

## ÜBER DIE ROLLE DER ADENOSINTRIPHOSPHOR- SÄURE (ATP) IN DER K-PERMEABILITÄT DER MENSCHLICHEN ROTEN BLUTKÖRPERCHEN

Von

G. GÁRDOS und F. B. STRAUB

CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 16. Juli 1956)

Im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte sind zahlreiche Mitteilungen erschienen, welche die Lösung der eigenartigen Permeabilitätsprobleme der roten Blutkörperchen vor allem von der biochemischen Seite her zu klären suchten [1, 2, 3, 4]. Auf Grund dieser Forschungen darf man heute bereits behaupten, dass die Permeabilität der roten Blutkörperchen und insbesondere der am meisten untersuchte Ionen-transport mit dem Stoffwechsel der roten Blutkörperchen in engem Zusammenhang und unter seiner regulierenden Wirkung steht.

In früheren Untersuchungen hatten wir uns bereits mit der Frage der K-Permeabilität der roten Blutkörperchen und dem Problem der Beziehungen zwischen dem Ionen-transport und den Stoffwechselprozessen befasst [11, 12, 13, 14]. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über unsere auf den Zusammenhang zwischen dem Adenosintriphosphorsäuregehalt der roten Blutkörperchen und ihrem K-Ionengehalt bezüglichen Versuche, bei denen wir zu der Auffassung gelangten, dass nicht nur die K-Akkumulation, sondern auch der K-Verlust mit den Stoffwechselprozessen in enger Beziehung steht.

### Methoden

Es wurde frisches, defibriniertes menschliches Blut verwendet. Die Versuche nahmen wir teils mit Vollblut, teils mit roten Blutkörperchen vor, die in isotonischer NaCl- bzw. Tyrode-Lösung suspendiert waren.

Die ATP-Bestimmungen wurden aus dem wässrigen Extrakt des mit Azeton hergestellten Bluttrockenpulvers nach der spezifischen viskosimetrischen Methode von KRAMER, PETTKÓ, STRAUB [5] sowie nach Enteiweißen mit Trichloressigsäure durch P-Bestimmung nach FISKE und SUBBAROW ausgeführt [6].

Die P-Bestimmungen in Anwesenheit von Arsenat nahmen wir nach dem von uns modifizierten PETSCHEN Verfahren [7] vor. Im Gegensatz zur PETSCHEN Methode erfolgte die Reduktion von Arsenat zu Arsenit mit  $\text{NaHSO}_3$  bei niedrigerer Temperatur und weniger saurem pH; so kam es zu keinem ATP-Abbau. Die Methode lässt sich bei niedrigerer Arsenat-Konzentration — etwa  $10^{-3} M$  — durchführen. Unter unseren experimentellen Bedingungen nahmen wir die Bestimmung folgendermassen vor: Es wurde 1 ml trichloressigsäures Filtrat

eingemessen, das neben gut messbarer P-Menge  $1,25 \cdot 10^{-3} M$  Arsenat enthielt. Hierzu gaben wir 1 ml 20%iges  $\text{NaHSO}_3$  und inkubierten 60 Minuten bei  $37^\circ C$ . Die Reduktion von Arsenat war währenddessen vollständig beendet. Die Bestimmungen des anorganischen P ( $P_0$ ) und leicht hydrolysierbaren P ( $P_7$ ) wurden hiernach auf übliche Weise nach FISKE und SUBBAROW durchgeführt.

Kalium wurde aus Serum sowie aus Vollblut nach Enteiweißen mit Trichloressigsäure mit dem Flammenphotometer bestimmt.

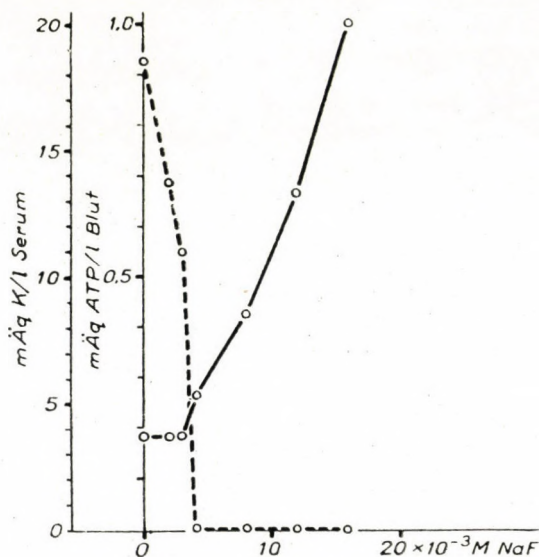


Abb. 1. ATP-Gehalt des menschlichen Blutes und K-Gehalt des Serums nach 120 Minuten Inkubation bei  $37^\circ C$  als Funktion der NaF-Konzentration

—○—○—○— ATP  
 —○—○—○— K

## Ergebnisse

### 1. Wirkung der glykolytischen Inhibitoren; ATP-Abbau

Zu normalem menschlichem Blut gaben wir in verschiedener Konzentration NaF und untersuchten nach Inkubation bei  $37^\circ C$  gleichzeitig die K-Ausströmungsgeschwindigkeit sowie den ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen. Die Resultate sind auf Abb. 1 wiedergegeben.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, war der ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen über der Konzentration  $4 \cdot 10^{-3} M$  NaF nach 120 Minuten bereits völlig abgebaut. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass K-Ausströmung nur dann stattfindet, wenn die roten Blutkörperchen kein ATP mehr enthalten.

Abb. 2 veranschaulicht die Kinetik des ATP-Abbaus und der K-Ausströmung bei verschiedenen NaF-Konzentrationen. Die Abbildung zeigt, dass der

ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen bei den verschiedenen NaF-Konzentrationen über  $4 \cdot 10^{-3} M$  während 50–60 Minuten mit gleicher Geschwindigkeit abgebaut wird. Solange die Zellen ATP enthalten, besteht zwischen dem K-

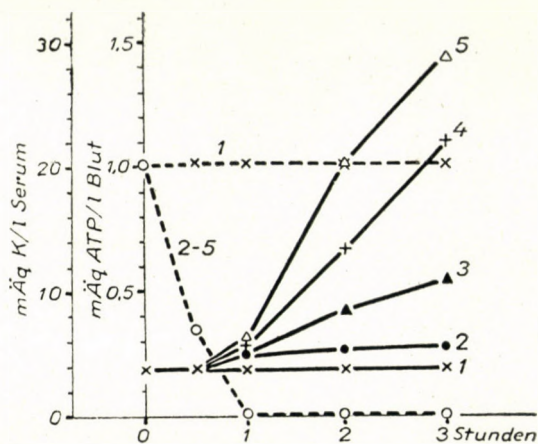


Abb. 2. ATP- und Serum-K-Veränderungen bei verschiedenen NaF-Konzentrationen ( $37^{\circ} C$ ). 1: Kontrolle, 2:  $4 \cdot 10^{-3} M$  NaF, 3:  $8 \cdot 10^{-3} M$  NaF, 4:  $12 \cdot 10^{-3} M$  NaF, 5:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF. Bezeichnung s. Abb. 1

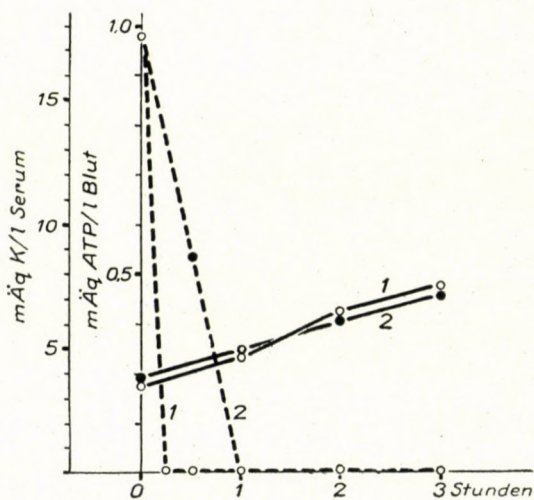


Abb. 3. ATP- und Serum-K-Veränderungen bei  $37^{\circ} C$  in Anwesenheit von MJE und Arsenat. 1:  $10^{-3} M$  MJE +  $2,5 \cdot 10^{-3} M$   $Na_2HAsO_4$ , 2:  $10^{-3} M$  MJE. Bezeichnung s. Abb. 1

Gehalt der roten Blutkörperchen und dem des Serums der physiologische Konzentrationsgradient. Die K-Ausströmung kommt erst nach dem Abbau des ATP, d. h. nach 50–60 Minuten, in Gang. Die Geschwindigkeit der zu diesem Zeitpunkt beginnenden K-Ausströmung ist von der angewandten NaF-Konzentration abhängig. Bei  $4 \cdot 10^{-3} M$  NaF beträgt die Ausströmungsgeschwindigkeit

1,5 mÄq K/l rote Blutkörperchen/Stunde, was mit der physiologischen K-Ausströmungsgeschwindigkeit übereinstimmt [8, 9]. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass die K-Akkumulation in diesem Fall vollständig gehemmt ist, während die Ausströmung mit physiologischer Geschwindigkeit vor sich geht. Bei höherer NaF-Konzentration entspricht jedoch die Ausströmungsgeschwindigkeit bereits dem Mehrfachen des physiologischen Wertes.

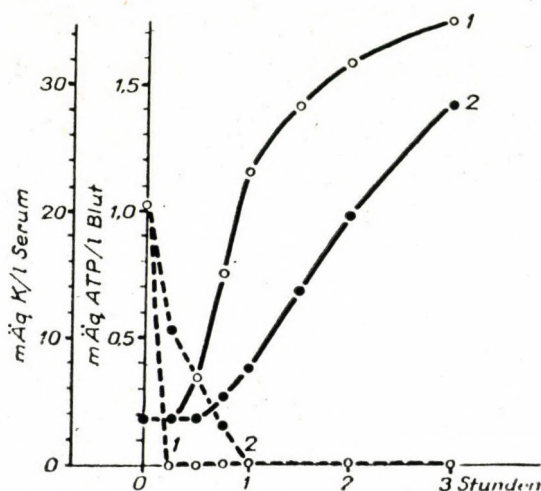


Abb. 4. ATP- und Serum-K-Veränderungen bei 37° C in Anwesenheit von NaF und Arsenat. 1:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF +  $2,5 \cdot 10^{-3} M$   $Na_2HAsO_4$ , 2:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF. Bezeichnung s. Abb. 1

Hemmen wir die Glykolyse der roten Blutkörperchen mit Monojodessigsäure (MJE), wird der ATP-Gehalt mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut wie bei Anwendung von NaF. Die Geschwindigkeit des ATP-Abbaus ist von den benutzten MJE-Konzentrationen ( $5 \cdot 10^{-4}$ – $10^{-2} M$ ) unabhängig. In Anwesenheit von MJE ist indessen nur eine sehr geringe K-Ausströmung feststellbar; ihre Geschwindigkeit betrug bei sämtlichen untersuchten MJE-Konzentrationen 1,5 mÄq K/l rote Blutkörperchen/Stunde. Die bei höheren NaF-Konzentrationen beobachtete umfangreiche K-Ausströmung ist daher bei Anwendung von MJE nicht wahrnehmbar. Die Ergebnisse sind auf Abb. 3 dargestellt.

Geben wir zu normalem menschlichem Blut  $Na_2HAsO_4$  in niedriger Konzentration, ist nach 2–3stündiger Inkubation bei 37° C keinerlei Wirkung festzustellen, da Arsenat die Membran der roten Blutkörperchen nur sehr langsam durchdringt. Gelangt jedoch  $Na_2HAsO_4$  in Anwesenheit von NaF oder MJE zur Anwendung, tritt die Wirkung des Arsenats sofort in Erscheinung. Wie daraus hervorgeht, werden die Permeabilitätsverhältnisse der roten Blutkörperchenmembran durch die angewandten glykolytischen Inhibitoren grundlegend verändert.

Benutzten wir neben NaF auch  $2,5 \cdot 10^{-3} M$   $Na_2HAsO_4$ , wurde der ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen infolge der eintretenden Arsenolyse in sehr kurzer Zeit, während 10 Minuten, abgebaut. Die K-Ausströmung kam dementsprechend bereits nach 10 Minuten in Gang, aber im Vergleich zur Kontrolle mit NaF mit viel grösserer Geschwindigkeit (Abb. 4).

Wird neben MJE auch  $Na_2HAsO_4$  zugegeben, gewinnen wir hinsichtlich des ATP-Abbaus das gleiche Bild wie bei Benutzung von NaF. In diesem Fall ist indessen keine umfangreiche K-Ausströmung festzustellen (Abb. 3).

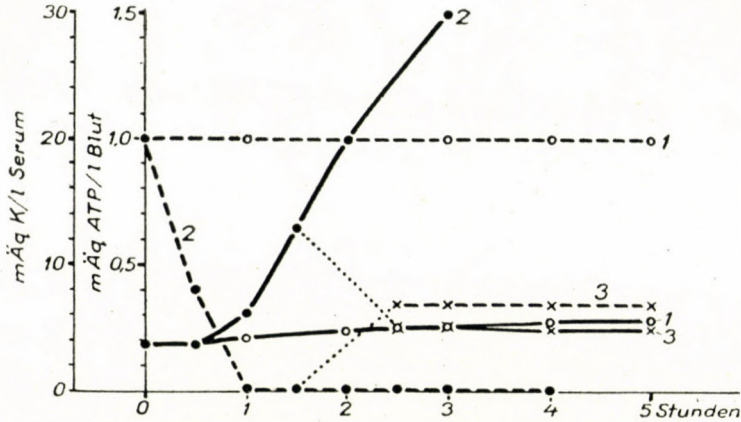


Abb. 5. ATP-Regeneration durch Auswaschen von NaF.  
 1: Kontrolle, 2:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF, 3:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF 1<sup>h</sup> 30' — 2<sup>h</sup> 30' durch mehrmaliges Waschen mit NaCl entfernt, sodann die Zellen in Serum suspendiert. Inkubation bei 37° C. Bezeichnung s. Abb. 1

### 2. ATP-Regeneration

Wird aus dem mit NaF behandelten Blut nach 90 Minuten Inkubation NaF durch Waschen entfernt, kommt die Glykolyse erneut in Gang. In diesem Fall regenerieren 40—50% des ATP-Gehaltes der roten Blutkörperchen, während die K-Ausströmung aufhört (Abb. 5).

Die ATP-Regeneration kann jedoch nicht nur durch Auswaschen von NaF herbeigeführt werden. Geben wir zu dem mit NaF behandelten Blut ein Oxydationsmittel, dessen Redox-Potentialwert höher ist als das Redox-Potential des Cozymase-Systems, ist ebenfalls ATP-Regeneration zu beobachten [10]. In diesem Fall wird nämlich die vermehrte reduzierte Cozymasemenge oxydiert, die zur Funktion der Triosephosphatdehydrogenase erforderliche Cozymase steht zur Verfügung, und es beginnt ein Teil des glykolytischen Prozesses, der die ATP-Synthese herbeiführt. Als derartige Oxydationsmittel benutzten wir Brenztraubensäure,  $NaNO_2$  und Cystin. Einen derartigen Versuch zeigt Abb. 6. Wie ersichtlich, regeneriert der ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen in diesem

Fall zu etwa 50%. Dies entspricht unserer Vorstellung, da ja hier eine der ATP-synthetisierenden Stufen der Glykolyse bei der Phosphobrenztraubensäure gehemmt ist. Da das System in diesem Fall eine beträchtliche Menge ATP enthält, hört die K-Ausströmung sofort auf.

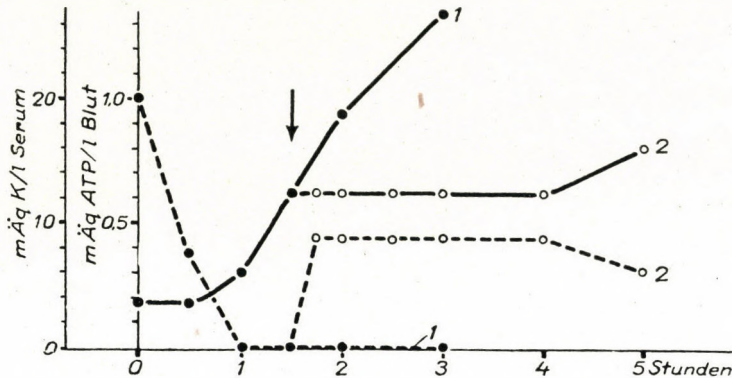


Abb. 6. ATP-Regeneration mit Oxydationsmittel.

1:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF, 2:  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF +  $2 \cdot 10^{-2} M$  Na-Pyruvat (Zusatz bei 1h 30').  
Inkubation bei  $37^\circ C$ . Bezeichnung s. Abb. 1

### 3. Wirkung der Temperatur

Anlässlich der Untersuchung der auf Wirkung von NaF eintretenden K-Ausströmung der roten Blutkörperchen bei verschiedenen Temperaturen gewannen wir folgendes Bild (Abb. 7): Bei niedrigerer Temperatur verlangsamt sich die Ausströmungsgeschwindigkeit des Kaliums erheblich. Es ergibt sich als Temperaturkoeffizient der Ausströmungsgeschwindigkeit  $Q_{10} = 2,3$ . Auch die Geschwindigkeit des ATP-Abbaus verringert sich.

Wir nahmen auch den Versuch vor, den ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen durch 90 Minuten Inkubation mit NaF bei  $37^\circ C$  vollständig abzubauen, wonach wir das ATP-freie Blut in mehrere Fraktionen teilten und bei verschiedenen Temperaturen weiter inkubierten. In der Geschwindigkeit der K-Ausströmung bei verschiedenen Temperaturen zeigten sich auch hier grosse Unterschiede, doch betrug der Temperaturkoeffizient unverändert 2,3.

### Besprechung

Mit vorliegenden Versuchen wollten wir vor allem beweisen, dass der Ionentransport der menschlichen roten Blutkörperchen in beiden Richtungen unter der regulierenden Wirkung konkreter Stoffwechselprozesse steht. Diese unsere Auffassung wird durch die Versuche erhärtet, die wir mit verschiedenen

Inhibitoren — NaF, MJE,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  — vornahmen, aber auch durch die bei der ATP-Regeneration gewonnenen Erfahrungen. Ebenso zeugt die Grösse des Temperaturkoeffizienten für die Richtigkeit unserer Annahme. Auf Grund unserer Ergebnisse können wir behaupten, dass physiologischer K-Austausch nur dann stattfindet, wenn die roten Blutkörperchen ATP enthalten. Verlieren die roten Blutkörperchen ihren ATP-Gehalt, so zieht dies das Aufhören der K-Akkumulation nach sich. Neben den hier mitgeteilten Resultaten wird das auch durch unsere früheren Versuche bestätigt [12, 13]. Der Verlust des ATP-Gehaltes

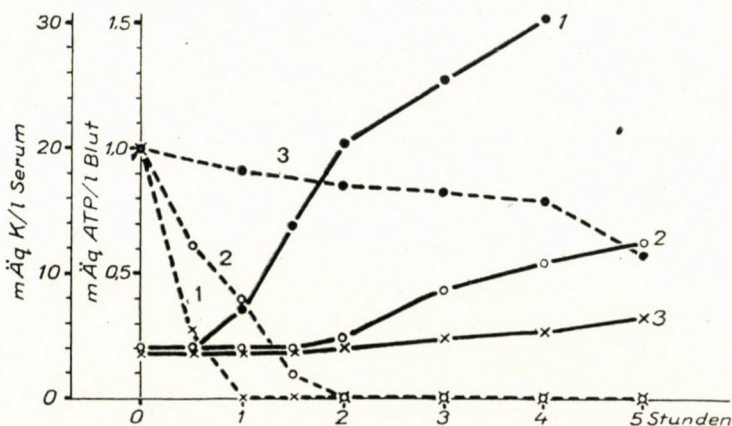


Abb. 7. ATP- und Serum-K-Veränderungen in Anwesenheit von  $16 \cdot 10^{-3} M$  NaF bei verschiedenen Temperaturen.  
1:  $37^\circ C$ , 2:  $25^\circ C$ , 3:  $5^\circ C$ . Bezeichnung s. Abb. 1

bedeutet indessen nicht, dass das Kalium mit sehr grosser Geschwindigkeit aus den roten Blutkörperchen strömt. Die Versuche ergaben, dass die Geschwindigkeit der K-Ausströmung bei Zugabe von  $4 \cdot 10^{-3} M$  NaF sowie in Anwesenheit von MJE — obgleich die roten Blutkörperchen kein ATP mehr enthielten — nicht grösser war als der physiologische Wert  $1,5 \text{ mÄq/l}$  rote Blutkörperchen|Stunde.

Die auf Wirkung der verschiedenen Stoffwechselgifte — NaF in höherer Konzentration,  $\text{NaF} + \text{Na}_2\text{HAsO}_4$  — eintretende rasche K-Ausströmung steht mit den hierbei stattfindenden Stoffwechselprozessen in Zusammenhang. Aus unseren anderen einschlägigen Versuchen geht hervor, dass die K-Ausströmung von der in Anwesenheit von NaF zustande kommenden Stoffwechselverschiebung im Zusammenhang mit dem Abbau des 2,3-Diphosphoglyzerinsäure-Gehaltes der roten Blutkörperchen aktiv hervorgerufen wird [14].

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Der physiologische K-Austausch in den menschlichen roten Blutkörperchen findet solange statt, als die roten Blutkörperchen ATP enthalten.
2. Fehlt ATP, hört die K-Akkumulation in den roten Blutkörperchen auf.
3. Auch die auf Wirkung von NaF und  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  eintretende beträchtliche K-Ausströmung steht mit einem enzymatischen Prozess in Zusammenhang.

## LITERATUR

1. WILBRANDT, W.: Arch. Ges. Physiol. **243**, 519 (1940).
2. DANOWSKI, T. S.: J. Biol. Chem. **139**, 693 (1941).
3. HARRIS, J. E.: J. Biol. Chem. **141**, 579 (1941).
4. ECKEL, R. E.: Federation Proc. **12**, 317 (1953).
5. KRAMER, M., PETTKÓ, E., STRAUB, F. B.: Kísérl. Orvostud. **1**, 114 (1949).
6. FISKE, C. H., SUBBAROW, Y.: J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
7. PETT, L. B.: Biochem. J. **27**, 1672 (1933).
8. RAKER, J. W., TAYLOR, I. M.: J. Gen. Physiol. **33**, 691 (1950).
9. SHEPPARD, C. W., MARTIN, W. R.: J. Gen. Physiol. **33**, 703 (1950).
10. MÁNYAI, S., SZÉKELY, M.: Acta Physiol. Hung. **5**, 7 (1954).
11. STRAUB, F. B.: MTA Orvosi Tud. Oszt. Közl. **3**, 31 (1952).
12. STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **4**, 235 (1953).
13. GÁRDOS, G.: Acta Physiol. Hung. **6**, 191 (1954).
14. GÁRDOS, G.: Acta Physiol. Hung. **10**, 185 (1956).