50,6
Leber in Medium C <sup>2</sup>	64,9	Medium C <sup>2</sup> . . .	122,9

**4. Inkubation von Leberschnitten in Medium C<sup>2</sup> unter Zusatz von Na-Azid.** Das K-Carriersystem in der Zellmembran von Bäckerhefe wird mit Konzentrationen zwischen 3,3 und  $5 \cdot 10^{-4}$  Mol NaN<sub>3</sub> gehemmt (FOULKES). Zur Prüfung einer Wirkung von Na-Azid an inkubierten Leberschnitten setzte ich dem Medium C<sup>2</sup> NaN<sub>3</sub> in einer Endkonzentration von  $1,645 \cdot 10^{-4}$  Mol zu, wodurch das pH nicht geändert wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 graphisch in Beziehung zu den Kontrollen gebracht worden. Während der ersten 90 min der Inkubation verlieren die Schnitte meßbar weniger K und nehmen erheblich geringere Mengen an Na auf; im weiteren Versuchsverlauf gleichen sich die Werte den Kontrollen an. Für die intracelluläre Ionenbilanz liegen die Befunde noch auffälliger. Neben dieser Azid-Wirkung auf die Ionenverschiebungen kommt es

gemeinsam mit einem gegenüber den Kontrollen gut meßbar verminderten Gehalt an Gesamtbase zu einer Wasseraufnahme der Schnitte, während alle Werte nach 3stündiger Versuchsdauer keine Unterschiede mehr hervortreten lassen. Der Effekt des Azides dürfte sich also in irgendeiner Weise zeitlich erschöpfen.

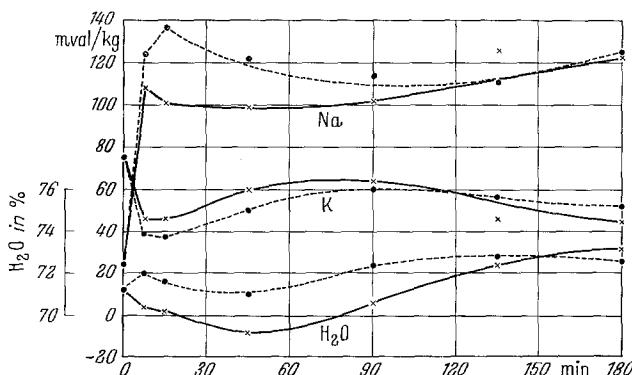


Abb. 7. Der Einfluß von Natrium-azid auf den Gehalt an Natrium, Kalium und Wasser bei der Inkubation (— Medium  $C^2 + NaN_3$ , - - Kontrollen in reinem Medium  $C^2$ )

### Diskussion

Zur Aufklärung von Austauschvorgängen zwischen intra- und extracellulären Flüssigkeiten zieht man Modellversuche, isolierte und durchströmte Organ-systeme oder die Inkubation von Gewebschnitten heran. Die Untersuchungen an Schnitten oder Gewebsbrei *in vitro* sind an möglichst physiologische Versuchsbedingungen geknüpft, die sich unter acht Forderungen subsummieren lassen (BURCK 1960). Mit unserer Methode einer „indirekten gravimetrischen Osmometrie“ und mit der Anwendung unseres Medium  $C^2$  habe ich diesen Ansprüchen soweit möglich Genüge getan.

Für die Untersuchung der Wasser- und Elektrolytregulation an überlebenden Zellen kann man auf verschiedene Gewebe zurückgreifen. Mit Vorteil werden Gehirn-, Nieren-, Muskel- und Leberschnitte benutzt, die sich aber unterschiedlich für diese Experimente eignen. Da die Leber ein großes und bei grober Betrachtung anatomisch einheitlich aufgebautes Organ ist, welches zudem sehr viele Zellen derselben Funktion auf dichtem Raum vereinigt, wurde sie in dieser grundsätzlichen Studie von uns bevorzugt.

Unterschiede in der Funktion von Läppchenzentrum, -mitte und -peripherie dürften für den Wasserwechsel nur gradueller, aber nicht qualitativer Art sein.

Der Einheitlichkeit des cellulären Aufbaues der Leber steht allerdings die Vielfältigkeit ihrer biochemischen Funktionen gegenüber. Wegen ihrer Fähigkeit der Gallesekretion könnte sie für derartige Regulationsuntersuchungen weniger geeignet erscheinen. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß die höher molekularen Verbindungen, vor allem Glykogen, beim Inkubationsversuch durch Zerfall osmotisch aktive Fragmente freisetzen (CONWAY u. GEOGHEGAN, SWAN u. MILLER). Da es sich hier um relative Messungen zwischen Vergleichsreihen handelt, kommen die zuletzt vorgebrachten Bedenken nicht zur Auswirkung.

Die Untersuchungen haben von dem Ionengehalt lebensfrischer Leberproben auszugehen. In Tabelle 5 stelle ich meine Ergebnisse denen anderer Autoren

gegenüber. Hierbei läßt sich eine Übereinstimmung meiner Werte mit denen der Literatur erkennen. Über die wechselseitigen Beziehungen zwischen Na-, K- und Wasser-Gehalt einzelner normaler Lebern soll an anderer Stelle gesondert berichtet werden.

Tabelle 5. *Der Na- und K-Gehalt normaler Rattenlebern*

Autoren	Na mval/kg	K mval/kg	Bemerkungen
MANERY u. HASTINGS . . .	33,6	127,0	Auf fettfreies Gewebe bezogen
FLINK u. Mitarb. . . . .	34,8	89,6	Auf fettfreies Gewebe bezogen
AEBI 1953 . . . . .	27,2	95,2	
ITOH u. SCHWARTZ . . .	55,0	87,0	
LEAF . . . . .	32,7	91,0	Umgerechnet bei Annahme eines Wasser- gehaltes von 71,3%
BERGER . . . . .	23,5	81,9	
RLECKER u. Mitarb. . . .	20,9	91,2	
DU RUISSSEAU u. MORI . .	47,0	111,8	
BROOME u. OPIE . . . .	23,6	94,1	
MORI u. DU RUISSSEAU . .	43,0	117,5	Umgerechnet gemäß dem angegebenen Feuchtgewicht
BURCK . . . . .	24,7	75,3	Nur Weibchen

Bei der *Bestimmung des intracellulären osmotischen Druckes* an einzelnen Organen sind die Ergebnisse widerspruchsvoll ausgefallen. Es stehen sich die Messungen eines mit dem Blut isotonischen Zellinnern (0,3 osM) denen einer doppelten Serumhypertonie (0,6 osM) gegenüber. Zusätzlich fiel bei anderen Versuchen, bei denen man den osmotischen Druck nicht bestimmt hatte, zahlreichen Autoren auf, daß ihre Schnitte in einem Medium von Serumosmolarität anschwollen (Lit. bei OPIE 1954/55, PETERS 1944, ROBINSON 1960, BURCK 1962). Bei eigenen Versuchen hatte ich eine leichte, aber gut meßbare Hypertonie ermittelt (0,45 osM) und Überlegungen diskutiert, nach denen die Hyperosmolarität eine Artefaktbildung sein könnte, so daß der wahre normotone, möglicherweise blutisotonische Zustand der Zellen im Organismus *in vitro* verdeckt werde (BURCK 1958, BURCK u. NETTER).

Wieweit methodische Schwierigkeiten für diese unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich zu machen sind, habe ich kürzlich diskutiert (BURCK). Dabei ist das Wesen der Methode einer *wägenden Osmometrie* (ELLIOTT, OPIE 1949) und unserer modifizierten Technik der „*indirekten gravimetrischen Osmometrie*“ (BURCK 1958, BURCK u. NETTER) erläutert worden.

Mit der Höhe des osmotischen Druckes im Zellinnern hängt die Aufrechterhaltung der Wasser- und Ionenkonzentration zusammen. Während eine Blutisotonie der Intracellulärflüssigkeit die passive Regulation des Wasserwechsels auf dem Boden einer Wasserverschiebung in Abhängigkeit von der Ionenverteilung verständlich erscheinen läßt, wird für den bluthypertonischen Zellinnen- druck die Hypothese eines gegen den osmotischen Gradienten arbeitenden aktiven Wassertransportes notwendig.

Die *Vorstellung eines aktiven Wassertransportes* wurde von ADOLPH inauguriert und von ROBINSON (1950, 1953) ausführlich dargelegt. Sie gingen von den zahlreichen Beobachtungen aus, daß der intracelluläre osmotische Druck aller geprüften Gewebe bei der Bestimmung durch Kryoskopie oder wägende Messung dem Serum gegenüber als hypertonisch ermittelt wurde. Nach dieser *dynamischen Auffassung* des Wasseraustausches wird die Frage, warum hypertonische Zellen im Organismus nicht schwollen, dahingehend beantwortet, daß sie trotz dieses

höheren osmotischen Innendruckes ständig in einem „Fließgleichgewicht“ stehen, bei dem passiv hineindiffundierendes Wasser unter Verbrauch von Energie aktiv heraustransportiert werde.

CONWAY (CONWAY u. GEOGHEGAN, CONWAY u. Mitarb.) erklärt die osmotische Druckzunahme im Zellinnern durch *autolytische*, osmotisch aktive *Spaltprodukte*. Seit jedoch die freie und schnelle Diffundierbarkeit dieser Substanzen unter Beweis gestellt werden konnte (SWAN u. MILLER), dürfte die Autolyse keinen tragenden Beitrag für die Erklärung der Zelleinwässeung bei isotonischer Inkubation mehr abgeben.

Die Frage, ob außer den Ionen auch Wasser aktiv bewegt werde (ROBINSON 1953) oder ob die Wasserbewegung denen der Ionen passiv folge (LEAF, PETERS), kann mit einfachen Schwellungsversuchen nicht entschieden werden. Daher untersuchten bereits zahlreiche Autoren die mit der Wassergehaltsänderung einhergehenden Verschiebungen von Na und K an der Leber (AEBI 1953, BROOME u. OPIE, HECKMANN u. PARSONS, LEAF, RIXON u. STEVENSON 1956, ROBINSON 1952a; an der Niere: DEYRUP).

Die Umstrukturierung des Elektrolyt- und die Änderung des Wassergehaltes wurde in ähnlicher Weise an anderen Geweben analysiert: Niere, Gehirn, Muskulatur, Samenblasenschleimhaut (Lit. s. ROBINSON 1960), Muskulatur (DRAHOTA u. HUDLICKA, DRAHOTA u. Mitarb.), Uterus (BREUER), Schilddrüse (BOATMAN u. PISARCIK). Dabei stimmt man überein, daß die Schnitte bei Inkubation K abgeben, Na in stärkerem Maße hinzugewinnen und — bei blutisotonischen Medien — einwässern. Mit Isotopen wurde bestätigt, daß der Na-Flux größer als der des K ist (WHITTAM u. DAVIES). Man hat sich um eine Koordinierung dieser Verschiebungen bemüht, jedoch läßt sich ein stöchiometrischer Abtausch von K gegen Na nicht herausarbeiten. Allerdings wurde bereits auf gewisse Beziehungen zwischen der Alkalizunahme der Zelle und der Einwässeung hingewiesen.

Diesen Beispielen folgend, habe ich zunächst unsere Schwellungsversuche durch die Bestimmung der Elektrolyte ergänzt. Im Gegensatz zu den anderen Untersuchern bin ich darüber hinausgegangen und habe die Werte der Elektrolyte und die des Wassers bei Inkubation in verschiedenen Medien in Beziehung zueinander gebracht. Im Unterschied zum Verhalten in reiner Kochsalzlösung (BROOM u. OPIE) konnte ich dabei sowohl in unserem bluthypertonischen Medium C<sup>2</sup>, als auch im blutisotonischen Medium III eine erhebliche, aber in *beiden* Lösungen *gleich starke* Zunahme der Schnitte an Na und einen ebenfalls in *beiden* Lösungen *gleichen geringen* Verlust an K messen. Stellt man meine K-Werte in Medium III (Tabelle 3 unten) neben jene von FLINK u. Mitarb., so stimme ich mit ihnen überein, daß der anfängliche K-Verlust den Zellbestand auf etwa 60% (bei uns 52%) reduziert, im weiteren Verlauf aber auf 80% des Bestandes wieder ansteigt. Man wird also mit der Annahme nicht fehlgehen, daß sich die Schnitte nach einer anfänglichen Schädigung durch die Vorbereitungszeit zunächst erholen, daß die regulativen Prozesse dann aber erlahmen. Während in meinen Schnitten im Medium III (0,3 osM) dieser Transmineralisation eine Wasseraufnahme parallel ging, hielten die Schnitte im Medium C<sup>2</sup> (0,45 osM) trotz der gleichen Elektrolytverschiebungen ihren Wassergehalt während etwa 3 Std auf normalen Werten. Obwohl sich die Medien in ihren *Konzentrationen* und *Kompositionen unterscheiden* und obwohl in Medium III eine Wasseraufnahme der Schnitte beobachtet werden mußte, war die *Netto-Zunahme an Gesamtbase* in beiden Medien *gleich* und erreichte etwas mehr als 50% der Kontrollen (vgl. auch PAPPIUS u. ELLIOTT). Damit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu denen von RIECKER u. Mitarb., die trotz Wasseraufnahme bei blutisotonischer Inkubation keine nennenswerte Zunahme der Gesamtbase hatten messen können. Auffallenderweise überschritt aber

in meinen Versuchen der Na-Gehalt der Schnitte selbst im Falle der Inkubation im höher osmolaren Medium C<sup>2</sup> (218 mval/l Na) nicht den Wert des blutisotonischen Medium III (145,7 mval/l Na), und das intracelluläre K blieb stets über dem Gehalt der Außenflüssigkeit erhalten. Während LEAF und ähnlich auch AEBI (1953), DEYRUP und MUDGE den für Medium III analogen Fall, daß nämlich das Gewebe bei der Schwellung mit dem Wasser auch an Elektrolyten gewinne, schon mit ihren Versuchen herausstellten, habe ich hiermit den umgekehrten Fall nachweisen können, daß unter extracellulär hypertonischen Bedingungen eine gleiche Elektrolytverschiebung *ohne* Wasseraustausch in Szene gehen kann. Dies hatte LEAF als theoretisch möglich präjudiziert. Es wird also die Vorstellung bewiesen, daß bei der Schwellung der Schnitte in isotonischen Medien zusammen mit Wasser Elektrolyte aufgenommen werden, was bisher eigentlich nur durch Berechnung erschlossen worden war. Die Wasserbewegung nach einer Störung der Ionengradienten steht somit bereits als rein osmotischer Folgevorgang fest.

Bei quantitativer Betrachtung muß für die Rückverteilung von K und Na bei der Inkubation angenommen werden, daß sowohl ein Austausch von Na gegen K, als auch — als unabhängiger Vorgang — eine Netto-Aufnahme von Na mit einem von mir nicht bestimmten Anion stattfinden. Da unter extracellulär verschiedenen Bedingungen die gleiche Menge an Gesamtbase aufgenommen wurde und diese sich im Fortgang des Versuches nicht steigerte, muß man zusätzlich auch die Vorstellung eines „Grenzwertes“ der Ionenaufnahme diskutieren, der bei der Rückverteilung der Gradienten an der noch überlebenden Zelle nicht überschritten wird. Auch die Frage der strukturgebundenen, osmotisch inaktiven K-Ionen (DANOWSKI, ELKINTON u. Mitarb., ELKINTON u. DANOWSKI) sollte erneut geprüft werden. Denn auch bei diesen Versuchen blieb der K-Gehalt der Schnitte immer über dem des Medium erhalten (so auch PAPPIUS u. ELLIOTT).

Nach der Feststellung, daß die Änderung des Ionengehaltes in Medium III und C<sup>2</sup> gleich ist, können die bisherigen Kenntnisse über den Wasserwechsel dahingehend präzisiert werden, daß es sich bei der Einwässerung und dem Na/K-Austausch um trennbare Vorgänge handelt. Es liegen wenigstens zwei Prozesse zugrunde: eine Rückverteilung der Salze und eine dadurch induzierte Wasserneuverteilung *ohne* Mitnahme von Ionen; dies kommt aber nicht einem Einstrom von Wasser allein gleich. Es soll damit nur hervorgehoben sein, daß das Wasser in Abhängigkeit von einer sich neu einstellenden Ionenverteilung gewechselt wird. Anhaltspunkte für ein anderes Verhalten des Wassers haben sich nicht ergeben.

Man kann zunächst in folgender Weise resumieren:

1. Schnitte nehmen *in vitro* nicht nur Wasser, sondern auch — evtl. in stärkerem Maße — Ionen auf.

2. Die früheren Versuche machen es möglich, einen bestimmten Gehalt der Schnitte an Elektrolyten einem Schwellungszustand einigermaßen zuzuordnen — was schon andere Autoren versuchten (AEBI 1952, 1953, LEAF, RIXON u. STEVENSON 1958) —, oder eine intracelluläre Zunahme an Elektrolyten durch eine molare Steigerung des Medium osmotisch inapercept werden zu lassen.

3. Bei unterschiedlichem Ionengehalt der Medien folgt die Rückverteilung von Na und K einem gleichen Prinzip, so daß in Lösungen stärkerer Konzentration gleiche Werte erreicht werden wie in jenen niederer; daher kann die Ursache der Ionenrückverteilung nicht an der osmotischen Konzentration des Medium liegen.

4. Die Rückverteilung der Ionen und etwaige Änderungen im Wassergehalt der Schnitte sind zwei getrennte Vorgänge, die aber voneinander abhängen.

5. Die Einwässerung richtet sich nach dem osmotischen Konzentrationsgradienten, der nach stattgehabter Ionenrückverteilung entstanden ist, und ist daher durch extracelluläre Ionenanreicherung kompensierbar.

Nach diesen Ergebnissen kann die Wasserregulation — mindestens für die Leberzelle — nicht mehr als eigene aktive Transportleistung der Zelle aufgefaßt, sondern darf vielmehr nur noch im Zusammenhang mit den aktiven Ionenverschiebungen angesehen werden, wie es lange vermutet wurde und neuerlich wieder aufgegriffen wird (SWAN u. MILLER; Lit. bei PETERS, ROBINSON 1960). Sie dürfte sich nach augenblicklicher Vorstellung in folgende Einzelschritte analytisch zergliedern lassen, die bereits mathematisch-physikalisch umschrieben wurden (LEAF): Die normale ruhende Zelle ist durch zwei in entgegengesetzter Richtung ausgebildete und in diesen beiden Richtungen Wasser anziehende Donnan-Systeme im osmotischen Gleichgewicht. Dabei werden Na-Ionen durch aktive Transportleistung aus der Zelle fast vollständig eliminiert und K-Ionen im Innern angereichert (Lit. bei CONWAY, NETTER 1961). Die Errichtung der hieraus resultierenden Konzentrationsgradienten könnte durch Energietransformation aus ATP vor sich gehen, wie es im Modellversuch gezeigt werden konnte (KELLER u. BLENNEMANN). Bei Stoffwechselstörungen, die die Energielieferung zur Aufrechterhaltung dieses Ionentransportes verringern, kommt es zu einer Rückdiffusion nicht nur von Na, sondern aus elektrostatischen Gründen eines zugehörigen Anion in die Zelle, weil bei der Rückdiffusion Na nicht in einem äquimolaren Verhältnis gegen K ausgetauscht wird. Hierbei dürfte zunächst eine Rückverteilung des aktiv transportierten Ions statthaben, dem eine weitere Änderung der Gesamtionenverteilung auf dem Boden eines sich neu einstellenden Donnan-Gleichgewichtes folgt. Dieser neue Gleichgewichtszustand wird wieder die Verteilung des Wassers einbeziehen. Ist es aber nun zu einem Überwiegen des intracellulären osmotischen Druckes gekommen, wird die Zelle das Phänomen der Schwellung, bei Überwiegen des Druckes des Inkubationsmedium eine Schrumpfung zeigen.

Solche Bedingungen dürften bei allen *in vitro*-Versuchen vorliegen, weil neben der Schädigung durch das Schneiden vor allem während der Vorbereitungszeit ein Stoffwechselengpaß durch Kühlung, Sauerstoff- und Substratmangel, ungenügende Pufferung und Ansammlung von Stoffwechselschlacken unvermeidbar ist. In dieser unterwertigen Stoffwechselsituation ist die Leber außerstande, das Zellinnere von Na freizuhalten. Infolge der Zunahme an intracellulärer Gesamtbasis und damit des intracellulären osmotischen Druckes kommt es durch Diffusion zu einer Zelleinwässerung. Man kann diesen Vorgang als *isotonische Expansion des intracellulären Flüssigkeitsvolumen* ansprechen, bei deren Entstehung nach meiner Überlegung *zeitlich eine hypertonische und eine spätere hypotonische Phase* zu unterscheiden sind. Auch der zweiphasige Austausch des K spricht dafür (WHTIT-TAM u. DAVIES 1954). Es gibt also genügend Gründe für eine zeitlich nachgeordnete Folge von Na-Aufnahme und Einwässerung. Ein unzureichender Wassereinstrom verhindert hingegen eine isotonische Ausdehnung des intracellulären Raumes. Damit charakterisieren sich Schwellung und Einwässerung als eine der Ionengleichgewichtseinstellung nachgeordnete passive Verteilung des Wassers. Erhöht man nun den osmotischen Druck der Inkubationsflüssigkeit um

den molekularen Betrag, den die Zunahme an intracellulären Elektrolyten ausmacht, so wird die Ursache der Wassereinlagerung kompensiert. Gleichzeitig wird aber eine artefizielle intracelluläre Ionenzunahme erreicht, die früher als physiologische Zellhypertonie gedeutet wurde. Dies habe ich mit Medium C<sup>2</sup> bei den früheren Experimenten und hier zeigen können. Der rein osmotische Effekt der Zellwasserregulation wurde auf diese Weise manifest, da die ionale Rückverteilung in beiden Medien (C<sup>2</sup> und III) gleich war. Hiermit wurde die Annahme einer „Wasserpumpe“ oder einer intracellulären osmotisch wesentlich wirksamen Autolyse im Sinne CONWAYS überflüssig.

Mit LEAF muß ich darauf hinweisen, daß für den Fall eines aktiven Transportes nicht von Na und/oder K, sondern statt dessen von Anionen diese Darstellung in gleicher Weise gültig bliebe.

Beweisen läßt sich die Theorie der passiven Wasserregulation vollständig, wenn es gelingt, die Rückverteilung der Ionen im Experiment ohne Variation des osmotischen Druckes der Inkubationsflüssigkeit zu beeinflussen und damit eine diffusionsbedingte Änderung des Wassergehaltes zu erzeugen. Da FOULKES für Azid eine isolierte Wirkung auf den K-Transport von Hefezellen nachweisen konnte, setzte ich meinem Medium C<sup>2</sup> NaN<sub>3</sub> zu. Es resultierte eine deutlich geringere Aufnahme von Na und eine etwas mäßigere Drosselung der K-Abgabe der Zelle. Hierdurch wird die Zunahme der Gesamtbase geringer. Die weniger ausgeprägte Zunahme der Osmolarität der intracellulären Flüssigkeit manifestierte sich in einer Schrumpfung der Schnitte im bluthypertonischen Medium C<sup>2</sup>, weil nunmehr die Zellen trotz geringer Zunahme der intracellulären Base im Endergebnis doch gegenüber einem Druck von 0,45 osM hypotonisch sind. Der mit Azid erreichte Effekt beruht darauf, daß die Änderung der Elektrolytrückverteilung eine Alteration des Wasseraustausches auf osmotischer Grundlage nach sich zieht. Der Beweis der passiven Wasserregulation als Folge aktiver Ionentransporte kann damit als erbracht angesehen werden.

Der Wirkungsmechanismus des Azid auf die Zelle des Warmblüters ist unbekannt. Man kann eine Einflußnahme auf den Stoffwechsel im Sinne einer Steigerung, an einen Membraneffekt durch Abdichtung und an Löslichkeitsänderungen im Zellinnern denken. Diese Fragen sind aber ungeklärt. Sie haben für diese Untersuchung keine Bedeutung.

Die Antwort auf die Frage nach der Höhe des intracellulären osmotischen Druckes kann jetzt — wenn auch deduktiv — mit begründeter Sicherheit gegeben werden: Zwischen normalen Zellen und ihrer extracellulären Flüssigkeit kann sich unter physiologischen Bedingungen kein osmotischer Druckgradient ausbilden. Der von PETERS (1933) aufgestellten Theorie eines einheitlichen osmotischen Druckes der Flüssigkeiten in den „verschiedenen Kammern“ des Organismus kann ich mich also anschließen und die ehedem herrschende Lehrmeinung erneut als richtig erweisen. Mit weniger beweiskräftigen Versuchsergebnissen hatte sich diese Ansicht zunehmend durchzusetzen begonnen (APPELBOOM u. Mitarb., MAFFLY u. LEAF, RIXON u. STEVENSON 1958, SWAN u. MILLER).

Nach den vorgelegten Ergebnissen muß die Interpretation der morphologischen Befunde einer Vacuolisierung und Einwässerung bei Störungen des Stoffwechsels (Lit. s. BÜCHNER, BECKER, BURCK 1962 b) dahingehend vervollständigt werden, daß sie als Folge einer vorher stattgehabten „Einsalzung“ verstanden werden müssen. Die Schwellung der Zelle *in vivo* oder *in vitro* ist die Zellantwort auf eine Mineralstörung, weil sich jede Vulneration des Stoffwechsels auf die empfindlichen,

die Ionengradienten erhaltenden Mechanismen auswirkt. Während *Enzyme auch von der Zelle losgelöst Leistungen vollbringen können, ist die ungestörte Lebensfähigkeit der Zelle an Ionengefälle gebunden.* Die Ionengradienten sind daher die Achillesferse der Zelle. Da die gestörte Verteilung der Ionen zu morphologischen Äquivalentbildern im Sinne der Vacuolisierungsversuche führt (BURCK 1962b) und damit praktisch wichtig ist, besteht die Berechtigung, der Isoionie (NETTER 1960) für das normale Ionenmuster die *Dysionie* für die Umstrukturierung der Ionengleichgewichte im Sinne einer „Hypernatro-Hypokaliocytose“ (BURCK 1960) gegenüberzustellen.

Aus dieser Auffassung ergeben sich praktische Konsequenzen. Der Zellschwellung bei der Inkubation liegt eine sich aus der konkomittierenden Stoffwechselhemmung ableitende Elektrolytverschiebung zugrunde. Solange kein Milieu zur Verfügung steht, das einen ungestörten Metabolismus inkubierter Schnitte gewährleistet und damit eine Dysionie verhindert, bleibt das bluthypertonische Medium C<sup>2</sup> für solche vorwiegend wohl morphologische Untersuchungen, bei denen in erster Linie Wasserverschiebungen vermieden werden müssen, weiterhin zu empfehlen. Außerdem ist hervorzuheben, daß im Medium C<sup>2</sup> keine zusätzliche „Einsalzung“ gegenüber dem Medium III statthat.

Diese Experimente brachten einen Fortschritt zur Frage des Wasserwechsel lebender und überlebender Gewebe, indem die Hypothesen eines aktiven Wassertransports durch Angaben über den Mechanismus des passiven, in Abhängigkeit aktiv gesteuerter Ionenverteilungsgleichgewichte stehenden Wasseraustausches ersetzt worden sind. In die Kausalkette Stoffwechselstörung und konsekutive Einwässerung muß als induzierender Mechanismus die Alteration der ionalen Gleichgewichte im Sinne einer Dysionie eingeschoben werden.

### Zusammenfassung

Untersuchungen über den intracellulären osmotischen Druck der Zellen hatten blutisotonische (0,3 osM) und bluthypertonische (0,45—0,6 osM) Werte ergeben. Hieraus waren Vorstellungen eines spezifischen aktiven Wassertransports abgeleitet worden. Leberschnitte wurden in einem blutisotonischen und einem bluthypertonischen Medium inkubiert und der Na-, K- und Wassergehalt in unterschiedlichen Zeitabständen gemessen und in Beziehung gesetzt. Durch Natrium-Azid ( $1,645 \cdot 10^{-4}$  Mol) wurden die Elektrolytkonzentrationen im Zellinnern stabilisiert. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß das Wasser in Abhängigkeit aktiv regulierter Ionengradienten rein osmotisch ausgetauscht wird. Für das Wasser muß ein Konzentrationsgefälle abgelehnt werden. Störungen des Energiestoffwechsels führen zu falschen Ionen-Verteilungen zwischen intra- und extracellulärem Raum. Die Folge dieser als *Dysionie* bezeichneten „Einsalzung“ ist eine celluläre Wasseraufnahme, für die histologische Äquivalentbilder bereits bekannt sind.

### Cell Swelling Resulting from the Passive Transfer of Water (Ion Balance Studies on Incubated Slices of Liver)

#### Summary

The intracellular osmotic pressure of cells had been studied and found to be 0.3 osM (isotonic with blood), and 0.45—0.6 osM (hypertonic with blood). From

these values a theory had been developed concerning the specific, active transport of water. Slices of liver were incubated in isotonic and hypertonic media; at various intervals the content of Na, K, and water were measured and correlated. By using sodium azide ( $1.645 \times 10^{-4}$  Mol), the concentrations of electrolytes within the cell were stabilized. From the results it is concluded, that the water was transferred depending upon actively regulated gradients of ions. The concept of concentration gradients of water had to be discarded. Disturbances in the metabolic supply of energy lead to a faulty distribution of ions between the intra- and extracellular spaces. The consequence of this uptake of salt, referred to as *dysionia*, is an absorption of water, known already by its histologic picture.

### Literatur

Die nachfolgend nicht aufgeführten Literaturstellen sind in dem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel enthalten:

BURCK, H. C.: Die Beziehungen zwischen intracellulärem osmotischen Druck und cellulärem Wasserwechsel. *Klin. Wschr.* **40**, 761 (1962).

BECKER, V.: Morphologisches Äquivalentbild des äußeren und inneren Sauerstoffmangels. *Medizinische Grundlagenforschung*. Hrsg. K. FR. BAUER, Bd. 2, S. 341—384. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

BERGER, M.: Studies on the distribution of potassium in the rat liver cell and the mechanism of potassium accumulation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **23**, 504 (1957).

BÜCHNER, F.: Pathologie der Zell- und Gewebsatmung. In *Handbuch allgemeine Pathologie*, Bd. IV/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

BURCK, H. C.: Veraschungsschnellmethode zur flammenphotometrischen Bestimmung von Gewebsnatrium und -kalium. *Klin. Wschr.* **39**, 751 (1961).

— Zur Frage des Wassertransports der Zelle. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **46**, 207 (1962).

DEUTSCH, W.: An improvement of Warburg's method for cutting tissue slices for respiratory experiments. *J. Physiol. (Lond.)* **87**, 56P (1936).

DULCE, H. J., u. TH. GÜNTHER: Altersabhängigkeit des cellulären Elektrolyt- und Wasser- gehaltens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **242**, 207 (1961).

DU RUISSAU, J. P., and K. MORI: Biochemical studies on experimental cardiopathy: Electrolytes in rat tissue. *Brit. J. exp. Path.* **40**, 250 (1959).

FLINK, E. A., A. B. HASTINGS and J. K. LOWRY: Changes in potassium and sodium concentration in liver slices accompanying incubation in vitro. *Amer. J. Physiol.* **163**, 598 (1950).

FOULKES, E. C.: Cation transport in yeast. *J. gen. Physiol.* **39**, 687 (1956).

GRISWOLD, R. L., and N. PACE: The intracellular distribution of metal ions in rat liver. *Exp. Cell Res.* **11**, 362 (1956).

ITOH, S., and I. L. SCHWARTZ: Studies of fluid exchange between rat liver slices and simple media. *J. gen. Physiol.* **40**, 171 (1956).

KREBS, H. A.: Body size and tissue respiration. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **4**, 249 (1950).

LEAF, A.: On the mechanism of fluid exchange in tissue in vitro. *Biochem. J.* **62**, 241 (1956).

MORI, K., and J. P. DU RUISSAU: Water and electrolyte changes in aging process with special reference to calcium and magnesium in cardiac muscle. *Canad. J. Biochem.* **38**, 919 (1960).

NETTER, H.: Wasser- und Elektrolythaushalt. In *Lehrbuch Physiologie des Menschen*. Hrsg. LANDOIS-ROSEMANN, 28. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg 1960.

RIECKER, G., W. ZACK, H. E. RENSCHLER u. I. RINGLEB: Untersuchungen zur Frage der osmotischen Konzentration von Leberzellen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **264**, 245 (1957).