

HEMOLITIKUS ÉS MEMBRÁNSTABILIZÁLÓ HATÁSOK

MÁNYAI SÁNDOR

Országos Munka- és Üzemegészségügyi Intézet, Budapest

A hemolízis azt jelenti, hogy a vvt membránja a mintegy 65 000 molekulasúlyú hemoglobint áttereszt. A sejtek közötti térbe kiáramló hemoglobin (valamint az ezt megelőző vvt-duzzadás) megváltoztatja a sejtszuspenzió optikai viszonyait: a korábban átlátszatlan szuszpenzió többé-kevésbé átlátszóvá válik. A teljes átlátszóság eléréséig eltelt időnek (95, 96), vagy a fényáteresztőképességnek változása mérésén (97, 98) alapszik a hemolízis kvantitatív meghatározása.

Miért, hogyan válik a vvt membránja a hemoglobin számára hirtelen átjárhatóvá? Ez a kérdés több mint fél évszázada foglalkoztatja a kutatókat, de mint az alábbiakból kiderül, a hemolízis mechanizmusának még ma sincs egységes, minden részletre kiterjedő magyarázata. A hemolízisnek nagyon sokféle oka lehet. Ezért helyesebb *hemolitikus hatások*ról beszélni, hiszen ezeket vizsgálhatjuk.

Valószínűleg minden hemolitikus hatással szorosan együtt jár a vvt-ek duzzadása (10, 104). Ha a sejtek térfogata 60%-kal megnő (kritikus hemolitikus térfogat), hemoglobin áramlik ki belőlük (99, 100, 101, 12).

*Ozmotikus hemolízis*ről beszélünk, ha a vvt-eknek a kritikus hemolitikus térfogatot meghaladó duzzadását víz vagy a sejtmembránon szabadon átjárható anyagok bediffundálása okozza. A vvt-membrán permszelektivitásának megszüntetése — a sejtek magas fehérjekoncentrációjából adódó Donnan-egyensúly következtében — só és víz beáramlását vonja maga után. Az így bekövetkező duzzadás eredménye az ún. *kolloid-ozmotikus hemolízis* (1). Az ozmotikus és a kolloid-ozmotikus hemolízisek között tulajdonképpen az a lényeges különbség, hogy utóbbiak esetén a vvt-membrán szerkezetének módosulása okozza a fokozott permeabilitást. Nehéz azonban éles határt vonni, hogy milyen mértékű az a fizikai vagy kémiai behatás, amelynek következtében már nemcsak az ionok haladnak át a membránon, hanem kisebb-nagyobb molekulák, sőt a hemoglobin is áthatol rajta. Elvileg elképzelhető a vvt-membrán olyan nagymértékű károsodása, hogy a keletkező nyíláson a hemoglobin azonnal ki tud diffundálni. Kérdés azonban, hogy ilyen esetben kizárható-e annak a lehetősége, hogy a hemoglobin kiáramlását megelőzően, vagy

azzal egyidejűleg ionok és víz gyorsabban diffundálnak a sejtbe és kolloid-ozmotikus hemolitikus hatás is érvényesül. WILBRANDT (a) ozmotikus, (b) kolloid-ozmotikus és (c) nem-ozmotikus hemolízist különít el a hemolitikus ágensnek kitett vvt-ek ozmotikus rezisztenciájának viselkedése alapján (1). Számos, korábban nem-ozmotikusnak tartott hemolízisről mutatja ki, hogy létrejöttében a vvt-ekben uralkodó kolloid-ozmotikus nyomás megváltozása döntő szerepet játszik. Így vezeti be a kolloid-ozmotikus hemolízis fogalmát. Az előbbi okfejtés alapján azonban kérdéses, hogy van-e tisztán nem-ozmotikus hemolitikus hatás.

Miután a vvt-membrán kémiai szerkezete bonyolult, igen nagy azoknak a vegyületeknek a száma, amelyek valamelyik membrán-alkotórésszel reakcióba lépve hemolízist idéznek elő. Ez a referátum nem térhet ki sem minden hemolizáló vegyület ismertetésére, sem a hemolízis valamennyi paraméterének tárgyalására.

A hemolízissel kapcsolatos jelentősebb összefoglaló művek: (7, 102, 30, 1).

Ozmotikus hemolitikus hatások

Ha a vvt-ek belsejében nagyobb az ozmotikus nyomás, mint a sejteken kívül, víz áramlik a sejtekbe és megduzzadnak. A vvt-membrán egy kritikus mértéket meghaladó tágulása folytán a hemoglobin kidiffundál a sejtközötti térbe (10, 11, 12). Ozmotikus hemolízist okoznak a víz (4, 7, 13), hipotóniás elektrolitoldatok (4, 5, 6, 7, 8, 13, 17), valamint a vvt membránján szabadon átdiffundáló nem-elektrolitok: etilén-glikol (3), glicerin (3, 9, 13, 14, 27, 28), urea (3, 15), tiourea (3, 14), bizonyos monoszaharidok (4, 16, 17, 44), cukoralkoholok és elektrolitok: ammónium- vagy trimetilammónium-klorid, vagy acetát (17, 18) hipotóniás és izotóniás oldatai.

A vvt-ek teljes líziséhez szükséges idő elsősorban a víz, ill. a vvt-be jutó oldat penetrálásától függ (19–26, 31). Az ozmotikus hemolízis sebességét befolyásolja ezen kívül:

(a) a vvt-ek felület/térfogat aránya, amely változik a sejtek alakjával és fajonként különböző (29, 30); (b) a vvt-membrán rugalmasságában mutatkozó különbségek (47); (c) az ozmotikusan aktív anyag fokozatos elvesztése a hemolízis alatt, amely a vvt-ek zsugorodását eredményezi és a hemolízissel ellentétes irányban hat (32–37); (d) a kezdeti intracelluláris tonicitás (38); (e) a penetráló anyag hatására a vvt-membránban létrejövő szerkezeti változások (17); (f) a vér O_2 és CO_2 tartalma (a hemolízis exakt kinetikai vizsgálatát oxigenált vérrel szokták végezni); (g) a vizsgált vvt-ek életkora [anémiás vérből származó fiatalabb vvt-tel ozmotikus rezisztenciája nagyobb (62)]; (h) a hemolizáló oldat pH-ja és hőmérséklete [mindkettő csökkenése fokozza az ozmotikus hemolízist (39)], valamint (j) kis mennyiségű egyéb oldott anyagok jelenléte

a hemolizáló oldatban, amelyek a víz szerkezetének megváltoztatásával befolyásolják a hemolízist (40—43, 45, 46).

A mélyhűtéssel történő vér-, ill. szervkonzerválás szempontjából igen nagy a gyakorlati jelentősége az ozmotikus hemolízis két különleges fajtájának, amelyek végül is azonos mechanizmussal magyarázhatók:

(1) a vvt-ek hemolízise fagyasztás, majd újra felolvasztás következtében (63—69), valamint

(2) a hipertóniás hemolízis (70—78).

A vvt-eket körülvevő közegben a lehűtésekor a víz megfagyása során nő a NaCl koncentrációja. A vvt-ek hemolízise mindig 0,8 M, vagy azt meghaladó NaCl koncentrációnak megfelelő hőmérsékletéről történő felmelegítéskor következik be. Növekvő koncentrációjú glicerinnel hozzáadásával egyre alacsonyabb lesz a hemolízist előidéző hőmérséklet, de a hemolízis a hőmérséklettől függetlenül mindig 0,8 M NaCl koncentrációnál lép fel. A glicerinnel tehát a vizet hígítja a rendszerben. Hatásának előfeltétele, hogy szabadon behatoljon a vvt-ekbe. (A glicerinnel számára nem átjárható marha vvt, vagy rézionokkal impermeabilissá tett emberi vvt-ek fagyasztásos hemolízisét a glicerinnel nem védi ki.) A dimetilszulfoxid, amely ugyancsak jól penetráló nem-elektrolit, a glicerinnel hasonló cryoprotectiv anyag (76).

Mind a fagyasztással és újra felolvasztással, mind a hipertóniás közeggel előidézett hemolízist a vvt-víz egy maximális hányadának elvesztése, vagy az eltűrhető minimális térfogat elérése okozza. MERYMAN (67) véleménye szerint a sejteknek ekkor elért zsugorodása mechanikus membránkárosodást okoz. A kérdés részletes ismertetése SMITH (103) könyvében található meg.

Kolloid-ozmotikus hemolitikus hatások

A kolloid-ozmotikus hemolitikus hatások a vvt-membrán szelektív ionpermeabilitásának megváltozásán alapulnak. Ha a vvt-ek membránja valami miatt kationáteresztővé válik, a sejtek belsejében levő magas fehérjekoncentráció következtében, a Donnan-egyensúly értelmében, só és víz diffundál a vvt-ekbe és ozmotikus duzzadás, majd hemolízis következik be. A hemolízist megelőző kationbeáramlást igazolja valamennyi kolloid-ozmotikus hemolízis közös jellemző tulajdonsága, hogy a vvt-membránon normális körülmények között át nem hatoló szaharóz izotóniás oldatával a hemolízis mértéke csökkenthető, ill. megakadályozható.

A hő-*okozta* hemolízist korábban a vvt-membrán lipidjeinek „olvadásával” magyarázták. WILBRANDT azonban kimutatta (1), hogy a 41—65 °C között egyre nagyobb sebességgel fellépő hemolízisnek a membrán fokozódó kationáteresztőképessége az oka, amely arányos a hőmérsékletváltozással és nem egy kritikus hőfokon, hirtelen következik be. Az a megfigyelés, hogy

különböző egy- és kétértékű kationokat tartalmazó oldatokban szuszpendált vvt-ek hő- okozta hemolízisének hőmérsékletfüggése eltér egymástól, ugyancsak a kationpenetráció döntő szerepe utal a hemolízis mechanizmusában.

Az *etanol*, az *aceton* aránylag magas, néhány mólos töménységben, a *kloroform* pedig a telített vizes oldatnak megfelelő (kb. 0,1 M) koncentrációban hemolizálja a vvt-eket. Oldódásuk a vvt-membrán lipidjeiben a szelektív ionpermeabilitás irreverzibilis gátlását eredményezi, amelynek másodlagos következménye az, hogy a kolloid-ozmotikus duzzadás folytán a hemoglobin kiáramlik a vvt-ekből. Ezek a narkotikus hatású oldószerek a fenti irreverzibilis hatásokon kívül, egyidejűleg valószínűleg reverzibilisen gátolják a kationok (és a víz?) bejutását a sejtekbe (1). Erre lehet következtetni pl. a kloroform-hemolízis koncentráció- és hőmérsékletfüggéséből.

A sugárzó energiák közül a *röntgen-* (1, 48, 50, 105), ill. a *gamma-sugár* által okozott hemolízis jellegzetes kolloid-ozmotikus hemolízis. Az izotóniás NaCl oldatban szuszpendált vvt-eknek az ionizáló sugárzás hatására fellépő hemolízisét gátolni lehet izotóniás kolin-klorid-, valamint hipertóniás NaCl, ill. KCl oldattal. A hemolízist megelőzően a vvt-ek K^+ -t veszítenek és Na^+ -t vesznek fel. A K^+ -vesztés kolin-klorid-oldatban is bekövetkezik, azonban a hemolízis a cseleion bediffundálása hiányában elmarad.

2-Merkapto-etil-guanidin és redukált glutation (amelyek a vvt-be nem jutnak be) csökkentik a K^+ veszteséget és a hemolízist, ha a besugárzás előtt adják a vvt-szuszpenzióhoz. Az ionizáló sugárzás hatására csökken a vvt-ek SH-tartalma. A vvt-membrán SH-csoportjait p-klór-merkuri-benzoáttal, ill. p-klór-merkuri-benzolszulfonáttal megkötve utánozni lehet az ionizáló sugárzás által okozott hemolízist. Kolin-klorid-oldattal a két SH-reagens hemolitikus hatása is meggátolható. Mindez arra utal, hogy az ionizáló sugárzás a sejt-membránon át történő alkáli kationtranszportot károsítja a membrán SH-csoportjainak részleges oxidációja révén. A következmény: a vvt-ek ozmotikus duzzadása és lízise.

TOLBERG és MACEY (51) az ionizáló sugár vvt-membránt károsító hatásának egyik tényezőjeként a membránhoz kötött kalcium elvesztését tekinti.

Az ún. *fotooxidatív* vagy *fotodinámiás hemolízis* bizonyos festékek (fluoreszcein, eozin, eritrozín, bengál vörös) jelenlétében fény hatására következik be. A folyamat egy fotokémiai reakcióból és egy fénytől független hemolízisből áll. Előbbi feltehetően SH-csoportok oxidációja révén a Na,K-ATPáz inaktiválódását eredményezi. Az alkalmazott fény intenzitásától függően vagy azonnali K^+ -vesztés és hemolízis következik be (nagy fényintenzitás hatására), vagy (kis intenzitású fény alkalmazása esetén) ugyanez csak órákkal a fény-behatás megszűnése után lép fel (52—61).

Úgy látszik tehát, hogy a fotooxidatív hemolízis mechanizmusában ozmotikus jelenségek jelentős szerepet játszanak. Vértképzési protoporphyrinában szenvedő betegek vvt-eit oxigén jelenlétében 410 nm hullámhosszúságú

fénnyel megvilágítva hemolízis következik be (79–81). A hemolízis mértéke (sebessége) arányos a vvt-ek protoporfirin koncentrációjával. Normális vvt-ekhez adott protoporfirin-IX-dimetilészter hasonló hatást fejt ki. Mivel a hemolízis szaharózoldatban és N_2 -atmoszférában inkubált vvt-eken nem észlelhető, fotooxidáción alapuló kolloid-ozmotikus hemolízisnek tekinthetjük.

Klinikai és biokémiai szempontból egyaránt jelentősek az ún. *gyógyszerekkel kiváltott hemolízisek*, amelyekről jó összefoglaló tanulmány jelent meg (82). Ezeknek az in vivo hemolíziseknek patogenezisét részben tisztázták az elmúlt 20 év alatt. Vagy a vvt-ek fokozottan érzékenyek a gyógyszer közvetlen toxicitásával szemben (toxikus hemolízis), vagy az egyén allergiás a gyógyszer iránt (allergiás hemolízis). Előbbi esetben többnyire valamilyen örökletes zavar figyelhető meg a vvt kémiai összetételében, pl. glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz, vagy glutation-reduktáz, vagy glutation hiánya, vagy abnormális összetételű hemoglobin előfordulása mutatható ki. A gyógyszer hemolitikus hatása rendszerint egy oxidatív és egy tulajdonképpeni hemolitikus fázisból áll. Bár az esetek legtöbbszörénél a vvt-ek energia háztartása károsodik, nem zárható ki a hemoglobin toxikus módosulása mint a hemolízis oka (94). Az allergiás hemolízisek kórfolyamatában a gyógyszer bejutása a szervezetbe, kötődése valamilyen makromolekulához, az antitest indukciója és végül a vvt-ek immúnreakciója követik egymást. A tulajdonképpeni hemolízis mechanizmusa elvileg nem tér el a többi immún-hemolízistől: nem-ozmotikus típusú.

Az ún. *dialúrsav-hemolízis* (83, 84, 85, 86), mint klinikai laboratóriumi vizsgálati eljárás a szervezet tokoferol-ellátottságáról tájékoztat.

A kolloid-ozmotikus hemolízisek egyik kevésbé ismert fajtájáról, az ún. *por-hemolízis*ről saját kísérleteink igazolták a vvt-károsodás kolloid-ozmotikus természetét. Megfelelően kis szemcseméretű és nagy fajlagos felülettel bíró ásványi porok (elsősorban kristályos kvarc, valamint különböző vegyes alumínium-szilikátok) a mosott vvt-eket hemolizálják (87–92). A por és a vvt-membrán felülete közötti kölcsönhatás, az elsődleges membránkárosodás természete egyelőre nem ismert. A por esetleges mechanikai károsító hatása kizárható. A por és a vvt-membrán reakciója után, a módosított vvt-membránon azután egy kolloid-ozmotikus hemolízis következik be (93). Ezt igazolja, hogy a kvarcpor hemolitikus hatásának előfeltétele az, hogy az inkubáló médium megfelelő töménységű ionokat tartalmazzon. A vvt-ek hipotóniás duzzadása (glicerin, víz, NH_4Cl hozzáadására), a membrán prelitikus megfeszülése stabilizálódást jelent a kvarcpor hemolitikus hatásával szemben. Szaharózoldattal, kolin-klorid-oldattal, valamint a membránstabilizáló hatású bencyclánnal (Halidor^R) a kvarc hemolitikus hatása kivédhető. Kísérleteink azt látszanak igazolni, hogy a kvarc által okozott hemolízis a kolloid-ozmotikus hemolízisek csoportjába sorolható. Az időben rendkívül gyorsan bekövetkező lízist megelőzi a sejtmembrán hirtelen nagyfokú kationáteresztése. Azt a kér-

dést, hogy a kationszivárgás a kvarc-szemcse és a vvt-membrán érintkezési helyére lokalizálódik-e csak, vagy a kvarc hatására valamilyen töltésátrendező-dés következtében a sejtmembrán egész felületére kiterjed-e, további kísérletek hivatottak eldönteni.

Detergenssek, szaponinok hemolitikus hatását részben nem-ozmotikus típusúnak tartották. Ezt a nézetet főleg az támasztotta alá, hogy detergensekkel, szaponinokkal hemolizált vvt-membránokon elektronmikroszkóppal jellegzetes nyílásokat lehetett megfigyelni, ahonnan mintegy kioldódott a reakció során a membrán valamely alkotórésze. PETHICA és SCHULMAN (108) szerint azonban a vvt szelektív permeabilitása és ozmotikus tulajdonságai egy olyan alkotórésztől vagy komplextől függenek, amelyet a detergenssek vagy eltávolítanak, vagy pedig a felületi feszültségüket csökkentik. Mind az ionos, mind a nem-ionos detergenssek hemolitikus hatása azon alapszik, hogy a vvt-membrán koleszterinjével reagálnak. Ezt igazolják azok a megfigyelések, hogy hemolitikus hatásuk arányos a monomolekuláris koleszterin-rétegbe való behatolásukkal (106) és radioaktív koleszterinnel jelzett sejtekből a hemolízis alatt a radioaktivitás szabaddá válik (107).

A szaponinok hemolitikus hatásának támadáspontja ugyancsak a vvt-membrán koleszterinje (109–113). Aktivitásuk vvt-re vonatkoztatott relatív koncentrációjuktól, a minimális hemolitikus koncentrációtól, a pH-tól és toxicitásuktól függ (113). Homolog sorok esetén a hemolitikus hatást a szaponinok növekvő felszínaktivitásával arányosnak találták (114). Mások ilyen összefüggést nem tudtak megerősíteni (115). A poláros csoportok számának csökkentése fokozza a szaponinok hemolitikus hatását (118, 119). A szaponin-hemolizist számos szerves vegyület, melynek magának hemolitikus hatása nincs (benzol és halogénszármazékai, különböző alifás és aromás vegyületek), fokozni tudja (96, 116, 117), míg mások (szaharóz, koleszterin, lecitin, szérumalbumin) gátolják (117).

A hemolitikus akceleratorok iránt érzékeny ionos detergenssek és szaponinok által előidézett ún. lassú hemolízis több lépésből áll: (1) a hemolízis adszorbeálódik a sejt felszínén; (2) bediffundál a koleszterin-lipoprotein komplexbe és növeli a sejt kationpermeabilitását és térfogatát; (3) fokozatosan felbomlik a sejtmembrán és koleszterin válik szabaddá; (4) a hemoglobin kiáramlása.

A kationpermeabilitás fokozása és a membránszerkezet szétbomlása szellemesen különválasztható retinollal, ill. retinállal végzett kísérletekben. Kimutatták, hogy a retinol hemolitikus hatása két lépésből áll (120): (a) a retinol penetrációja a membránba, amely a 0 és 20 °C-on egyaránt megtörténik, majd (b) a csak 20 °C-on végbemenő membrándestrukciónak. Ugyanezt a kísérletet all-transz, ill. 11-cisz retinállal megismételve, az eredményt megerősítették, sőt megállapították, hogy az all-transz izomérnek nagyobb a hemolitikus hatása, mint a 11-cisz módosulatlak (121).

A polién antibiotikum filipin hemolitikus hatása a membrán koleszterintartalmán át érvényesül (122, 123) és valószínűleg ez az antibiotikus hatásának is a magyarázata (124).

Enzimek által okozott hemolízis

A baktérium toxinok hemolitikus hatása általában egyenesen arányos a toxin koncentrációjával és fordítva arányos a vvt-ek koncentrációjának logaritmusával (staphylococcus alfa toxin) (125, 126, 127); *Cl. welchii* theta toxin (132); pneumolysin, tetanolysin, *C. septicum* haemolysin (128); prymnesin (129, 130). Ez lényeges különbség a detergensnek hemolitikus hatásának exponenciális koncentrációfüggésével szemben. A toxin-hemolízis kinetikai vizsgálatából kiderült, hogy 2 fázisból áll (133, 134). Az első a toxin reakciója a vvt-membránnal, amely függ a lysin koncentrációjától, az inkubálás hőmérsékletétől és időtartamától. Antitoxinnal ez a reakció gátolható és a hőmérséklet csökkentésével mérsékelhető. A toxin + membrán reakció eredménye egy módosított vvt-membrán, amelyen át a sejt K^+ -t veszít és következményesen megduzzad. A vvt kolloid-ozmotikus duzzadása ozmotikus stabilizátorokkal meggátolható és kissé mérsékelhető a hőmérséklet csökkentésével. Ezzel szemben antitoxin a duzzadást és az azt megelőző káliumion-szivárgást nem befolyásolja. A sejt-duzzadás végeredménye a hemolízis.

A *Cl. welchii* theta toxinjának hemolitikus aktivitása lecitináz enzimaktivitásával függ össze (132). A prymnesin ezen kívül amfifatikus természetű; mint proteolipid (135) felszínaktív tulajdonságokkal is bír (136).

A kigyóméregnek hemolitikus hatásáért legalább két komponens felelős: a méregben található foszfolipáz A_2 izotóniás körülmények között a vvt-eket csak akkor hemolizálja, ha az eleyhez külön lecitint is adnak, amiből az enzim hatására lizolecitin képződik. Ezzel szemben normális vvt-eket hipotóniás közegben, valamint örökletes sphaerocytosisban szenvedők vvt-eit izotóniás körülmények között is hemolizálni képes (137–142). A kigyóméreg ún. direkt litikus faktora, egy bázikus polipeptid (143, 144) a vvt-ek káliumion-vesztését és következményes duzzadását idézi elő és így a foszfolipáz A számára szerkezetileg hozzáférhetővé teszi a membrán lecitinjét. Újabb vizsgálatok szerint (145) a direkt hemolitikus faktor hatásának nem-ozmotikus és ozmotikus hemolitikus aktivitása van, míg a foszfolipáz A_2 nem-ozmotikus hemolízist okoz.

Steril körülmények között eltartott vvt-ek *autohemolízise* valószínűleg komplex folyamat, amelyben mind a lipidek részleges, ill. „szimmetrikus” elvesztése (146–148), mind a membránfehérjék megváltozása (149, 150), mind a hemoglobin módosulása (151) közrejátszik az energiaháztartás zavarán kívül.

Az *immún-hemolízisek* közül az amboceptor-komplement-hemolízist WILBRANDT klasszikusan nem-ozmotikus hemolízisnek tekinti (1). Sokat

tanulmányozott, de még ma sem tisztázott a mechanizmusa a paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuriában szenvedők (PNH) vvt-ei immún-hemolízisének (152–159).

A hemolízis morfológiája

Ha vvt-eket fokozatosan csökkenő tonicitású NaCl oldatok sorozatába helyezzük és meghatározzuk a %-os hemolízist, a vvt-ek ozmotikus fragilitását mérjük meg. A vvt-ek %-os hemolízise a szuszpendáló NaCl oldat töménységének függvényében S görbét ad (160). Hasonló eredményre vezet szaponinnal, ill. szerves oldószerekkel (pl. butanollal) felvett fragilitási görbe is (161, 7). Figyelembe véve azt, hogy a hemolízis a „minden vagy semmi” törvény szerint következik be (162, 213), ez azt jelenti, hogy a vvt-ek egy populáción belül azonos hemolitikus hatásra nem egyformán reagálnak.

Hipotóniás hemolizátumhoz tömény sóoldatot adva és így visszaállítva az eredeti izotóniás körülményeket, a hemolizátum „lakk-festék”-szerű színét ismét a vvt-szuszpenzióra jellemző ún. „fedő-festék” szín váltja fel. Az ozmotikus hemolízis reverzióját először 1897-ben SPIRO említi (163), majd azóta igen sokan megerősítették és vizsgálták. A jelenség magyarázatát illetően megoszlottak a vélemények. Eleinte a hemolízis valódi megfordulásával magyarázták, vagyis a hemoglobin visszadiffundálna (?), kötődne a vvt-membránba (163–168). Később azonban meggyőzően bebizonyították, hogy az izotóniás sókoncentráció helyreállítása a hipotóniában megduzzadt vvt-ek zsugorodását eredményezi és a vvt-membrán ismét átjárhatatlanná válik a hemoglobin számára (169–173, 104).

A „reverzibilis hemolízis” újrafelfedezése az 1950-es években, mint módszer, nagy lendületet adott a kationakkumuláció és az egyenlőtlen ioneloszlás kutatásának. Lehetőséget adott arra, hogy — kihasználva a vvt-membrán nagy átjárhatóságát hipotóniás közegben — izoláltan olyan anyagokat, olyan koncentrációban juttasson be a vvt-ekbe, amelyek és amilyenben élettani körülmények között alig fordulhatnak elő. Az izotónia helyreállítása után ezeket az anyagokat, mintegy bezárva a vvt belsejébe, tanulmányozni lehetett az ionakkumulációra kifejlesztett hatásait. Az igen nagyszámú irodalmi hivatkozás helyett SCHWOCH és PASSOW (174) összefoglalójáról történnék csak említés, mint amely e területen a legfrissebb átfogó referátum. A hemolízis reverzibilitása azonban azt a kérdést is felveti, hogy morfológiailag mi történik a hemolízis előtt, alatt és után a vvt-tel és annak membránjával.

Mikroszkóppal vizsgálva ozmotikus és kolloid-ozmotikus hemolízis esetén a vvt-et, a bikonkáv korong alakú vvt a disc → crenated disc → crenated sphere → sphere → prolytic sphere → ghost* alakváltozásokon át jut el

* Sajnos, nincs megfelelő magyar kifejezés.

a hemolizátumban található membránhoz (7). Az egyes alakváltozások időtartamai a hemolizintól függően változó. Szaponinok esetén ($25 \mu\text{g}$ szaponin/ 10^8 vvt) 30 percig tart, amíg a vvt crenated sphere alakig eljut, utána viszont igen gyors a ghost kialakulása. Ezzel szemben anionos detergensnek, lecitin ($500 \mu\text{g}/10^8$ vvt) hatására a vvt 1 percnél rövidebb idő alatt sphere-vé alakul. A fenti alakváltozások nem kötelezően előzik meg a hemolízist: a patkány vvt pl. 4°C -on mint bikonkáv korong hemolizál.

Külön említést érdemelnek a madarak és alacsonyabb rendű gerincesek magvas vörösvérsejtjei. Ezek a sejtek mind a hipotónia, mind a szaponinok hemolitikus hatásával szemben feltűnő rezisztenciát mutatnak (175–180). Különlegesen nagy ozmotikus stabilitása van a tevé ovális, de magvatlan vvt-einek (181).

A hemolízis morfológiájának másik izgalmas kérdése, hogy mi történik a vvt-membránnal a hemolízis alatt/következtében. Erre a kérdésre különbözőképpen előkezelt (hemolizált) vvt-ek membránjának elektronmikroszkópos vizsgálata kísérelt meg feleletet adni.

Hogyan jut át a hemolízis során a 32 \AA diffúziós sugarú hemoglobin molekula a sejt membránján? Az a tény, hogy reverzibilis hemolízissel aktív kationakkumulációra képes membránokat (vvt-árnyakat) lehet nyerni, elveti azt a feltételezést, hogy a hipotónia hatására a membránon repedések keletkeznének. Valószínűbb, hogy a vvt-be áramló víz feszítő hatása a plazma-membránon átmenetileg nyílásokat hoz létre, amelyek a hemoglobin át-diffundálása után azonnal rugalmasan zárulnak. Ha megfelelő körülményekre nem ügyelnek, úgy hipotóniás hemolizátumokban a vvt membránján ilyen nagyméretű nyílásokat nem látni elektronmikroszkóppal. Hosszú ideig tartó hipotóniás állás után (esetleg baktériumos fertőzés következtében?) tubuláris nyúlványok figyelhetők meg a vvt-membrán külső felszínén. A sejtek formalinos kezelésével képződésüket meg lehet gátolni (182). SEEMAN és mtársai (183) az ozmotikus hemolízis kezdete után 12 másodperccel fixált vvt-ek sorozatmetszetein elektronmikroszkóppal $1 \mu\text{m}$ hosszúságú $100\text{--}1000 \text{ \AA}$ széles réseket észleltek, amelyek némelyike összefüggött egymással. Szaponinnal hemolizált vvt-ek membránján ilyen képződményeket sohasem láttak, helyette $40\text{--}50 \text{ \AA}$ átmérőjű lyukak (pit) figyelhetők meg a membrán extracelluláris felszínén. Hirtelen, vagy fokozatos hipotóniás hemolízis alatt ferritin és koloid arany juthat be a vvt-ekbe, feltéve, hogy ezek az anyagok a hemolízis kezdete után $15\text{--}20$ másodperccel érintkeznek a vvt-membránnal. Viszont 3 perccel később már nem átjárható a membrán, noha még mindig hipotóniás közegben van. Tehát a hemolízis kezdete után $15\text{--}20$ másodpercig léteznie kell átmenetileg olyan nyílásoknak, amelyeken a hemoglobin kidiffundálhat. A hemolízis kezdete után $10\text{--}20$ másodperccel elvégzett glutáraldehydes fixálással SEEMAN-nak sikerült elcsípní egy nyitott állapotban levő átmeneti nyílást a vvt-membránon (184). Ugyanakkor azt is megállapították, hogy lizo-

lecitin és más felszínaktív anyagok (pl. holothurin A = szaponin) hatására létrejövő hasonló nyílások nem záródnak.

DOURMASHKIN és mtársai (185, 182) szaponinnal kezelt vvt-membránokon szabályos hatszöges elrendeződésű nyílásokat figyeltek meg. Véleményük szerint ezek a nyílások a szaponinnal reagált és kioldott koleszterin helyei lennének a plazmamembránban. BANGHAM és mtársai (109), valamint GLAUERT és mtársai (110) koleszterinfilmlet szaponinnal kezelve ugyanolyan elrendeződést találtak elektronmikroszkóppal. Ezért úgy vélik, hogy a hexagonális elrendeződés nem a koleszterin eredeti topográfiáját adja meg, hanem a szaponin + koleszterin komplex helyzetét, amely a vvt-membránokon továbbra is adszorbeálódva marad.

A polién antibiotikum filipin (de nem az amphotericin B) az emberi és a patkány vvt-eken 150–200 Å átmérőjű aggregátumokat és krátereket hoz létre, amelyek alakjukban és méretükben nagyon hasonlítanak az antitest-komplement immún-hemolízis elektronmikroszkópos képéhez (123, 185, 186, 187).

Membránstabilizáló hatások

Rendkívül nagyszámú, legkülönbözőbb kémiai szerkezetű szerves vegyület bifázisos hatást fejt ki a vvt-ekre. Míg magasabb koncentrációban hemolizálják a vvt-eket, addig ugyanezek az anyagok alacsonyabb koncentrációban gátolják a hemolízist: stabilizálják a vvt-ek membránját.

A membránstabilizáló és litikus hatás nemcsak a vvt-ek plazmamembránján érvényesül, hanem szubcelluláris membránokon is megnyilvánul. A hatóanyag koncentrációjától függően gátolják (stabilizálják), ill. fokozzák (labilizálják) *in vitro* enzimek (pl. savanyú foszfatáz) szivárgását a lizoszómákból (192, 193); mitokondriumok duzzadását (194, 195, 196), valamint katekolaminok kiáramlását a mellékvese velő (197, 232), ill. a *n. splanchnicus chromaffin* granuláiból (198, 232).

Membránstabilizáló hatást vizsgáló módszerek

A különböző anyagok membránstabilizáló hatását, a többi sejthez képest aránylag egyszerű felépítése miatt a vvt-eken lehet a legkönnyebben vizsgálni. Mivel helyi és általános érzéstelenítőkről, fájdalomcsillapítókról, reumaellenes szerekről, tranquillánsokról derült ki, hogy megfelelő koncentrációban gátolják a vvt-ek ozmotikus hemolízisét, a farmakológusok azt remélték, hogy a membránstabilizáló hatás vizsgálatában egyszerű és gyors „screening” módszer találtak farmakológiailag hatékony vegyületek keresésére. Az alkalmazott módszer azonban szükségszerűen megszünteti az eredményt. Különböző módon előidézett hemolíziseken vizsgálva a vegyületek gátló hatását, azt igen változatosnak találták (188).

A membránstabilizáló hatást legáltalánosabban megfelelően pufferolt NaCl-oldatban létrehozott hipotóniás hemolízisen tanulmányozzák (191, 201, 237) úgy, hogy a stabilizátor vagy a kb. 40–60%-os hemolízist előidéző hipotóniás oldatba kerül, vagy a stabilizátorral izotóniás körülmények között előinkubált vvt-szuszpenzió hipotóniás hemolízisét idézik elő (207). A vvt-membrán permeabilitásának változását turbidimetriával, valamint a hemoglobin kioldódása, ill. K^+ -szivárgás alapján mérik. A stabilizátor hatékonyságát azzal a koncentrációjukkal jellemzik, amely az adott körülmények között a hipotóniás hemolízis 50%-os gátlását idézi elő. Ennek pontos meghatározására MACHLEIDT és munkatársai (241) eljárása szolgál. Megfelelően szerkesztett pumpa segítségével meghatározott sebességű, lassú hemolízisek gátlása vizsgálható (216). A membránstabilizátorok hatásmechanizmusának felderítése érdekében igen jelentős volt SEEMAN és mtsai (228) két vizsgáló eljárása. Az ún. „ghost-formation” módszer alacsony koncentrációjú stabilizátor jelenlétében ozmotikusan hemolizált vvt-ek membránjának térfogatát (növekedését) méri Coulter counter segítségével. Az ún. „sealed-ghost-expansion” eljárás az előbbtől abban tér el, hogy a már hemolizált membránokhoz adott stabilizátor hatására megnövekedett ghost-térfogatot méri.

A hipotóniás hemolízis nemcsak híg NaCl-oldattal, hanem hipotóniás glukózzal (188), ill. izotóniás glicerinnel és ureával (237) is létrehozható. Stabilizáló hatás érvényesül alacsony pH által (pH 5,2) okozott (189), ill. mechanikus hemolízissel (189, 191, 199) szemben is.

A vvt-membrán kémiai módosítása következtében fellépő kolloid-ozmotikus hemolízis ugyancsak gátolható bizonyos membránstabilizáló anyagokkal. Figyelembe kell azonban venni, hogy pl. deoxikoláttal (188), digitoninnal (188), szaponinnal (189), Na-laurilszulfáttal (189), vagy magas hőmérséklettel (189) előidézett hemolízis, ill. butanollal kezelt vvt-ek fokozott $^{22}\text{Na}^+$ felvétele (245) nem feltétlenül, vagy ha igen, nem azonos mechanizmussal gátolható, mint a hipotóniás hemolízis. Ugyanez áll foszfolipáz C-vel, ill. lizolecitinnel kezelt vvt-ek labilizált membránjára is (189).

A membránstabilizátorok farmakológiai hatékonyságuk arányában csökkentik a Ringer-oldat felületi feszültségét (231). Hasonlóképpen csökkentik a vvt-ek deformabilitását (236), amely in vitro filtrációs (235, 236) és áramlási (204) tulajdonságaik, valamint a vvt-szuszpenzió viszkozitásának változása (150, 236) alapján tanulmányozható. Membránstabilizáló anyagok hatására kissé nagyobb lesz a centrifugált vvt-ek közé zárt ún. trapped médium mennyisége (202). A vvt süllyedési sebességét csökkentő hatása (202) ugyancsak alkalmas a membránstabilizátorok vizsgálatára. A membránstabilizáló hatás esetleges in vivo megnyilvánulására utal a klórpromazinnak az intravasculáris vvt-pusztulás ellen megfigyelt védő hatása (206).

A membránstabilizáló hatást befolyásoló tényezők

A membránstabilizáló hatás különböző fajú vvt-eken kimutatható (ember : 191, 200, 202, 203; marha : 190, 203; nyúl : 214; kutya : 189, 201; disznó : 204; patkány : 188). A hemolízis elleni gátló hatás mértéke a kölesönhatás időtartamától (191, 203), a vvt-ek (191) és a hatóanyag koncentrációjától függ. Utóbbi azonban olykor csak névleges, mert a vvt-m embránban 3000-szer nagyobb lehet a valóságos stabilizátorkoncentráció, mint a médiumban (191). A stabilizáló hatás mind gyors, mind fokozatosan létrehozott, ún. lassú hemolízis esetén megnyilvánul (215, 216) és reverzibilis folyamat (191).

A stabilizáló anyag kémiai természetétől függően az *in vitro* közeg pH-ja befolyásolhatja a hatás nagyságát (200, 212, 233). Valószínű azonban, hogy e tekintetben döntő szerepe van a membrán két oldala között esetleg fennálló pH-különbségnek. A klórpromazintról pl. megállapították, hogy mind töltéssel bíró, mind neutrális alakja egyformán membránexpanziót okoz (230).

A hőmérséklet ellentétes hatást fejt ki (212, 233) ghostokon, ill. ép vvt-eken vizsgált membránstabilizáló hatásra. Előbbiekben a hőmérséklet emelése — feltehetően a megoszlási hányados megváltozása következtében — fokozza az anaestheticumok által okozott membránexpanziót (229). Ezzel szemben ép sejteken a magasabb hőmérséklet csökkenti a hipotóniás hemolízis elleni védő hatásukat.

A szérum, legalább is részben a fehérjék adszorpciós tulajdonsága következtében, csökkentve a szabad hatóanyag koncentrációját, gátolja a membránstabilizáló hatásokat (214, 233).

A vegyületek kémiai szerkezete és antihe molitikus hatása között számos kutatócsoport mutatott ki összefüggést: triciklusos tranquillánsok (201), nemszteroid gyulladásgátlók (212), alkohol anaestheticumok (238, 239), enantiomer párok összehasonlítása (243). ROTH és SEEMAN (207) vizsgálataiból arra a következtetésre jut, hogy minden lipid-oldékony érzéstelenítő membránstabilizáló hatású. Érdekes összefüggés mutatható ki a kémiai szerkezet, az oktanol/víz, ill. membrán/puffer közötti megoszlás és az antihe molitikus hatás között (244). Fenolok 50%-os hemolízisgátló koncentrációi és oktanol/víz megoszlási hányadosai között szintén lineáris korrelációt állapítottak meg (241).

A membránstabilizálás mechanizmusa

Ez a kérdés ma még nincs teljesen tisztázva. Vannak szabatosan megfigyelt kísérleti jelenségek (I), amelyek mind következményei/okai lehetnek egy közös membránváltozásnak (II). A további kérdés az, hogy milyen kémiai reakciók (III) okozzák a membránnak ezt a módosulását. Vegyük sorra a kísérleti adatokat és lehetséges magyarázataikat:

(I) A membránstabilizáló anyagok (mind a pozitív, mind a negatív töltéssel bíró, mind pedig a semleges anaestheticumok)

- a) fokozzák a vvt-ek hidraulikus víz-permeabilitását (234);
- b) Ca^{2+} jelenlétében gátolják, Ca^{2+} hiányában fokozzák a sejtbe irányuló Na^{+} -áramlást (211);
- c) csökkentik a vvt-ek ozmotikus fragilitását (215);
- d) növelik a kritikus hemolitikus térfogatot (215).
- e) Általános érzéstelenítők farmakológiailag hatékony koncentrációban membránexpanziót okoznak egyidejű K^{+} -szivárgás nélkül.
- f) Ca^{2+} -diszlokációt okoznak (205, 222). A klórpromazin pl. kompetitive kiszorítja a membránhoz kötött Ca^{2+} -ot. Egy Ca^{2+} eltávolításáért 2 mol klórpromazin felelős.

Mi lehet a Ca^{2+} -diszlokáció következménye a membrán tulajdonságai szempontjából? Ha a Ca^{2+} helyét a membránstabilizátor foglalja el, befolyásolja a különböző ionok (beleértve a Ca^{2+} -ét is) aktív és passzív transzportját (223, 224, 225). Gátlódhat a Ca^{2+} -ATPáz, amely kontraktilis szerepet tölt be a sejtmembránban (227). Megváltozik a membrán viszkozitása (226). A membrán lipofil helyein átrendeződés következhet be (201), a membrán fluidizálódik (208, 209, 210).

(II) A leglényegesebb következmény azonban az, hogy a membrán felülete kitágul. Valószínűleg ez az a közös membránváltozás, amely az összes megfigyelt jelenség magyarázatául szolgálhat. A membránstabilizálódás esetén ez a tágulás a felületnek kb. 3,5%-át teszi ki (191, 200). Az ozmotikus hemolízis kb. 7%-os felületnövekedéskor következik be. Újabb kimutatták, hogy illékony általános érzéstelenítők (halothan, kloroform, éter) gátolják a vvt-ek ozmotikus lízisét. Az emberi anaesthesiához szükséges minimális alveoláris koncentráció in vitro 8%-os hemolízisgátlást okoz. Ez a hatás a vvt-felület 0,4%-os expanziójának felel meg, míg a helyi érzéstelenítéshez 2%-os felületnagyoobbodás kell (240).

A vvt felületének megnagyoobbodásával nő a felület/térfogat aránya, ami kisebb mértékű ozmotikus fragilitást jelent (217, 218, 219, 101).

A membránstabilizátorok hatására bekövetkező membránexpanziót nemcsak a Ca^{2+} eltávolítása okozhatja, amely a membránnak mintegy „kondenzált”, tömör állapotát biztosítja. Tény, hogy a stabilizátor koncentrációja sokszorososan nagyobb a membránban, mint a szuszpendáló médiumban. A stabilizátor molekulák mintegy beleoldódnak, beletemetkeznek a membrán állományába, ami önmaga a tágulás $\frac{1}{3}$ -át teheti ki (215). Figyelembe kell venni a membrántágulás értelmezésénél SCHNEIDER „adszorpció — extenzió” hipotézisét is (220). A membrán expanziójában valószínűleg szerepet játszik az is, hogy a membránstabilizáló anyagok a fehérjék konformációját vagy közvetlenül, vagy hidratációjuk befolyásolásával megváltoztatják (221).

(III) Végül válaszra vár az a kérdés, hogy milyen kémiai reakció felelős a fentiekben részletezett membránváltozásokért.

MIZUSHIMA és mtsai (189) a membránstabilizáló anyagok (nem-szteroid gyulladásgátlók) és a membrán fehérjéi közötti reakció mellett törnek lándzsát. Nézetüket azzal támasztják alá, hogy a membránfehérjéket módosító ágensekkel, valamint fehérje denaturálódással járó behatásokkal a membránstabilizáló hatásokat fel tudják függeszteni. FEINSTEIN és mtsai (190) 8-anilino-1-naftol-szulfonát fluoreszcenciaváltozását vizsgálva a vvt-membránon arra a következtetésre jutnak, hogy a fehérjék hidrofób régióihoz kötődő molekulák jelentéktelen szerepet játszhatnak a fluoreszcenciaváltozásban. Véleményük szerint a membránstabilizáló kölcsönhatásban a savanyú foszfolipidek a legjelentősebbek. Ugyancsak a lipidek fontosságát húzzák alá azok a vizsgálatok (238), amelyekben meghatározták az alkohol anaestheticumokat megkötő helyek számát a vvt-membránon és 65,5 mmol/kg membrán-szárazanyagnak találták. Ez az érték jól egyezik a klórpromazin kötőhelyeinek számával (80 mmol/kg). Kérdés, hogy a vvt-membrán mely régiójában keresendők a kötőhelyek. Számításba jöhet:

- a) a lipid molekulák nem-poláros része,
- b) a lipidek és fehérjék nem-poláros közti felszíne és
- c) a fehérje molekulák nem-poláros része.

Az alkoholok adszorpciójának szabad energia változása $-0,7$ kcal/mol $-CH_2$, amely érték jól egyezik az oldott fázisból a teljes apoláros fázisba történő adszorpció szabad energia változásával (cf. 239). Miután a fehérjék nem-poláros részéhez történő kötődés szabad energia változása -100 és -560 cal/mol $-CH_2$, fehérje konformáció változás esetén pedig -650 és 1100 cal/mol $-CH_2$, a legvalószínűbb, hogy a lipid molekulák nem-poláros régiói és/illetve a lipidek és fehérjék nem-poláros közti felszíne a kötőhely.

IRODALOM

1. WILBRANDT, W.: Arch. ges. Physiol. **245**, 22 (1941).
2. WILBRANDT, W.: Arch. ges. Physiol. **245**, 1 (1941).
3. JACOBS, M. H., GLASSMAN, N. H., PARPART, A. K.: J. exptl. Zool. **113**, 277 (1950).
4. REIMOLD, E. W., HEINRICHS, M.: Z. ges. exp. Med. **152**, 62 (1970).
5. DANON, D.: J. Cell. Comp. Physiol. **57**, 111 (1961).
6. DANON, D., NEVO, A., MARIKOVSKY, Y.: Bull. Res. Council Israel **6 E**, 36 (1956).
7. PONDER, E.: Hemolysis and Related Phenomena, Grune and Stratton, New York (1948).
8. DODGE, J. T., MITCHELL, C., HANAHAN, D. J.: Arch. Biochem. Biophys. **100**, 119 (1963).
9. DE GIER, J., VAN DEENEN, L. L. M., VAN SENDEN, K. G.: Experientia **22**, 20 (1966).
10. DAVSON, H., PONDER, E.: J. Cell. Comp. Physiol. **15**, 67 (1940).
11. HERZ, A.: Folia Haemat. **77**, 181 (1960).
12. HOFFMAN, J. F., EDEN, M., BAUR, J. S., BEDELL, R. H. S.: J. Cell. Comp. Physiol. **51**, 405 (1958).
13. WESSELS, J. M. C., PALS, D. T. F., VEERKAMP, J. H.: Biochim. Biophys. Acta **291**, 165 (1973).
14. SZELÉNYI, J., HOLLÁN, S. R.: in DEUTSCH, E., GERLACH, E., MOSER, K. (Eds.): Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart pp. 440 (1968).
15. WURSTER, D. E., SHAPIRO, P. H.: J. Pharm. Sci. **52**, 33 (1963).
16. PERRIS, A. D., MYERS, D. K.: Nature **207**, 986 (1965).
17. MERYMAN, H. T.: Amer. J. Physiol. **225**, 365 (1973).
18. JACOBS, M.: Harvey Lectures Ser. **22**, 146 (1927).
19. BLUM, R. M., FORSTER, R. E.: Biochim. Biophys. Acta **203**, 410 (1970).

20. OLMSTEAD, E. G.: *J. Gen. Physiol.* **44**, 227 (1960).
21. RICH, G. T., SHA'AFI, R. I., ROMUALDEZ, A., SOLOMON, A. K.: *J. Gen. Physiol.* **52**, 941 (1968).
22. SHA'AFI, R. I., DAKKURI, A., TO'MEY, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 260 (1971).
23. FARMER, R. E. L., MACEY, R. I.: *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 53 (1970).
24. FARMER, R. E. L., MACEY, R. I.: *Biochim. Biophys. Acta* **290**, 290 (1972).
25. PAGANELLI, C. V., SOLOMON, A. K.: *J. Gen. Physiol.* **41**, 259 (1957).
26. DICK, D. A. T., BITTER, E. E.: *Membranes and Ion Transport*. Vol. 3., John Wiley and Sons, London pp. 211 (1971).
27. WESSELS, J. M. C., VEERKAMP, J. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 178 (1973).
28. WESSELS, J. M. C., VEERKAMP, J. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 190 (1973).
29. JACOBS, M. H., CORSON, S. A.: *Biol. Bull.* **67**, 325 (1934).
30. WHITTAM, R.: *Transport and Diffusion in Red Blood Cells*. Arnold Ltd., Londm (1964).
31. PASSOW, H.: in Bishop, C., Surgenor, D. M. (Eds.): *The Red Blood Cell*. Academic Press, New York pp. 71 (1964).
32. JACOBS, M. H., PARPART, A. K.: *Biol. Bull.* **65**, 512 (1933).
33. JACOBS, M. H., PARPART, A. K., CORSON, S. A.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **9**, 177 (1937).
34. WILBRANDT, W.: *Arch. ges. Physiol.* **243**, 537 (1940).
35. LACELLE, P., ROTHSTEIN, A.: *J. Gen. Physiol.* **50**, 171 (1966).
36. DONLON, J. A., ROTHSTEIN, A.: *J. Membrane Biol.* **1**, 37 (1969).
37. COTTERELL, D., WITTAM, R.: *J. Physiol. (Lond.)* **214**, 509 (1971).
38. OLMSTEAD, E. G.: *Mammalian Cell Water. Physiologic and Clinical Aspects*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 55. (1966).
39. DACIE, J. V., VAUGHAN, J. M.: *J. Path. Bact.* **46**, 341 (1938).
40. GOOD, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 229 (1961).
41. GOOD, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 397 (1961).
42. GOOD, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 130 (1960).
43. GOOD, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 485 (1961).
44. GOOD, W., ROSE, S. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 483 (1968).
45. COLDMAN, M. F., GOOD, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 194, 206 (1968).
46. COLDMAN, M. F., GOOD, W., SWIFT, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 62 (1969).
47. MOORE, T. J.: *J. Lipid Res.* **9**, 642 (1968).
48. LINDEMANN, B.: *Röntgenfortschritte* **75**, 523 (1951).
49. KOLLMANN, G., SHAPIRO, B., MARTIN, D.: *Radiation Res.* **37**, 551 (1969).
50. TING, T. P., ZIRKLE, R. E.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **16**, 269 (1940).
51. TOLBERG, A. B., MACEY, R. I.: *J. Cell. Physiol.* **79**, 43 (1972).
52. BLUM, H. F., PACE, N., GARRETT, R. L.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **9**, 217 (1937).
53. BLUM, H. F.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **9**, 229 (1937).
54. BLUM, H. F., MORGAN, J. L.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **13**, 269 (1939).
55. BLUM, H. F., HYMAN, C.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **13**, 281 (1939).
56. BLUM, H. F., GILBERT, H. W.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **15**, 75 (1940).
57. BLUM, H. F., GILBERT, H. W.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **15**, 85 (1940).
58. BORGESE, T. A., GREEN, J. W.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 215 (1962).
59. DAVSON, H., PONDER, E.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **15**, 67 (1940).
60. DUNCAN, C. J., BOWLER, K.: *J. Cell. Physiol.* **74**, 259 (1969).
61. DASTOLI, F. R., GREEN, J. W.: *J. Cell. Physiol.* **65**, 313 (1965).
62. JOHNSON, L. W., SCHWARTZ, S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 871 (1971).
63. JUNG, F.: *Dtsch Ges.-Wes.* **9**, 307 (1954).
64. LOVELOCK, J. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 414 (1953); **11**, 28 (1953).
65. LUYET, B., RAPATZ, G.: *Cryobiology* **6**, 425 (1970).
66. RAPATZ, G., LUYET, B.: *J. Cell. Physiol.* **77**, 373 (1971).
67. MERYMAN, H. T.: in Jameison, G. A., Greenwalt, T. J. (Eds.): *Red Cell Membrane*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, pp. 352 (1969).
68. MERYMAN, H. T.: *Cryobiology* **8**, 489 (1971).
69. PRIBOR, D. B.: *Cryobiology* **8**, 14 (1971).
70. SÖDERSTRÖM, N.: *Acta Physiol. Scand.* **7**, 56 (1944).
71. TAKEI, T.: *Biochem. Z.* **123**, 104 (1921).
72. VALDIVIESO, D., HUNTER, F. R.: *J. Appl. Physiol.* **16**, 665 (1961).
73. MERYMAN, H. T.: *Nature* **218**, 333 (1968).
74. ZADE-OPPEN A. M. M.: *Acta Physiol. Scand.* **73**, 341 (1968).
75. ZADE-OPPEN, A. M. M.: *Experientia* **26**, 1087 (1970).
76. LOVELOCK, J. E., BISHOP, M. W. H.: *Nature* **183**, 1394 (1959).
77. FERRANT, J., WOOLGAR, A. E.: *Cryobiology* **7**, 56 (1970).
78. ACÉL, D., LORBER, L.: *Biochem. Z.* **147**, 557 (1924).

79. FLEISCHER, A. S., HARBER, L. C., COOK, J. S., BAER, R. L.: *J. Invest. Dermatol.* **46**, 505 (1966).
80. PETERKA, E. S., RUNGE, W. J., FUSARO, R. M.: *Arch. Dermatol.* **94**, 282 (1966).
81. SCHOTHORST, A. A., VAN STEVENINCK, J., WENT, L. N.: *Clin. Chim. Acta* **28**, 41 (1970).
82. DAUSSET, J., CONTU, L.: *Annu. Rev. Med.* **18**, 55 (1970).
83. HAYES, K. C., ROUSSEAU, J. E.: *Lab. Animal Care* **20**, 48 (1970).
84. FRIEDMAN, L., WEISS, W., WHERRY, F., KLINE, O. L.: *J. Nutr.* **65**, 143 (1958).
85. ROSE, C. S., GYÖRGY, P.: *Blood* **5**, 1062 (1950).
86. BIERI, J. G., POUKKA, R. K. H.: *J. Nutr.* **100**, 557 (1970).
87. STALDER, K.: *Beitr. Silikose-Forsch.* **86**, 1 (1965).
88. STALDER, K.: *Nature* **207**, 874 (1965).
89. STALDER, K.: *Int. Arch. Gewebehyg.* **24**, 238 (1968).
90. ZAJUSZ, K., PARADOWSKI, Z., DUDZIAK, Z.: *Med. Pracy* **19**, 26 (1968).
91. MÁNYAI, S., KABAI, J., KIS, J., SÜVEGES, É., TIMÁR, M.: *Med. Lavoro* **60**, 331 (1969).
92. MÁNYAI, S., KABAI, J., KIS, J., SÜVEGES, É., TIMÁR, M.: *Environ. Res.* **3**, 187 (1970).
93. HERCZEGH, M., MÁNYAI, S., VÉGH, S.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **41**, 386 (1972).
94. MARKS, P. A.: in Bishop, C., Surgenor, D. M. (Eds.): *The Red Blood Cell*. Academic Press, New York pp. 211 (1964).
95. PONDER, E., YEAGER, J. F.: *Proc. Roy. Soc. B.* **106**, 506 (1930).
96. JACOBS, M. H.: *Ergen. Biol.* **7**, 1 (1931).
97. RIDEAL, E., TAYLOR, F. H.: *Proc. Roy. Soc. B.* **146**, 225 (1956).
98. WILBRANDT, W.: *Arch. ges. Physiol.* **241**, 289 (1938).
99. PONDER, E.: *J. exp. Biol.* **14**, 267 (1937).
100. CASTLE, W. B., DALAND, G. A.: *A. M. A. Arch. intern. Med.* **60**, 949 (1937).
101. CASTLE, W. B., DALAND, G. A.: *Amer. J. Physiol.* **120**, 371 (1937).
102. DAYSON, H., DANIELLI, J. F.: *The Permeability of Natural Membranes*. Cambridge University Press (1952).
103. SMITH, A. V.: *Biological Effects of Freezing and Super-Cooling*. Edward Arnold, London (1962).
104. HOFFMAN, J. F.: *J. Gen. Physiol.* **42**, 9 (1958).
105. SHEPPARD, C. W., BEYL, G. E.: *J. Gen. Physiol.* **34**, 691 (1951).
106. SCHULMAN, J. H., RIDEAL, E.: *Proc. Roy. Soc., B.* **122**, 29, 46 (1937).
107. RUYSSSEN, R.: *cit.* (30)
108. PETHICA, B. A., SCHULMAN, J. H.: *Biochem. J.* **53**, 177 (1953).
109. BANGHAM, A. D., HORNE, R. W.: *Nature* **196**, 952 (1962).
110. GLAUERT, A. M., DINGLE, J. T., LUCY, J. A.: *Nature* **196**, 953 (1962).
111. JUNG, F., SCHWARTZKOPFF, I.: *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **215**, 556 (1952).
112. ASSA, Y., SHANY, S., GESTETNER, B., TENCER, Y., BIRK, Y., BONDI, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 83 (1973).
113. THRON, C. D.: *J. Pharm. exp. Therap.* **145**, 194 (1964).
114. BÜCHI, J., PERLIA, X.: *Arzneim.-Forsch.* **12**, 519 (1962).
115. KONDO, T., TOMIZAWA, M.: *J. pharm. Sci.* **57**, 1246 (1968).
116. PONDER, E.: *J. exp. Biol.* **16**, 38 (1939).
117. RIDEAL, E., TAYLOR, F. H.: *Proc. Roy. Soc., B.* **148**, 450 (1958).
118. SEGAL, R., MILO-GOLDZWEIG, I., SCHUPPER, H., ZAITSCHEK, D. V.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2501 (1970).
119. SCHLÖSSER, E., WULFF, G.: *Z. Naturforsch.* **24 b**, 1284 (1969).
120. DINGLE, J. T., LUCY, J. A.: *Biol. Rev.* **40**, 422 (1965).
121. AZUMA, K., YOSHIZAWA, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 135 (1931).
122. KINSKY, S. C., DEMEL, R. A., VAN DEENEN, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 838 (1967).
123. KINSKY, S. C., LUSE, S. A., ZOPF, D., VAN DEENEN, L. L. M., HAXBY, J.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 844 (1967).
124. KINSKY, S. C., GOTTLIEB, D., SHAW, P.: *Mechanism of Action and Biosynthesis of Antibiotics*. Springer, Heidelberg (1968).
125. COOPER, L. Z., MADOFF, M. A., WEISTEIN, L.: *J. Bact.* **87**, 127 (1964).
126. LOMINSKI, I., ARBUTHNOTT, J. P.: *J. Patho. Bacteriol.* **83**, 515 (1962).
127. JACKSON, A. W., LITTLE, R. M.: *Can. J. Microbiol.* **3**, 47 (1957).
128. BERNHEIMER, A. W.: *J. Gen. Physiol.* **30**, 337 (1947).
129. MARTIN, D. F., PADILLA, G. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 213 (1971).
130. MARTIN, D. F., PADILLA, G. M., HEYL, M. G., BROWN, P. A.: *Toxicol.* **10**, 285 (1972).
131. BINFORD, J. S. jun., MARTIN, D. F., PADILLA, G. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 156 (1973).
132. SCHULTZE, J. A., NAKAMURA, M.: *J. Hyg.* **67**, 163 (1969).
133. COOPER, L. Z., MADOFF, M. A., WEINSTEIN, L.: *J. Bact.* **87**, 136 (1964).

134. MADOFF, M. A., COOPER, L. Z., WEINSTEIN, L.: *J. Bact.* **87**, 145 (1964).
135. ULITZUR, S., SHILO, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 350 (1969).
136. ULITZUR, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 673 (1973).
137. OLDINGS, H. D., LECE, L., LANKISCH, P. G.: *Arch. Pharmacol.* **268**, 27 (1971).
138. LANKISCH, P. G., VOGT, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **270**, 241 (1972).
139. PHILLIPS, G. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 364 (1970).
140. GUL, S., SMITH, A. D.: *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 237 (1972).
141. JACOBI, G., LANKISCH, P. G., SCHONER, K., VOGT, W.: *Arch. Pharmacol.* **274**, 81 (1972).
142. SCHROETER, R., LANKISCH, P. G., LECE, L., VOGT, W.: *Arch. Pharmacol.* **275**, 203 (1972).
143. CONDREA, E.: *Experientia* **30**, 121 (1974).
144. LANKISCH, P. G., VOGT, W.: *Experientia* **27**, 122 (1971).
145. LANKISCH, P. G., DAMERAU, B., VOGT, W.: *Arch. Pharmacol.* **282**, 255 (1974).
146. REED, C. F., SWISHER, S. N.: *J. Clin. Invest.* **45**, 777 (1966).
147. LANGLEY, G. R., FELDERHOF, C. H.: *Blood* **32**, 569 (1968).
148. COOPER, R. A., JANDL, J. H.: *J. Clin. Invest.* **48**, 906 (1969).
149. LANGLEY, G. R., AXEL, M.: *Brit. J. Haematol.* **14**, 593 (1968).
150. WEED, R. I., REED, C. F., MERRILL, E. W.: *J. Clin. Invest.* **48**, 795 (1969).
151. VAN EYS, J., PATTERSON, J. H.: *Brit. J. Haematol.* **24**, 37 (1973).
152. BRAUNSTEINER, H., GISINGER, E., PAKESCH, F.: *Blood* **11**, 753 (1956).
153. ROSSE, W. F., DACIE, J. V.: *J. Clin. Invest.* **45**, 749 (1966).
154. YACHNIN, S.: *J. Clin. Invest.* **44**, 1534 (1965).
155. LAMBERTENGI, G., FERRONE, S., SIRCHIA, G.: *Acta Haemat.* **44**, 257 (1970).
156. SIRCHIA, G., FERRONE, S., MERCURIALI, F.: *Blood* **25**, 502 (1965).
157. SIRCHIA, G., DACIE, J. V.: *Nature* **215**, 747 (1967).
158. HANSEN, N. E.: *Acta Med. Scand.* **184**, 543 (1968).
159. FERRONE, S., MARUBINI, E., MERCURIALI, F., SIRCHIA, G.: *Brit. J. Haematol.* **23**, 5 (1972).
160. PARPART, A. K., LORENZ, P. B., PARPART, E. R., GREGG, J. R., CHASE, A. M.: *J. Clin. Invest.* **24**, 636 (1947).
161. BERNHEIMER, A. W.: *J. Gen. Physiol.* **30**, 337 (1947).
162. SASLOW, G.: *Quart. J. exp. Physiol.* **13**, 329 (1929).
163. SPIRO (1897) cit. (164)
164. ROHONYI, H. von: *Kolloidchemische Beihefte* pp. 394 (1916).
165. BRINKMAN, R., SZENT-GYÖRGYI, A.: *J. Physiol. (Lond.)* **58**, 204 (1923).
166. BOGENDÖRFER, L., HALLE, B.: *Biochem. Z.* **160**, 199 (1925).
167. STARLINGER, W.: *Dtsch. med. Wschr.* **52**, 25 (1926).
168. JULESZ M.: *Magyar Orv. Arch.* **28**, 525 (1927).
169. BAYLISS, L. E.: *J. Physiol. (Lond.)* **59**, 48 (1924).
170. BÁRON, J.: *Arch. ges. Physiol.* **220**, 251 (1928).
171. BÁRON, J.: *Z. exp. Med.* **78**, 353 (1931).
172. JUNG, F.: *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **215**, 568 (1952).
173. SZEKELY, M., MÁNYAI, S., STRAUB, F. B.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **3**, 571 (1952).
174. SCHWACH, G., PASSOV, H.: *Molec. Cell. Biochem.* **2**, 197 (1973).
175. FRISCH, A., GAZITT, Y., LOYTER, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 690 (1973).
176. HUNTER, F. R., BARBER, S. B., CAPUTI, A. B.: *Biol. Bull.* **80**, 69 (1941).
177. HUNTER, F. R., STRINGER, D. L., WEISS, H. D.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **16**, 123 (1940).
178. KREGENOW, F. M.: *J. Gen. Physiol.* **58**, 372, 396 (1971).
179. KREGENOW, F. M.: *J. Gen. Physiol.* **61**, 509 (1973).
180. FLORES, G., FRIEDEN, E.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **174**, 463 (1970).
181. LIVNE, A., KUPER, P. J. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 41 (1973).
182. DOURMASHKIN, R. R., ROSSE, W. F.: *Amer. J. Med.* **41**, 699 (1966).
183. SEEMAN, P., CHENG, D., ILES, G. H.: *J. Cell Biol.* **56**, 519 (1973).
184. SEEMAN, P.: *J. Cell Biol.* **32**, 55 (1967).
185. TILLACK, T. W., KINSKY, S. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 43 (1943).
186. VERKLEIJ, A. J., DE KRUIJFF, B., GERRITSEN, W. F., DEMEL, R. A., VAN DEENEN, L. L. M., VERVERGAERT, P. H. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 577 (1973).
187. LATA, H.: *Blood* **7**, 508 (1952).
188. SHEPPARD, H., TSIEN, W. H., BURGHARDT, C.: *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2215 (1969).
189. MIZUSHIMA, Y., SAKAI, S., YAMAOURA, M.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 227 (1970).
190. FEINSTEIN, M. B., SPERO, L., FELSENFIELD, H.: *FEBS Letters* **6**, 245 (1970).
191. SEEMAN, P., WEINSTEIN, J.: *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1737 (1966).
192. GUTH, P. S., SELINGER, O. Z., AMARO, J., ELMER, L.: *Federation Proc.* **22**, 2780 (1963).
193. JUDAH, J. D. in: Mongar, J. L., De Reuck, A. V. S. (Eds.): *Drugs and Enzymes. CIBA Symposium*, Little Brown, Boston, p. 359 (1962).

194. SPIRITES, M. A., GUTH, P. S.: *Biochem. Pharmacol.* **12**, 37 (1963).
195. SMITH, E. E., WATANABE, C., LOUIE, J., JONES, W. J., HOYT, H., HUNTER, F. E. jun.: *Biochem. Pharmacol.* **13**, 643 (1964).
196. JUDAH, J. D. *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 375 (1961).
197. WEIL-MALHERBE, H., POSNER, H. S.: *Biochem. Pharmacol.* **13**, 685 (1964).
198. VON EULER, U. S., LISHAJKO, F.: *Acta Physiol. Scand.* **52**, 137 (1961).
199. ANDREASEN, F.: *Scand. J. Clin. Invest.* **16**, 503 (1964).
200. SEEMAN, P.: *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1753 (1966).
201. DESPOPOULOS, A.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2907 (1970).
202. KWANT, W. O., VAN STEVENINCK, J.: *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2215 (1968).
203. VAN STEVENINCK, J., GJÖSUND, W. K., BOOIJ, H. L.: *Biochem. Pharmacol.* **16**, 837 (1967).
204. BRAASCH, D.: *Arch. ges. Physiol.* **300**, 185 (1968).
205. KWANT, W. O.: *The Influence of a Tranquilizer (Chlorpromazine) on the Red Cell Membrane.* Drukkerij Bronder-Pffset N. V., Rotterdam (1969).
206. LILLEHEI, R. C., LONGERBEAM, J. K., ROSENBERG, J. C.: in Schock, Pathogenese und Therapie. Springer Verlag, Berlin p. 118 (1962).
207. ROTH, S., SEEMAN, P.: *Nature New Biology* **231**, 284 (1971).
208. METCALFE, J. C., SEEMAN, P., BURGEN, A. S. V.: *Molec. Pharmacol.* **4**, 87 (1968).
209. METCALFE, J. C., BURGEN, A. S. V.: *Nature* **200**, 587 (1968).
210. METCALFE, J. C.: in Cuthbert, A. W. (Ed.): *Calcium and Cellular Function.* MacMillan, London p. 219 (1971).
211. SEEMAN, P., KWANT, W. O., GOLDBERG, M., CHAU-WONG, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 349 (1971).
212. INGLOT, A. D., WOLNA, E.: *Biochem. Pharmacol.* **17**, 269 (1968).
213. HEEDMAN, P. A.: *Exptl. Cell Res.* **14**, 9 (1958).
214. CATANESE, B., LISCIANI, R., PICCINELLI, D.: *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1707 (1969).
215. SEEMAN, P., KWANT, W. O., SAUKS, T., ARGENT, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 490 (1969).
216. SEEMAN, P., SAUKS, T., ARGENT, W., KWANT, W. O.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 476 (1969).
217. RAND, R. P., BURTON, A. C.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **61**, 245 (1963).
218. RAND, R. P.: *Biophys. J.* **4**, 303 (1964).
219. CANHAM, P. B., BURTON, A. C.: *Circulation. Res.* **22**, 405 (1968).
220. SCHNEIDER, H.: *Federation Proc.* **27**, 912 (1968).
221. BALASUBRAMANIAN, D., WETLAUFER, D. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **55**, 762 (1966).
222. KWANT, W. O., SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **193**, 338 (1969).
223. KUPERMAN, A. S., ALTURA, B. T., CHEZAR, J. A.: *Nature* **217**, 673 (1968).
224. SEEMAN, P.: *Intern. Rev. Neurobiol.* **9**, 145 (1966).
225. SHANES, A. M.: *Pharmacol. Rev.* **10**, 59 (1958).
226. DEAMER, D. W., CORNWELL, D. G.: *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 555 (1966).
227. WINS, P., SCHOFFENIELS, E.: *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* **26**, 812 (1969).
228. SEEMAN, P., KWANT, W. O., SAUKS, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 499 (1969).
229. SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 520 (1969).
230. SEEMAN, P., KWANT, W. O.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 512 (1969).
231. SEEMAN, P., BIALY, H. S.: *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1181 (1963).
232. SEEMAN, P.: in Deutsch, E., Gerlach, E., Moser, K. (Eds.): *Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart p. 384 (1968).
233. CHARI-BITRON, A.: *Life Sci.* **10**, II, 1273 (1971).
234. SEEMAN, P., SHA'AFI, R. I., GALEY, W. R., SOLOMON, A. K.: *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 365 (1970).
235. MILLER, L. H., USAMI, S., CHIEN, S.: *J. Clin. Invest.* **50**, 1451 (1971).
236. VAN CASTEL, L. F. J., VAN STEVENINCK, J., DE BRUIJNE, A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 1240 (1973).
237. FREEMAN, A. R., SPIRITES, M. A.: *Biochem. Pharmacol.* **12**, 47 (1963).
238. SEEMAN, P., ROTH, S., SEHNEIDER, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **225**, 117 (1971).
239. SCHNEIDER, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 451 (1968).
240. SEEMAN, P., ROTH, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 171 (1972).
241. MACHLEIDT, H., ROTH, S., SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 178 (1972).
242. ROTH, S., SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 190 (1972).
243. ROTH, S., SEEMAN, P., ÁKERMAN, S. B. A., CHAU-WONG, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 199 (1972).
244. ROTH, S., SEEMAN, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 207 (1972).
245. BURT, D. H., GREEN, J. W.: *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* **225**, 46 (1971).