

A KALCIUM ÉS A VÖRÖSVÉRSEJT-MEMBRÁN KÖLCSÖNHATÁSAINAK VIZSGÁLATA

GÁRDOS GYÖRGY, SZÁSZ ILMA és SARKADI BALÁZS

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

A kalcium a vörösvérsejt membránjának építőeleme, mely sokféle kölcsönhatás révén annak struktúráját és funkcióját meszemenően befolyásolja (Szász 1975). A sejtmembránban levő kalcium nagymértékben felelős a membrán barrier funkciójáért, s nem utolsósorban igen alacsony *passzív* Ca^{2+} -*permeabilitásáért*. Ugyanakkor a vörösvérsejt-membrán nagy kapacitású *aktív* Ca^{2+} -*pumpával* rendelkezik (SCHATZMANN 1973). E két sajátosság következménye a rendkívül alacsony intracelluláris Ca^{2+} -szint, valamint az, hogy a sejt belsejébe csak meglehetősen erőyes beavatkozások révén lehet kalciumot bejuttatni (FERREIRA, LEW 1976). Ez megnehezíti a sejtmembrán belső felszínével érintkező kalcium által kiváltott két jellegzetes folyamat: a Ca^{2+} -*dependens* K^{+} -*transzport* és a *sphaeroechinocytar* (*fogazott gömb*) alakváltozás sajátosságainak tanulmányozását.

Ezért törekvéseink elsősorban arra irányultak, hogy *intakt* sejten megbízható eljárásokat dolgozzunk ki a kalcium—vörösvérsejt-membrán kölcsönhatásának tanulmányozására.

Legfontosabb új eljárásaink a következők:

1. Ca^{2+} -influx vizsgálata ^{45}Ca -izotóp segítségével. A jelentős mennyiségű adszorbeált kalciumot jéghideg EGTA-val távolítjuk el és a sejteket jéghideg szacharóz-párnán történő gyors centrifugálással választjuk el a közegtől. A kalcium felvételt az intracelluláris radioaktivitás alapján mérjük (Szász és mtsai 1977).

2. Ca^{2+} -*pumpa* vizsgálata. Az intakt sejt belsejébe jelzett kalciumot juttatunk az A23187 ionofor vegyület segítségével, majd az ionofort albuminos mosások segítségével eltávolítjuk. A *pumpa* aktivitását $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -efflux segítségével vizsgáljuk (SARKADI és mtsai 1976).

3. *CaATPáz* *aktivitás*. A 2. pontban leírt módon kalciummal töltött sejtekben jóacetamid + Na-tetratiónát jelenlétében az anorganikus foszfát felszabadulását mérjük, ami ilyen körülmények között gyakorlatilag megegyezik az ATP-ről lehasított foszfát mennyiségével. Az impermeábilis lantán alkalmazása révén a Ca^{2+} -*pumpához* kapcsolt, ill. attól független *CaATPáz* elkülöníthető (SZÁSZ 1970a, SARKADI és mtsai 1977).

4. A formaldehides, ill. glutáraldehides fixálást követő fáziskontraszt-mikroszkópos, ill. scanning elektronmikroszkópos *morfológiai képet* saját szemikvantitatív módszerünkkel értékeljük (GÁRDOS és mtsai 1966).

Az intakt sejtek mellett az *izolált sejtmembránok* (Szász 1978) CaATPáz aktivitását (SCHATZMANN 1973), valamint az ún. addicionális kalciumkötést vizsgáljuk. Ez utóbbi vizsgálat során kombináltuk FORSTNER és MANERY (1971) „szoros Ca-kötést” vizsgáló és KWANT és SEEMAN (1969) „teljes addicionális Ca-kötést” vizsgáló módszerét és így egymás mellett meg tudjuk határozni a „szorosan” és „lazán” kötött (tehát a magas és alacsony Ca-affinitású kötőhelyekkel reagáló) kalcium frakciókat (Szász és mtsai 1977). Az *izolált membránok lipidkivonataiban* NAYLER (1966) eljárását módosítva határozzuk meg a membránlipidekhez kötött kalcium mennyiségét (Szász és mtsai 1977).

A K^+ és Na^+ transzport tanulmányozására jól bevált módszerek vannak; a Ca^{2+} -dependens K^+ -transzport tanulmányozásakor ezeket alkalmaztuk (GÁRDOS és mtsai 1975).

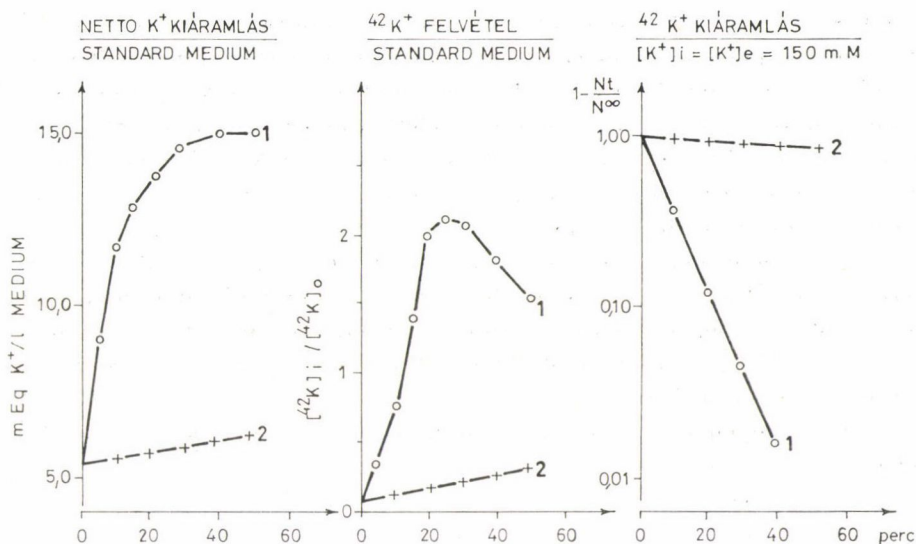
I. Ca^{2+} -dependens K^+ -transzport

A Ca^{2+} -dependens K^+ -transzport sajátosságait háromféle kísérleti felállításban vizsgáltuk. Ezeket 1. ábránk mutatja be ATP + 2,3-DPG depletált sejteken, amelyekben a gyors K^+ -transzport kalciummal jellegzetes módon kiváltható, EGTA-val pedig megakadályozható. A három kísérleti felállítás a következő:

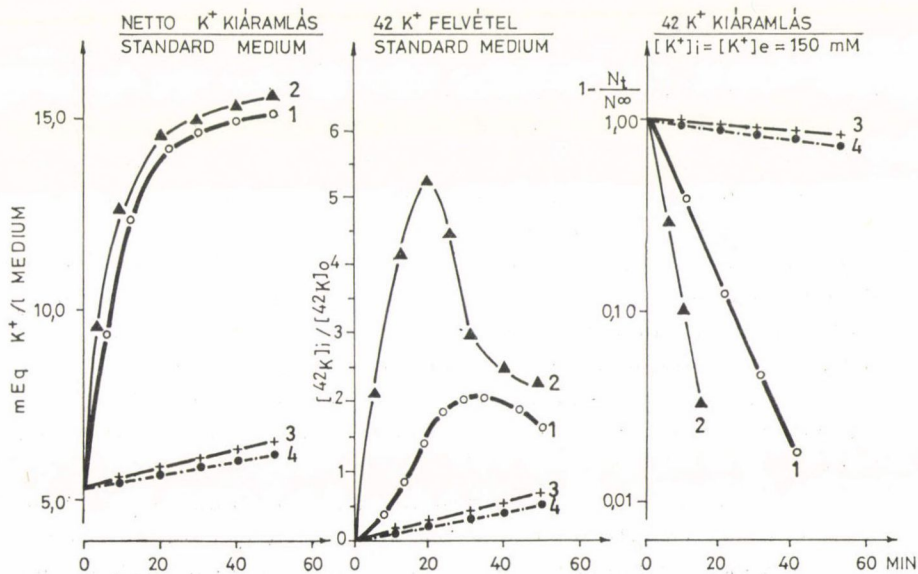
1. Nettó K^+ kiáramlás NaCl közegben.
2. $^{42}K^+$ -felvétel (beáramlás) NaCl közegben.
3. $^{42}K^+$ -efflux ^{42}K -mal töltött sejtekből KCl közegben, kicserélődési (exchange) feltételek mellett.

A Ca^{2+} -dependens K^+ -transzport létrejötte esetében az 1. felállításban gyors K^+ kiáramlás, a 2. felállításban $^{42}K^+$ felvétel, majd kiegyenlítődés, a 3. felállításban gyors $^{42}K^+$ kiáramlás észlelhető. Ez utóbbi „kicserélődési feltételek” mellett a K^+ -transzport sebességét kizárólag a *membrán* K^+ -permeabilitása szabja meg, ami ily módon a nyert adatokból kiszámítható.

Különböző drogoknak a transzportfolyamatokra kifejtett hatása ebben a három kísérleti felállításban jól elemezhető. Mint 2. ábránk mutatja, 0,5 mM propranolol depletált sejtek nettó K^+ kiáramlását tovább fokozni már nem képes, ugyanakkor „kicserélődési feltételek” mellett kimutatható, hogy a membrán K^+ -permeabilitását tovább fokozza. Gyorsítja a $^{42}K^+$ beáramlást is a 2. kísérleti felállításban. E jelenség magyarázatát akkor kaptuk meg, amikor Cl^- -transzport gátlószerekkel (pl. dipiridamollal) végeztünk kísérleteket, továbbá akkor, amikor a medium Cl^- ionjait sokkal kevésbé permeabilis anionokra (piruvátra, laktátra) cseréltük ki (GÁRDOS és mtsai 1975). A K^+ vándorlását ui. Cl^- vándorlás kíséri. Kísérleteinkben az igen nagy mértékben



1. ábra. Foszfátészter-mentes emberi vörösvérsejtek Ca^{2+} -dependens K^+ -transzportja ($t: 37^\circ\text{C}$). Standard medium: 155 mM NaCl, 5 mM KCl. 1. 2,0 mM CaCl_2 ; 2. 1,0 mM EGTA



2. ábra. Propranolol hatása foszfátészter-mentes emberi vörösvérsejtek Ca^{2+} -dependens K^+ transzportjára ($t: 37^\circ\text{C}$). Standard médium: lásd 1. ábra. 1. 2,0 mM CaCl_2 ; 2. 2,0 mM CaCl_2 , 0,5 mM propranolol; 3. 1,0 mM EGTA; 4. 1,0 mM EGTA, 0,5 mM propranolol

megnövekedett nettó K^+ kiáramlás mellett a lassúbb Cl^- transzport sebességkorlátozó szerepet tölt be, mely a membrán hiperpolarizációjához (belső negativitásának növekedéséhez) vezet. Ez magyarázza a magas K^+ -permeabilitású membránon keresztül a $^{42}K^+$ gyors felvételét. Amikor propranolollal a membrán K^+ -permeabilitását tovább növeljük, ezzel növeljük a Cl^- -permeabilitáshoz viszonyított különbséget is. Így a hiperpolarizáció mértéke is növekszik és ez megkönnyíti a $^{42}K^+$ belépését.

A Ca^{2+} -dependens gyors K^+ -transzportot SH-reagensek (PCMB, etakrinsav, mersalil) részlegesen, míg oligomicin, klórbutanol, heptanol, p-klór-fenol, timol igen nagy mértékben gátolják. Az impermeabilis TEA kation részlegesen gátolja a K^+ -transzportot abból az irányból, ahol a TEA-t alkalmazzuk (GÁRDOS és mtsai 1975).

A Ca^{2+} -dependens gyors K^+ -transzportfolyamat kialakulásának előfeltételei a következők:

1. Ca^{2+} -felvétel.
2. Kalcium-membrán kölcsönhatás.
3. K^+ -ra permeabilis struktúra kialakulása.
4. A K^+ -transzport akadályozatlansága.

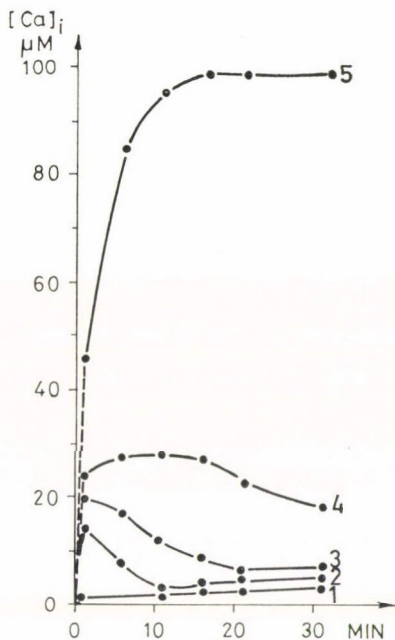
ad 1. A Ca^{2+} felvétele obligát előfeltétel. Ennek induktorai:

- a) Az ATP depléciója, amelynek során a jelenséget először észleltük (GÁRDOS 1956, GÁRDOS és STRAUB 1957).
- b) Különböző Ca^{2+} -permeabilitást fokozó vegyületek: propranolol, pronetalol (MANNINEN 1970), tetrakain (SZÁSZ és GÁRDOS 1974).
- c) Ca^{2+} -ionofor vegyületek (A23187, X537A) jelenléte.

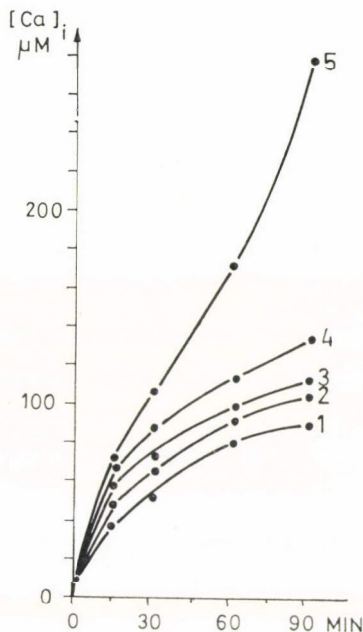
A propranolol csoport Ca^{2+} -influx fokozó hatását saját vizsgálataink igazolták (3., 4. ábra). A propranolol hatásmechanizmusának egyes részleteivel később foglalkozunk.

ad 2. A felvett Ca^{2+} a membrán belső felszínével reagálva váltja ki a szelektív K^+ -permeabilitás fokozódást (BLUM és HOFFMAN 1972). E kölcsönhatás laza természetére (a kötőhely relatíve alacsonyabb Ca^{2+} -affinitására) utalnak azon vizsgálataink, amelyek kimutatják, hogy az impermeabilis, kívülről alkalmazott EDTA, ill. EGTA a magas Ca^{2+} -permeabilitást megszünteti (GÁRDOS 1958, SZÁSZ és mtsai 1970, GÁRDOS és mtsai 1977). A kalcium membránon belüli átrendeződése tehát már elégséges a hatás megszűnéséhez, kivéve ha a friss sejt mM nagyságrendű, ill. az energetikailag depletált sejt 100 μM fölötti intracelluláris Ca^{2+} szinttel rendelkezik.

A membrán laza típusú kölcsönhatása kalciummal a pH emelésével egyre csökken: pH 9-nél az összes addicionális kalcium-kötésnek alig 10%-át képezi, ilyenkor tehát a szoros kölcsönhatások válnak dominánssá (5. ábra). A szoros kölcsönhatásokért felelős akceptorhelyek több mint 90%-a fehérje természetű (SATO és FUJII 1974). Intakt sejten

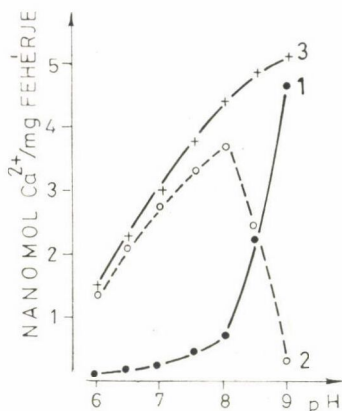


3. ábra. Propranolol hatása friss, Ca^{2+} -pumpa működéssel rendelkező emberi vörösvérsejtek Ca^{2+} -felvételére (t: 37 °C). $[\text{Ca}^{2+}]_e$: 2,5 mM. Propranolol koncentrációk: 1. 0 mM; 2. 0,5 mM; 3. 1,0 mM; 4. 2,5 mM; 5. 5,0 mM

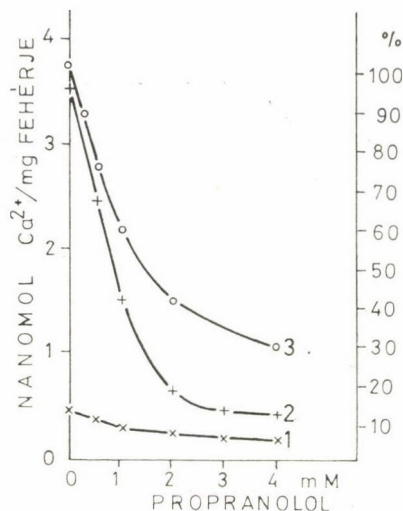


4. ábra. Propranolol hatása foszfátésztermentes emberi vörösvérsejtek Ca^{2+} -felvételére (t: 37 °C). $[\text{Ca}^{2+}]_e$: 2,5 mM. Propranolol koncentrációkat lásd 3. ábrán

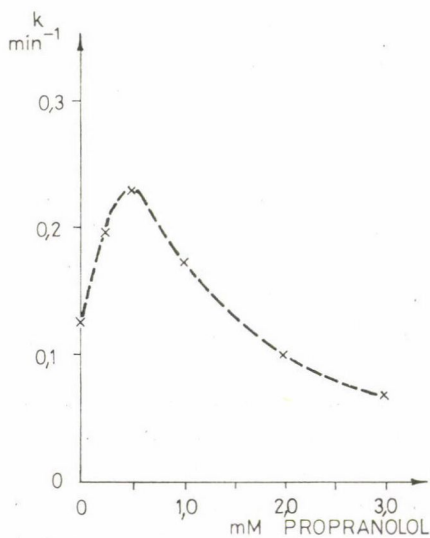
pH 9-en vizsgálva a K^+ -permeabilitásért felelős kalcium-kötés természetét, azt ilyenkor is lazának találtuk. A kötőhely természete tehát közvetlenül nem vizsgálható, közvetett úton viszont valószínűsíthető, elsősorban a propranolol hatásmechanizmusának vizsgálata, ill. az SH-reagensek gátló hatása (GÁRDOS és mtsai 1975) révén. A propranolol erősen lipidoldékony vegyület (MANNINEN 1970), ezért elsősorban a membrán lipid régiókban dúsul, koncentrációja ott magasabb értéket ér el, mint a fehérje régiókban. Saját vizsgálataink igazolták, hogy a propranolol erőlyes kalcium-leválasztó vegyület (6. ábra). Alacsony koncentrációban alkalmazva — amikor tehát elsősorban a membrán lipid régiókban választ le kalciumot — a K^+ -permeabilitást fokozza. Csak magasabb koncentrációban válik gátló hatásúvá, amikor már a fehérje régiókban is eléri azt a koncentrációt, ami a kalciummal való kölcsönhatásokat megzavarja (7. ábra). Ezeket az eredményeket összevetve az SH-reagensek K^+ -transzportot gátló hatásával, arra következtethetünk, hogy a K^+ -ra permeabilis struktúra kialakulásáért felelős kalcium-kötőhelyek inkább a hidrofíli (fehérje) régiókra lokalizálhatók vagy legalábbis a következő konformáció változásban fehérjék is szerepet játszanak.



5. ábra. Emberi vörösvérsejt-membrán addicionális Ca^{2+} kötése különböző pH értékeken (t : 20°C ; $[\text{Ca}^{2+}]$: $40\ \mu\text{M}$; μ : 0,025). 1. Membránhoz szorosan kötődő Ca^{2+} ; 2. membránhoz lazán kötődő Ca^{2+} ; 3. membránhoz addicionálisan kötődő összes Ca^{2+}



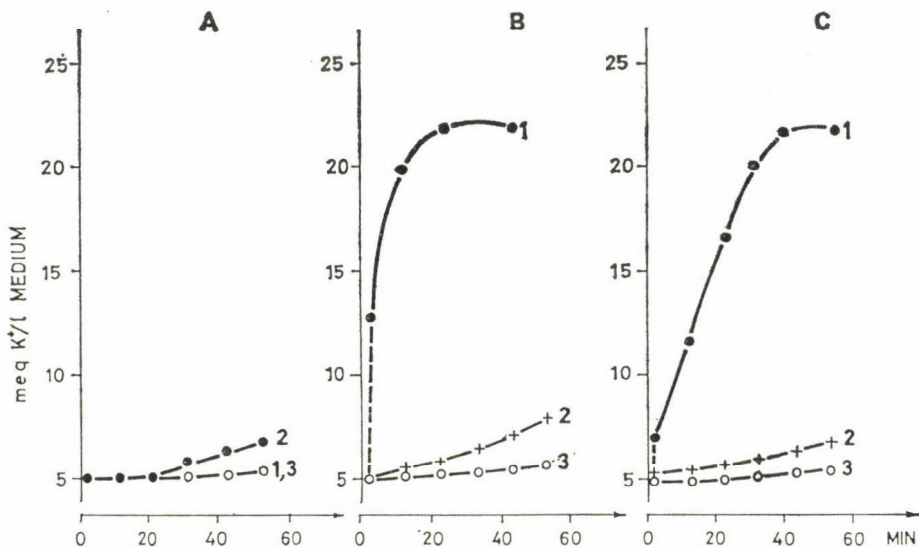
6. ábra. Propranolol Ca^{2+} -leválasztó hatása emberi vörösvérsejt membránról, ill. membránlipidekről (t : 20°C). 1. Membránhoz szorosan kötődő Ca^{2+} ; 2. membránhoz lazán kötődő Ca^{2+} 3. lipidhez kötődő Ca^{2+} (a propranololmentes kontroll %-ában)



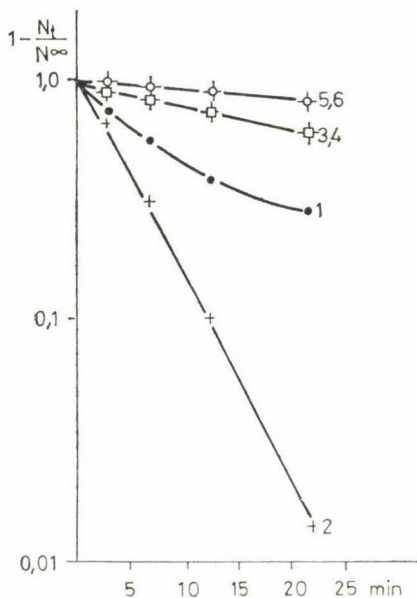
7. ábra. Különböző koncentrációjú propranolol hatása Ca^{2+} -mal töltött emberi vörösvérsejtek K^+ -kiáramlásának sebességi állandójára (t : 37°C ; $[\text{Ca}^{2+}]_i$: $2,5\ \text{mM}$). Médium: $120\ \text{mM KCl}$, $30\ \text{mM Trisz-HCl}$ (pH 7,4)

- ad 3. Találtunk egy vegyületcsoportot — klórbutanol, heptanol, p-klórfehol, timol — (SZÁSZ és mtsai 1977), amely az oligomicinhez (RIORDAN és PASSOW 1973) hasonlóan a Ca^{2+} -felvétel és a Ca-membrán kölcsönhatás lényeges befolyásolása nélkül erőteljesen gátolja a K^{+} -transzportot (l. 9. ábra). Friss, a Ca^{2+} -pumpa bénulása miatt mintegy $25 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -mal dúsult, továbbá propranolol + Ca^{2+} -mal kezelt sejtekben ($[\text{Ca}]_i \sim 25 \mu\text{M}$), valamint depletált sejtekben ($[\text{Ca}]_i \sim 60\text{--}80 \mu\text{M}$) az impermeabilis lantán ionok is gátolják a K^{+} kiáramlását (8. ábra). A lantán ionok gátló hatása csak az A23187 ionofor segítségével elérhető igen magas (mM nagyságrendű) intracelluláris kalciumszint mellett tűnik el (9. ábra). Ionoforos kezeléssel kalciummal töltött sejteken a Ca^{2+} -influx-ra kifejtett hatástól elkülönítve tisztán kimutatható a különböző koncentrációban alkalmazott propranololnak a K^{+} -permeabilitásra kifejtett közvetlen hatása (9. ábra). A fentiekben felsorolt membránaktív anyagok, valamint a lantán ionok tehát akadályozzák a K^{+} -ra permeabilis membránstruktúra kialakulását, míg az optimális koncentrációjú propranolol elősegíti azt.
- ad 4. A K^{+} -transzportot — excitabilis szövetekhez hasonlóan — a TEA gátolja, amennyiben a membránnak azon az oldalán alkalmazzuk, ahonnan a K^{+} -nak át kellene áramlania. A Cl^{-} -transzport gátlása és a membrán hiperpolarizációja ugyancsak a K^{+} -efflux ellen hat (GÁRDOS és mtsai 1975).

A Ca^{2+} -dependens K^{+} -transzport magyarázatára kezdetben a ^{42}K -influx vizsgálatok alapján exchange mechanizmust tételtek fel (MANNINEN 1970). A membránpotenciál számított és mért értékei alapján azonban a jelenség pórusmodell segítségével is magyarázható (GÁRDOS és mtsai 1975, GLYNN és WARNER 1972, KREGENOW és HOFFMAN 1972, GÁRDOS és mtsai 1976). Annak a feltevésnek a hitelét, hogy a Ca^{2+} -dependens K^{+} -transzportot a kalcium jelenléte által módosított $\text{K}^{+}\text{-Na}^{+}$ -pumpa bonyolítja le (HOFFMAN és KNAUF 1973), nemcsak az a tény gyengíti, hogy a jelenség ouabain szenzitivitását nem sikerült reprodukálni, hanem az is, hogy különböző állatfajoknál a $\text{K}^{+}\text{-Na}^{+}$ -pumpa, ill. a Ca^{2+} -dependens K^{+} -transzport megléte, ill. hiánya nincs összhangban (LEW és BEAUGÉ 1978). Saját kísérleteinkben pórusmodellel kinetikailag az észlelt jelenségeket jól tudjuk értelmezni. Természetesen sokkal bonyolultabb elképzelések is napvilágot láttak (SIMONS 1976). Mindenesetre azt hangsúlyoznunk kell, hogy a passzív Ca^{2+} -transzport és Ca^{2+} -dependens K^{+} -transzport utak funkcionálisan különböznek (l. táblázat). Sematikus modellen ezt a következőképpen érzékelhetjük: A passzív Ca^{2+} -influxot a lipidekről Ca^{2+} -ot leválasztó propranolol fokozza, a Ca^{2+} -nál affinisabban kötődő lantán részlegesen gátolja. A Ca^{2+} -utak megnyílásához tehát egy döntő tényező a nyilvánvaló: a barrier- Ca^{2+} eltávolítása. A K^{+} -csatorna kialakulásához viszont szükséges a Ca^{2+} -nak a membrán belső felszínével történő kölcsönhatása és az



8. ábra. LaCl_3 hatása emberi vörösvérsejtek K^+ -kiáramlására. Médium: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 5 mM Trisz-HCl (pH 7,4). t: 37 °C. A. Friss sejtek; B. friss sejtek + 1,0 mM propranolol; C. foszfátészter-mentes sejtek. 1. Kontroll; 2. 0,2 mM LaCl_3 ; 3. 5 mM EGTA



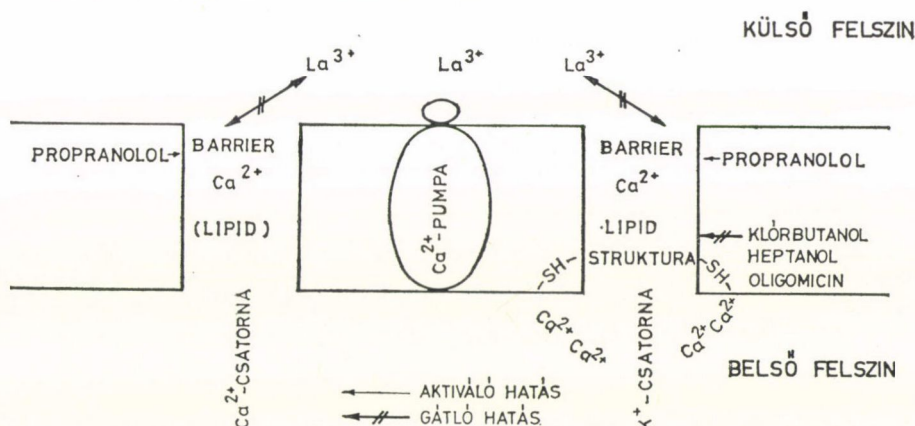
9. ábra. Különböző drogok hatása Ca^{2+} -mal töltött emberi vörösvérsejtek $^{42}\text{K}^+$ -kiáramlására kicserélődési (exchange) feltételek mellett (t: 37 °C $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 3,2 mM). Médium: 120 mM KCl, 30 mM Trisz-HCl (pH 7,4). 1. Kontroll; 1,0 mM EGTA; 0,2 mM LaCl_3 ; 2. 0,5 mM propranolol; 3. 5,0 mM propranolol; 4. 10 µg/ml oligomicin; 5. 3,0 mM klórbutanol; 6. 3,0 mM heptanol

1. táblázat

Passzív Ca^{2+} -, ill. K^{+} -transzport utak eltérő sajátosságai

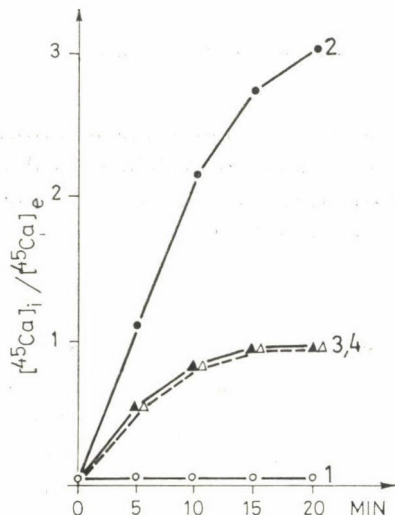
Hatóanyagok	Ca^{2+} -transzport	K^{+} -transzport
Klórbutanol csoport és oligomicin	nem gátol	gátol
Propranolol [>2 mM]	aktivál	gátol
SH-blokkolók (etakrinsav, mersalil, NEM)	nem gátol	gátol

SH-fehérjék intaktsága, amelyek a konformációváltozást közvetítik. A konformációváltozást a barriertermészetű kalcium leválasztása is elősegíti, lantánra való kicserélése hátráltatja, míg az erősen lipidoldékony, membránba épülő vegyületek megakadályozzák (10. ábra).

10. ábra. Vörösvérsejt membrán K^{+} és Ca^{2+} csatornáinak hipotetikus sémájaII. Aktív Ca^{2+} -transzport (Ca^{2+} -pumpa)

Az előzőekben röviden már említettük az intakt vörösvérsejtek Ca^{2+} -mal való töltésére szolgáló ionoforos eljárásunkat. A módszer alapja az a jelenség, hogy az A23187 jelű Ca-ionofor antibiotikum hatására Ca^{2+} -ionok nagy sebességgel képesek a vörösvérsejtekbe bejutni. Mivel a sejtekbe jutó Ca^{2+} gyors K^{+} -mozgást indukál, ha a vörösvérsejteket NaCl médiumban inkubáljuk az ionofor anyaggal, a létrejövő membránpotenciál változás a pozitív töltésű Ca^{2+} -ionok mozgását meggyorsítja. KCl médiumban vagy a K^{+} -transzportot gátló klórbutanol jelenlétében ez a hatás nem jelentkezik, a Ca^{2+} bejutása jóval lassúbb és Ca^{2+} -akkumuláció nem történik (11. ábra). Ennek megfelelően a vörösvérsejteket NaCl médiumban A23187-tel kezelve, egy-két perc alatt a kívánt mennyiségű kalciumot vihetjük be a sejtekbe.

Ahhoz, hogy kalciumtartalmú ép sejteket nyerhessünk, az ionofor anyagot a kezelés után teljes mértékben el kell távolítanunk. Ezt a célt a sejtek nagy térfogatú, hideg albumint tartalmazó fiziológias oldattal történő mosásával tudtuk elérni. Az albumin az ionofor anyagot erősen megköti és így azt a sejtmembránból eliminálja. Az így preparált sejtek biokémiai vizsgálata

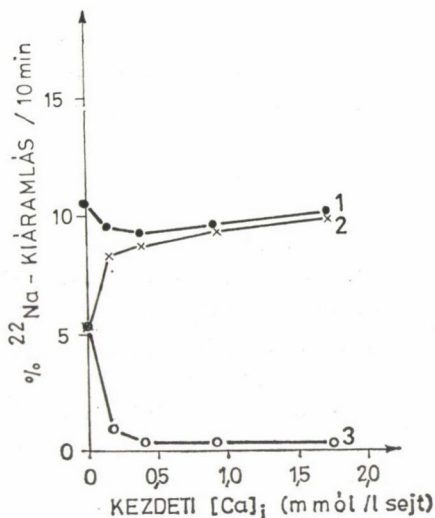


11. ábra. A23187 hatása emberi vörösvérsejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételére (t: 37 °C; pH: 7,4 [Ca^{2+}]_e: 0,5 mM). 1. 160 mM NaCl; 2. 160 mM NaCl, 5 μM A23187; 3. 160 mM NaCl, 5 μM A23187, 3 mM klórbutanol; 4. 160 mM KCl, 5 μM A23187

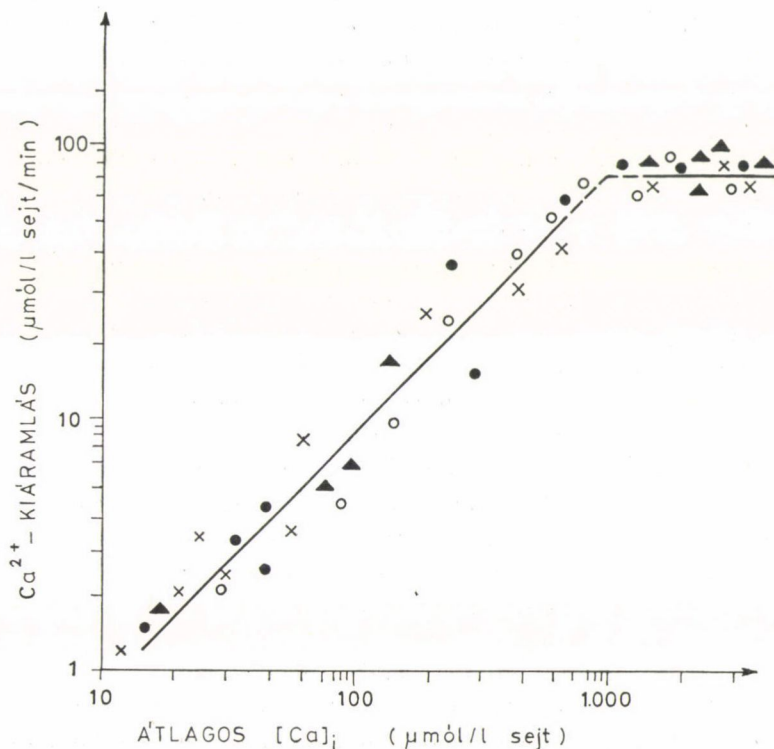
szerint a kezelés a vörösvérsejtek K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , ATP és 2,3-DPG tartalmát nem befolyásolta (Sarkadi és mtsai 1976).

A Ca^{2+} -ot tartalmazó vörösvérsejteket a transzport-vizsgálatok során magas K^+ -koncentrációjú médiumban inkubáltuk, hogy a kialakuló nagyfokú K^+ -permeabilitás ne hozzon létre K^+ -vesztést és a sejtek ne zsugorodjanak. Míg az intracelluláris [Ca^{2+}] növelésével a passzív (ouabain-inszenzitív) Na^+ -transzport sebessége alig változik, az aktív Na^+ -pumpát (ouabain-szenzitív Na^+ -transzport) 1 mM belső [Ca^{2+}] már teljes mértékben gátolja (12. ábra). Ez az eredményünk jól egyezik azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek az izolált membrán Na^+ - K^+ -ATPáznak Ca^{2+} -ionokkal való gátolhatóságára vonatkoznak (DUNHAM és GLYNN 1961, VINCENZI 1971).

Az ép vörösvérsejtek Ca^{2+} -transzportját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a bejuttatott Ca^{2+} nagy sebességgel áramlik kifelé, és az efflux sebessége a Ca^{2+} -koncentráció növelésével 1 mM belső [Ca^{2+}]-ig egyenletesen növekszik (13. ábra). Magasabb Ca^{2+} -koncentrációknál a kiáramlás sebessége állandósul, a transzport „telítődik”. A Ca^{2+} -kiáramlás átlagos maximális sebes-



12. ábra. Az intracelluláris kalcium koncentráció változtatásának hatása intakt emberi vörösvérsejtek $^{22}Na^+$ -kiáramlására (t: 37 °C). Médium: 120 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 15 mM Trisz-HCl (pH 7,4). 1. Teljes $^{22}Na^+$ -kiáramlás; 2. ouabain-inszenzitív $^{22}Na^+$ -kiáramlás (100 μ M ouabain jelenlétében); 3. ouabain-szenzitív $^{22}Na^+$ -kiáramlás



13. ábra. Az intracelluláris kalcium koncentráció változtatásának hatása intakt emberi vörösvérsejtek Ca^{2+} -kiáramlásának sebességére (t: 37 °C). Médium: lásd 12. ábránál. Négy kísérlet adatai

sége kísérleteink szerint mintegy $85 \mu\text{mol/l}$ sejt/perc. Ugyanakkor a sejtekbe történő Ca^{2+} -beáramlás sebessége rendkívül alacsony marad. 2 mM külső $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett — $2,5\text{—}3 \text{ mM}$ intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ alatt — a Ca^{2+} -influx sebessége kisebb, mint $1 \mu\text{mol/l}$ sejt/perc. 3 mM intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ fölött a sejtmembrán károsodásának jeleként a passzív Ca^{2+} -influx sebessége jelentősen megnövekszik.

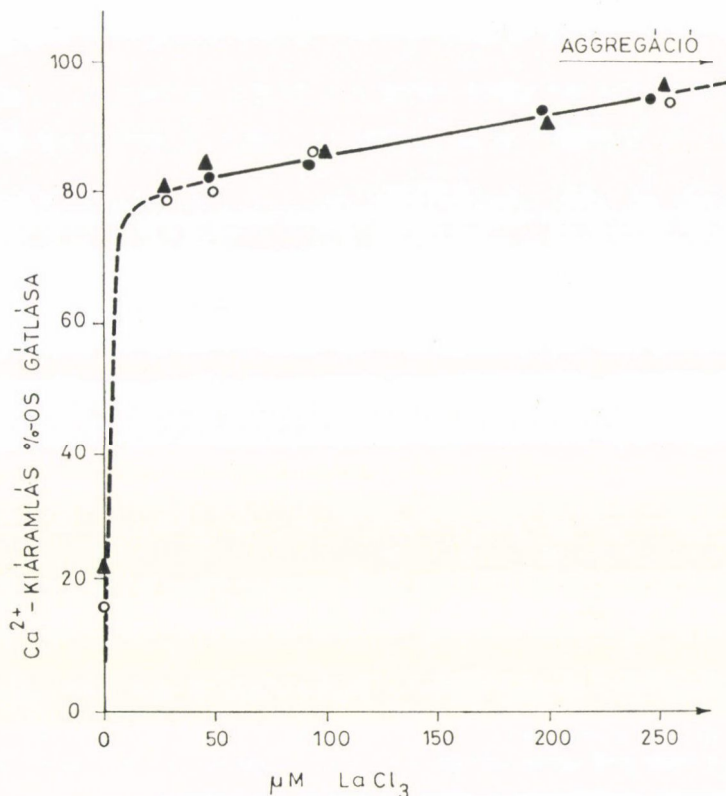
Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy a vörösvérsejtek aktív Ca^{2+} -transzportjának molekuláris alapja a sejtmembrán Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPázának működése (SCHATZMANN 1966, 1975). Ugyanakkor különböző szerzők különböző módokon preparált membránoknál jelentősen eltérő Ca^{2+} -koncentrációkat jelöltek meg az enzim maximális aktiváló hatására (WOLF 1970, 1972, SCHATZMANN és ROSSI 1971, SCHATZMANN 1973, QUIST és ROUFOGALIS 1975). Az eredmények két nagy csoportba sorolhatók: míg a „high Ca-affinity” preparátumokon $5\text{—}25 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -nál, addig az ún. „low Ca-affinity” preparátumokban $300\text{—}500 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -nál találták meg a maximális aktiváló hatást. Minthogy kísérleteink szerint ép sejtekben ez a kalciumkoncentráció 1 mM körüli érték, és a bejuttatott kalciumnak mintegy $30\text{—}50\%$ -a tekinthető ionizáltnak (SCHATZMANN 1973, FERREIRA és LEW 1976), eredményeink arra utalnak, hogy az aktív Ca^{2+} -transzportban az alacsonyabb Ca-affinitású (magasabb $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett aktiválódó) ATPáz frakció játszik szerepet.

Az aktív Ca^{2+} -transzport ATP-igényét vizsgálva azt találtuk, hogy mind az aktív Ca^{2+} -efflux, mind a passzív Ca^{2+} -influx sebessége széles tartományban (1500 és $100 \mu\text{M}$ ATP/l sejt között) független a sejtek ATP koncentrációjától. Amennyiben azonban a sejtek ATP tartalmát előzetes depletálással $100 \mu\text{mol/l}$ sejt alá csökkentettük, az aktív kiáramlás erősen lelassult, míg a Ca^{2+} -beáramlás meggyorsult. Ezért a pumpa aktivitásának ATP-függése és észlelt alacsony ATP-igénye jó összhangban van az izolált membránokon kapott eredményekkel, amelyek szerint a Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPáz ATP-re vonatkozó Michaelis-konstansa mintegy $40 \mu\text{M}$ (SCHATZMANN 1973).

Az inkubáló médium kationösszetétele a vörösvérsejtek aktív Ca^{2+} -transzportját alig befolyásolja. Ca^{2+} és más divalens kationok, így Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} hozzáadása (2 mM) vagy teljes elvonása (EGTA, EDTA adásával) a folyamatra hatástalan, azaz a Ca^{2+} -pumpa a Ca^{2+} -gradienstől függetlenül maximális sebességgel működik. A médium K^+ és Na^+ ionjainak egymásra vagy kolinra való kicserélése ugyancsak nem befolyásolja a Ca^{2+} -kiáramlást, bizonyítva, hogy az nem kapcsolódik sem két-, sem egyértékű kationok ellentranszportjához.

Kísérleteink során számos drog hatását vizsgáltuk meg ép vörösvérsejtek aktív Ca^{2+} -transzportjára. Az aktív K^+ - Na^+ -transzportot gátló ouabain és oligomicin a Ca^{2+} -mozgást nem befolyásolja, ugyanígy hatástalan a folyamatra számos membrán-aktív drog is (DNP, klórbutanol, dipiridamol, klórpromazin stb.). Magas koncentrációjú propranolol ($2\text{—}5 \text{ mM}$), néhány SH-reagens

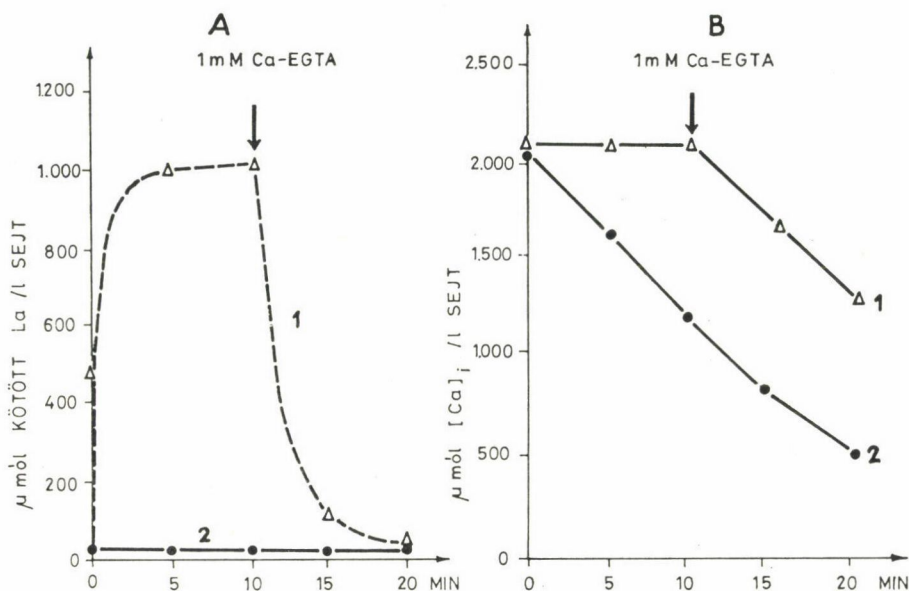
(PCMB, NEM, mersalil, etakrinsav 0,2—0,5 mM koncentrációban) és a mitochondriális Ca^{2+} -transzportot gátló ruténium vörös (0,2—1 mM) a vörösvérsejtek Ca^{2+} -transzportját részlegesen gátolja. A Ca^{2+} -pumpa igen hatásos gátlószereinek találtuk a lantán iont és a lantanidákat. Az inkubáló médiumhoz adott 50—250 μM végkoncentrációjú LaCl_3 a Ca^{2+} -effluxot 85—95%-ban gátolja (14. ábra).



14. ábra. LaCl_3 Ca^{2+} -kiáramlást gátló hatása kalciummal töltött emberi vörösvérsejtekben (t: 37 °C). Médium: lásd 12. ábránál. Három kísérlet adatai; kezdeti $[\text{Ca}]$: 1,5—2,5 mM

A vizsgált koncentrációkban a lantán hatástalan a vörösvérsejtek K^+ - Na^+ -pumpájára (SARKADI és mtsai 1976), a magas — mM nagyságrendű — intracelluláris kalciumszint által okozott gyors K^+ -mozgásra (SZÁSZ és mtsai 1977) és nem okozza a sejtek aggregációját vagy lízisét. ^{140}La izotóp segítségével megvizsgáltuk, hogy a lantán ionok behatolnak-e a vörösvérsejtekbe, vagy csak azok felszínéhez kötődve hatnak. Amint a 15. ábra mutatja, a médiumhoz adott jelzett lantán a sejtekhez rendkívül gyorsan kapcsolódik, a médiumhoz adott impermeabilis CaEGTA -val azonban ugyanilyen gyorsan

és teljes egészében leválasztható. A lantán-kötődés és leválasztás folyamata a párhuzamosan vizsgált Ca^{2+} -pumpa gátlásában, ill. a gátlás alól való felszabadulásában is jól tükröződik. Mivel az EGTA a vörösvérsejtekbe nem jut be, a folyamat alacsony hőfűggése és teljes reverzibilitása egyértelműen arra utal, hogy a La^{3+} ionok a sejtmembrán külső oldalán kötődnek az aktív



15. ábra. Emberi vörösvérsejtek lantán kötése (A); LaCl_3 gátló hatása a Ca^{2+} -kiáramlásra (B). t: 37 °C. Médium: lásd 12. ábránál. 1. 0,2 mM LaCl_3^* ; 2. 0,2 mM LaCl_3^* , 1 mM Ca-EGTA. *Az A kísérletben 5 μCi $^{140}\text{LaCl}_3$ -dal kiegészítve

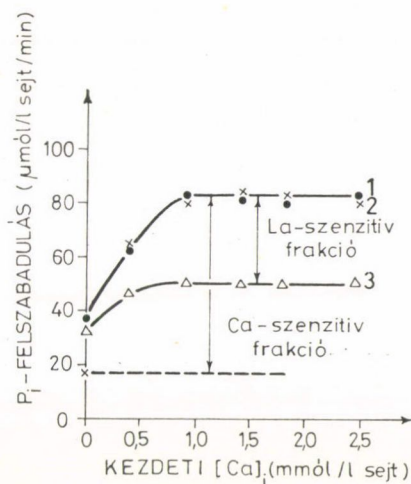
Ca^{2+} -pumpa molekuláris komponenseihez és azokat mintegy „rögzítve” megállítják az újabb Ca^{2+} -szállító lépéseket.

A következőkben az ép vörösvérsejtek Ca^{2+} -pumpájának energiaigényét, ill. a Ca^{2+} -mozgás és az ATP-felhasználás sztöchiometriáját vizsgáltuk. Az ATP szint csökkenése a vörösvérsejt aktív adenilátkináz aktivitása miatt nem jelzi számszerűen az ATPáz aktivitás révén bekövetkező ATP-bomlást. Ezért az előzőekben már ismertetett körülmények között, saját módszerünkkel az anorganikus foszfát felszabadulása alapján határoztuk meg az ATPáz aktivitást, ill. annak lantán-szenzitív frakcióját.

Az energiafogyasztás vizsgálatához olyan vörösvérsejteket használtunk, amelyekben a $[\text{Ca}]_i$ nem volt magasabb 3 mM-nál és ATP tartalmuk nem csökkent a kísérlet alatt sem 100 $\mu\text{mol/l}$ sejt alá.

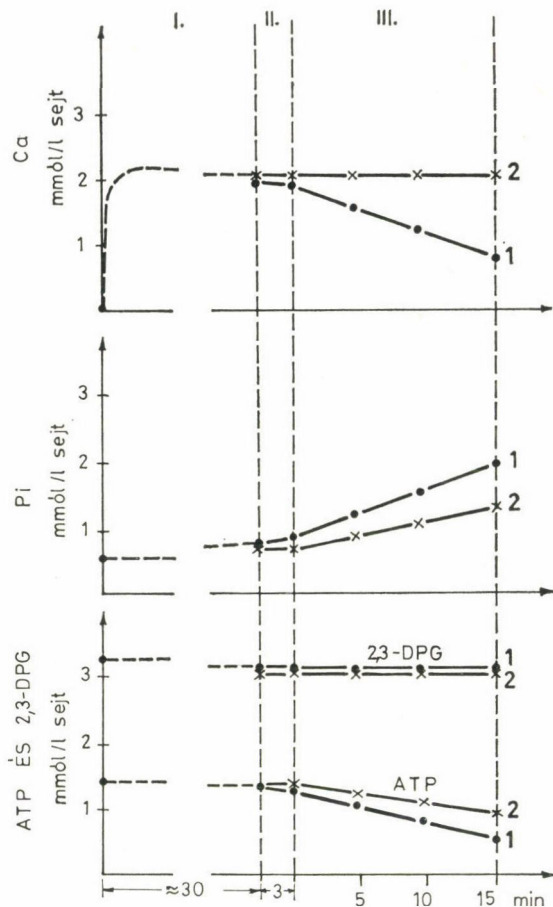
Kezeletlen, ill. Ca^{2+} -mentes közegben preparált sejteknél az ATP-hasítás (P_i -termelés) viszonylag alacsony szintű ($37,5 \pm 8,2$ $\mu\text{mol/l}$ sejt/perc) és

ouabain hatására — a K^+ - Na^+ -pumpára eső ATP-hasítás megszűnésével — mintegy 40%-kal csökken ($22,2 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$ sejt/percre; $n = 5$ mindkét esetben, $\pm\text{SD}$ értékek). A sejt $[Ca]$ növelésekor az össz-ATP hasítás mintegy kétszeresére nő, ouabain-szenzitivitása — a Na^+ - K^+ -pumpa leállításának megfelelően — megszűnik és jelentős frakciója lantán-szenzitívvé válik. A Ca^{2+} -transzporthoz hasonlóan a Ca^{2+} -aktivált ATP-bontás sebessége is mintegy $1 \text{ mM } [Ca]_i$ -nál telítődik és e fölött a lantán-szenzitív frakció is közel állandóvá válik (16. ábra).



16. ábra. Az intracelluláris kalcium koncentráció változtatásának hatása a P_i -felszabadulásra $2,0 \text{ mM}$ monojódacetamid + $2,0 \text{ mM}$ $Na_2S_4O_6$ -tal kezelt emberi vörösvérsejteknel 37°C -on. Médium: lásd 12. ábránál. 1. Kontroll; 2. $100 \mu\text{M}$ ouabain; 3. $250 \mu\text{M}$ $LaCl_3$

A 17. ábra a Ca -ATP sztöchiometria meghatározására végzett egyik jellemző kísérlet eredményeit mutatja. A sejtek Ca , P_i , ATP és 2,3-DPG tartalmát párhuzamosan mérve megállapítható, hogy a Ca -töltés szakaszában (I: a hőmérséklet $0-4^\circ\text{C}$ között) az anyagsere-paraméterek alig változnak. A II-vel jelölt időszak (3 perc 25°C -on) az anyagseregátló drogok, a jódacetamid és a Na -tetratonát teljes hatásának kifejlődéséhez szükséges előinkubálás. Ezt követi a tényleges vizsgálati periódus (III: 37°C). A Ca^{2+} -efflux és az anorganikus foszfor felszabadulás lantán-szenzitív frakcióját viszonyítjuk egymáshoz és így kapjuk meg az egy Ca^{2+} ion transzportjára eső ATP-felhasználást. Nyolc hasonlóan elvégzett kísérlet adatai alapján a Ca^{2+}/ATP arány $1,96 \pm 0,15$ -nak adódott, amely nem különbözik szignifikánsan 2-től. A vizsgált periódusban a sejtek 2,3-DPG tartalma állandó marad, míg az ATP-tartalom az anorganikus foszfor felszabadulás abszolút értékénél kisebb mértékben csökken.

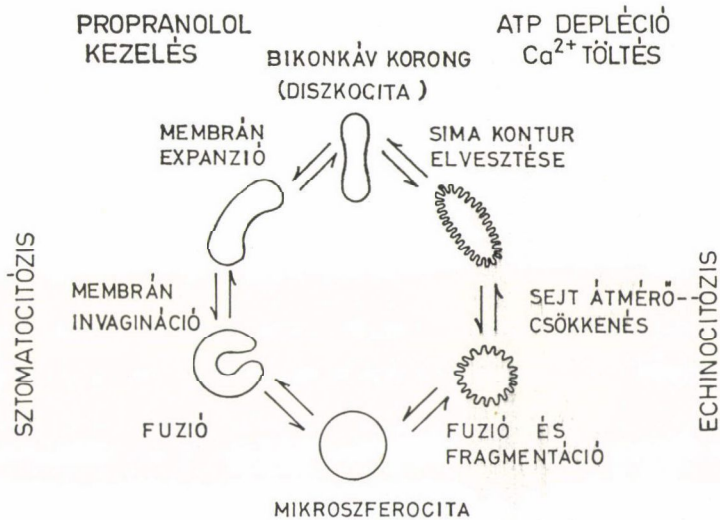


17. ábra. Ca^{2+} -kiáramlás, P_i -felszabadulás, ATP és 2,3-DPG-szint változása kalciummal töltött, 2,0 mM mono-jódacetamid + 2,0 mM $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ -tal kezelt intakt emberi vörösvérsejtek¹ nél. Médium: 1. 12. ábránál. 1. Kontroll; 2. 250 μM LaCl_3 . A kísérlet részletezését lásd a szövegben

Eredményeink ép vörösvérsejteken igazolják, hogy a szarkoplazmatikus retikulumhoz (MAKINOSE és HASSELBACH 1971) hasonlóan, a vörösvérsejtek is 2 Ca^{2+} -ion transzportjához 1 ATP molekula bontásából származó energiát használnak fel a Ca^{2+} -pumpa működése során.

III. A vörösvérsejt Ca^{2+} -függő alakváltozásai

Az ATP-depleció (NAKAO és mtsai 1960) és a Ca^{2+} -töltés (WHITE 1974) echinocytar alakváltozással (fogazódás) jár. Ca^{2+} -leválasztó vegyületek — így a propranolol is — viszont stomatocytar alakváltozást (invaginációt) hoznak létre (DEUTICKE 1968) (18. ábra).



18. ábra. A vörösvérsejt alakváltozásainak fázisai

Utóbbi tényről megfigyelve szokták egy kalap alá venni a Ca^{2+} -dependens K^{+} -transzport és az echinocytos alakváltozás folyamatait. Funkcionális vizsgálataink eredményeit, amelyek a két folyamat eltérő voltát igazolják, 2. táblázatunkban mutatjuk be.

2. táblázat

Ca^{2+} -dependens gyors K^{+} -kiáramlás és az echinocytos alakváltozás összehasonlítása

K^{+} -kiáramlás		Echinocytosis
ATP deplécio	nem feltétlen előfeltétel	
Fémion felvétel	Előfeltétel	Nem előfeltétel
Kiváltó fémek	Ca^{2+} , Sr^{2+} (La^{3+} , Pb^{2+})	Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}
Ca^{2+} -kötés	laza	szoros
La^{3+}	gátol	nem gátol
Kiváltó drogok	kevés, kationos természetű drog (stomatocytosist okoznak)	nagyszámú anionos, vagy nem ionos drog (szelektív K^{+} -kiáramlást nem okoznak)

A bikonkáv alak fenntartását befolyásoló tényezőket az alábbi 4 pontban foglalhatjuk össze:

1. ATP szint és kompartmentalizáció.
2. Ca^{2+} , ill. egyéb fém penetráció.
3. Ca^{2+} és a kötőhelyek kölcsönhatása.
4. A Ca^{2+} -kötőhelyektől független membránstruktúra változások.

- ad 1. Az ATP szint csökkenését — időben megkésve — követi az echinocytaer alakváltozás (GÁRDOS és mtsai 1966). A membrán belső felszínének fokozott ATP kötése (pl. a sejt enyhe proteolitikus kezelésének hatására) a bikonkáv alak fenntartásának kedvez (SZÁSZ és mtsai 1967).
- ad 2. Az echinocytaer alakváltozás Ca^{2+} -bevitellel előidézhető, de a Ca^{2+} felvétele az alakváltozásnak nem obligát előfeltétele. Ugyanezt az alakváltozást más fém ionok (Cu^{2+} , Cd^{2+}) bevitele is kiváltja (SZÁSZ 1970b, SZÁSZ és mtsai 1970).
- ad 3. A Ca^{2+} ionok és a kötőhelyek kölcsönhatása szoros típusú, az addicionális Ca^{2+} kötőhelyek valószínűleg fehérjéken helyezkednek el (SZÁSZ és mtsai 1970). Savanyítás és Ca^{2+} -leválasztó kationos drogok stomatocytaer, lúgosítás és anionos vagy nem ionos drogok membránba épülése echinocytaer alakváltozást okoznak (DEUTICKE 1968).
- ad 4. Koleszterin-dúsulás a sejt ellapulását, platicyta képződést okoz (COOPER 1970). Kívülről alkalmazott lizolecitin, ill. szabad zsírsav echinocytosist idéz elő (DEUTICKE 1968).

Az intracelluláris Ca^{2+} aktiváló és gátló anyagcserehatásait — amelyek az alakra befolyással lehetnek —, 19. ábránk szemlélteti. Ezek a hatások a következők:

1. Közvetlen hatások.

- A) A membránban levő foszfolipáz A (PAYSANT és mtsai 1970), valamint foszfolipáz C (ALLAN és MICHELL 1975, ALLAN és mtsai 1976a, b) aktiválása. Előbbi hatására az erősen membránaktív lizofoszfátidok, utóbbi hatására diglicerid képződik.
- B) Ca^{2+} -ATPázok és Ca^{2+} -proteinkinázok aktiválása.
- C) Mg^{2+} -ATPázok és Mg^{2+} -proteinkinázok gátlása.

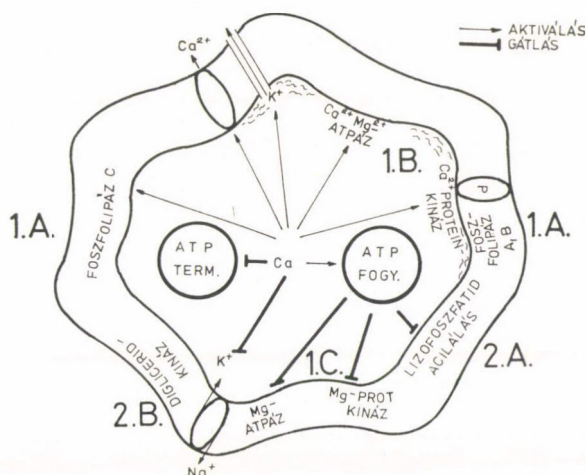
2. Közvetett hatások.

Ezek az ATP szint csökkentésén keresztül érvényesülnek. Ennek oka egyrészt a Ca^{2+} glikolízisgátló hatása, másrészt egyes ATP fogyasztó folyamatok, elsősorban a Ca^{2+} -pumpa aktiválása. Az ATP-lebomlason keresztül érvényesülő, közvetett Ca^{2+} -hatásokhoz tartozik:

- A) A lizofoszfátidok ATP-dependens reacilálásának kiesése.
- B) A diglicerid ATP-dependens refoszforilálásának, a digliceridkináz működésének kiesése.

A fent felsorolt folyamatok közül a Ca^{2+} -aktiváció okozta endogén lizofoszfátidképződés még nem bizonyított. Mi magunk is csak a saját plazmájá-

ban ATP-depletált vörösvérsejtek membránjában tudtunk lizolecitin fel-
szaporodást kimutatni. A lizolecitin képzése ilyenkor valószínűleg a plazma
LCAT (lecitin-koleszterin aciltranszferáz) enzimjének hatására jön létre
(SHOHET és HALEY 1973, LICHTMAN és mtsai 1974). A Ca^{2+} -aktivált endogén
digliceridképződés azonban bizonyítottan tekinthető (ALLAN és MICHELL 1975,
ALLAN és mtsai 1976a, b) és kísérőjelensége az echinocytar alakváltozásnak.



19. ábra. Az intracelluláris kalcium által előidézett biokémiai változások és az alakváltozás
lehetséges kapcsolatai vörösvérsejteké. Jelöléseket lásd a szövegben

Ugyanakkor kívülről a sejtekhez adott diglicerid stomatocytar átalakulást
okoz (ALLAN és mtsai 1975).

A kationos anaestheticumok is vagy stomatocytosist, vagy echinocytosist
hoznak létre attól függően, hogy a membrán melyik rétegébe épülnek be.
A permeabilis propranolol a foszfotidilszerinben dús, negatív töltésű belső
rétegbe épül be és stomatocytar alakváltozást okoz. Ugyanakkor az imper-
meabilis kationos anaestheticumok, valamint az anionos membránaktív vegyü-
letek a külső lipidrétegben dúsulnak és echinocytar alakváltozást okoznak.
Mindezen jelenségek értelmezhetők SHEETZ és SINGER 1974 ún. „bilayer
couple” hipotézisével. E feltevés szerint a membrán két rétege külön-külön
kiterjedhet, ill. összehúzódhat, miközben van der Waals erők révén a kapcsola-
lat köztük megmarad. E felületarány változásokat jellegzetes alakváltozások
követik. Amennyiben a külső réteg : belső réteg felszínaránya nő, a külső
réteg a belső fölött „összeráncolódik”: echinocytosis következik be, melyet
végül is fragmentáció követ. Amennyiben a külső réteg : belső réteg felszín-
aránya csökken, a belső réteg relatív expansziója stomatocytosist hoz létre.
Végül fúziós folyamatok révén alakul ki a mikroszferocita alak.

Minden stomatocytáer-echinocytáer alakváltozásra vonatkozó kísérleti eredményünk beilleszthető ebbe a felfogásba, de a magyarázat helyességét még számos kísérleti adattal kell bizonyítanunk.

A stomatocytá és echinocytá között álló normál korong bikonkavitásait fenntartó molekuláris mechanizmusra vonatkozóan azonban még elfogadható hipotézist sem lehet felállítani. E téren elsősorban a Ca^{2+} -ATPázok és a membránfoszforilációs folyamatok funkcionális szerepének tisztázása nélkülözhetetlen. Vizsgálatainkat ebben az irányban folytatjuk tovább.

IRODALOM

1. ALLAN, D., LOW, M. G., FINEAN, J. B., MICHELL, R. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **413**, 308 (1975).
2. ALLAN, D., MICHELL, R. H.: *Nature* **258**, 348 (1975).
3. ALLAN, D., BILLAH, M. M., FINEAN, S. P., MICHELL, R. H.: *Nature* **261**, 58 (1976a).
4. ALLAN, D., WATTS, R., MICHELL, R. H.: *Biochem. J.* **156**, 225 (1976b).
5. BLUM, R. M., HOFFMAN, J. F.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**, 1146 (1972).
6. COOPER, R. A.: *Semin. Hematol.* **7**, 296 (1970).
7. DEUTICKE, B.: *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 494 (1968).
8. DUNHAM, E. T., GLYNN, I. M.: *J. Physiol.* **156**, 274 (1961).
9. FERREIRA, H. G., LEW, V. L.: *Nature* **259**, 47 (1976).
10. FORSTNER, J., MANERY, J. F.: *Biochem. J.* **124**, 563 (1971).
11. GÁRDOS, G.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **10**, 185 (1956).
12. GÁRDOS, G.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **14**, 1 (1958).
13. GÁRDOS, G., LASSEN, U. V., PAPE, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **448**, 599 (1976).
14. GÁRDOS, G., STRAUB, F. B.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **12**, 1 (1957).
15. GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., ÁRKY, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1**, 253 (1966).
16. GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., SARKADI, B.: in „Biomembranes: Structure and Function”, eds. G. Gárdos, I. Szász. Akadémiai Kiadó, Budapest p. 167 (1975).
17. GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., SARKADI, B.: *Acta Biol. Med. Germ.* **36**, 823 (1977).
18. GLYNN, I. M., WARNER, A. E.: *Brit. J. Pharmacol.* **44**, 271 (1972).
19. HOFFMAN, J. F., KNAUF, P. A.: in „Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes”, eds. E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch, W. Wilmanns. Georg Thieme Verlag, Stuttgart p. 66 (1973).
20. KREGENOW, F. M., HOFFMAN, J. F.: *J. Gen. Physiol.* **60**, 406 (1972).
21. KWANT, W. O., SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **193**, 338 (1969).
22. LEW, V. L., BEAUGÉ, L.: in „Membrane Transport in Biology”, eds. G. Giebisch, D. C. Tosteson, H. H. Ussing. Springer Verlag, New York Vol. **2**, p. 81 (1978).
23. LICHTMAN, M. A., MARINETTI, G. V., GORDESKY, S. E.: *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* **14**, 5 (1974).
24. MAKINOSE, M., HASSELBACH, W.: *FEBS Letters* **12**, 271 (1971).
25. MANNINEN, V.: *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **355**, 1 (1970).
26. NAKAO, M., NAKAO, T., TATIBANA, M., YOSHIKAWA, H.: *J. Biochem.* **47**, 694 (1960).
27. NAYLER, W. G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **153**, 479 (1966).
28. PAYSANT, M., BITRAN, M., WALD, R., POLONOVSKI, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 169 (1970).
29. QUIST, E. E., ROUFOGALIS, B. D.: *FEBS Letters* **50**, 135 (1975).
30. RIORDAN, J. R., PASSOW, H.: in „Comparative Physiology”, eds. L. Bolis, K. Schmidt-Nielsen, S. H. P. Maddrell. North-Holland, Amsterdam p. 543 (1973).
31. SARKADI, B., SZÁSZ, I., GÁRDOS, G.: *J. Membrane Biol.* **26**, 357 (1976).
32. SARKADI, B., SZÁSZ, I., GERLÓCZY, A., GÁRDOS, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 93 (1977).
33. SATO, T., FUJII, T.: *Chem. Pharm. Bull., Tokyo* **22**, 368 (1974).
34. SCHATZMANN, H. J.: *Experientia* **22**, 364 (1966).
35. SCHATZMANN, H. J.: *J. Physiol.* **235**, 551 (1973).
36. SCHATZMANN, H. J.: in „Current Topics in Membranes and Transport”, eds. F. Bronner, A. Kleinzeller. Acad. Press, New York Vol. **6**, p. 125 (1975).

37. SCHATZMANN, H. J., ROSSI, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 379 (1971).
38. SHEETZ, M. P., SINGER, S. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 4457 (1974).
39. SHOHEET, S. B., HALEY, J. E.: in "Red, Cell Shape", eds. M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond. Springer Verlag, New York p. 41 (1973).
40. SIMONS, T. J. B.: *J. Physiol.* **256**, 227 (1976).
41. SZÁSZ I.: Vörösvérsejtek ATP-igényes folyamatainak vizsgálata. Kandidátusi értekezés (1970a).
42. SZÁSZ, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**, 399 (1970b).
43. SZÁSZ I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **18**, 137 (1975).
44. SZÁSZ I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 311 (1978).
45. SZÁSZ, I., ÁRKY, I., GÁRDOS, G.: *Haematologia* **1**, 287 (1967).
46. SZÁSZ, I., GÁRDOS, G.: *FEBS Letters* **44**, 213 (1974).
47. SZÁSZ, I., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *J. Membrane Biol.* **35**, 75 (1977).
48. SZÁSZ, I., TEITEL, P., GÁRDOS, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**, 409 (1970).
49. VINCENZI, F. F.: in "Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis", eds. G. Nichols, R. H. Wasserman. Acad. Press, New York p. 135 (1971).
50. WHITE, J. G.: *Am. J. Pathol.* **77**, 507 (1974).
51. WOLF, H. U.: *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 521 (1970).
52. WOLF, H. U.: *Biochem. J.* **130**, 311 (1972).