

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

Phosphat-Permeabilität und Phosphat-Stoffwechsel menschlicher Erythrocyten und Möglichkeiten ihrer experimentellen Beeinflussung*

Von

E. GERLACH, B. DEUTICKE und J. DUHM**

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. März 1964)

Phosphate permeability and phosphate metabolism of human erythrocytes have been studied by determining the rates of phosphate influx and efflux, and by measuring concentrations as well as ^{32}P -labelling of intracellular phosphate compounds under different experimental conditions. The following results were obtained:

Temperature coefficients of phosphate efflux and influx are of similar magnitude (4,0—4,5 between 20° and 37° C). Intracellular orthophosphate seems to be most probably the precursor pool of phosphate ions released from the red cells.

The rates of phosphate influx and efflux are considerably reduced by di-pyridamole, pyrazolidines, phloretin, reserpine, tannic acid et al., the efflux being in general more strongly influenced than the influx. Since under the same conditions glycolysis and concentrations of intracellular P-compounds remain unaltered, the effects observed can only result from a decrease of phosphate permeability caused by the different substances.

Phosphate influx and efflux are enhanced by EDTA, EGTA, ATP, phytic acid, oxalate et al., but not by omission of Ca^{++} from the incubation medium. EDTA and EGTA are ineffective, however, in Ca^{++} -free media. In most cases the enhancement of phosphate transfer is probably due to an increase of the membrane permeability only.

Inhibitors of glycolysis (iodoacetate, fluoride, arsenate et al.) do not primarily affect phosphate influx; phosphate efflux, however, becomes remarkably increased due to the progressive elevation of intracellular orthophosphate levels brought about by these inhibitors. Purine nucleosides (adenosine, inosine, guanosine), which likewise have no influence on phosphate influx, considerably reduce the efflux rates. This effect results from the diminution of intracellular orthophosphate in consequence of its intensified esterification.

Elevation of external orthophosphate levels causes a proportional increase of phosphate influx, thus raising the intracellular orthophosphate concentration and by this again augmenting the efflux of phosphate.

From the results obtained it becomes evident that in human erythrocytes uptake and release of phosphate, which are in principle independent of cellular

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. L. HEILMEYER zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden von Herrn J. DUHM der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. als Dissertation vorgelegt.

energy metabolism, can be experimentally affected either by alterations of membrane permeability or by changes of internal and external orthophosphate concentrations.

Neuere Studien mit Radiophosphor an Kaninchen-Erythrocyten³¹ sowie an menschlichen Erythrocyten^{10,37,41} haben die bereits von HEVESY^{17,20} vertretene Auffassung erhärtet, daß die Aufnahme von Orthophosphat in die Erythrocyten nicht direkt vom Stoffwechsel abhängig ist. Lediglich der Einbau des aufgenommenen Orthophosphats in organische Bindung (= *Inkorporation*) vollzieht sich bei kernlosen Erythrocyten in Abhängigkeit vom — ausschließlich glykolytischen — Stoffwechsel dieser Zellen; denn Glykolysegifte vermögen hier nur diesen Inkorporationsprozeß, nicht aber den Aufnahmevorgang als solchen zu hemmen³¹.

Für eine Unabhängigkeit der Phosphat-Penetration vom Stoffwechsel würde zweifellos auch der Nachweis einer durch bestimmte Substanzen zu erzielenden isolierten Hemmung oder Steigerung dieses Prozesses sprechen. Bisher scheint allerdings ein solcher Nachweis nicht geführt worden zu sein; die wenigen in der Literatur vorliegenden Befunde über eine Beeinflussung von Phosphat-Aufnahme bzw. Phosphat-Turnover in menschlichen Erythrocyten durch Pharmaka und andere Substanzen^{19,25} lassen keine Entscheidung darüber zu, ob die beobachteten Effekte auf Veränderungen der Membranpermeabilität beruhen oder andere Ursachen haben.

Wie andernorts bereits kurz mitgeteilt wurde⁸, läßt sich die Phosphat-Aufnahme in menschliche Erythrocyten durch sehr geringe Mengen der coronardilatierend wirkenden Pyrimidopyrimidin-Verbindung Dipyridamol (2,6-Bis(diäthanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimido(5,4-d)pyrimidin = Persantin®) stark hemmen. Da sich schon bei unseren ersten Versuchen herausstellte, daß Dipyridamol den Erythrocyten-Eigenstoffwechsel nicht nachweisbar beeinflußt, lag die Vermutung nahe, im Dipyridamol über eine Substanz zu verfügen, die — abgesehen von ihrer hemmenden Wirkung auf die Adenosin-Permeabilität der Erythrocyten²³ — auch die Phosphat-Aufnahme in diese Zellen auf Grund einer selektiven Permeabilitätsveränderung reduziert. Es erschien daher zunächst von Interesse, die Wirkung von Dipyridamol auf die Phosphat-Permeabilität menschlicher Erythrocyten genauer zu analysieren. Weiterhin sollte geklärt werden, ob auch andere Stoffe (Pharmaka, Stoffwechsel-Inhibitoren, Purin-Nucleoside) den Durchtritt von Phosphat durch die Erythrocyten-Membran zu reduzieren oder zu steigern vermögen und auf welchen Mechanismen gegebenenfalls derartige Effekte im einzelnen beruhen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde im allgemeinen zunächst der Einfluß der zu prüfenden Substanzen auf die Abgabe (= *Efflux*) von

Radiophosphor aus menschlichen Erythrocyten analysiert. Messungen der Aufnahme (= *Influx*) und Inkorporation von ^{32}P -markiertem Orthophosphat in die Erythrocyten erfolgten nur bei solchen Stoffen, die sich bereits in Efflux-Versuchen als wirksam erwiesen hatten. Da unseres Wissens bisher nur unvollständige Daten über die normale Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten vorliegen, werden einleitend einige Ergebnisse von Studien zu diesem Fragenkomplex mitgeteilt.

Methodik

a) *Zur Bestimmung der Abgabe von Radiophosphor.* Frisch entnommenes menschliches Blut wurde mit reinem Heparin (0,4–0,5 mg/ml Blut) ungerinnbar gemacht und anschließend zentrifugiert (5 min bei $4500 \times g$). Nach Abtrennung von Plasma und Leukocytenschicht wurden die Erythrocyten einmal im dreifachen Volumen einer Phosphat-Locke-Lösung von 20°C gewaschen. Die Phosphat-Locke-Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 9,0 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,24 g CaCl_2 , 0,5 g NaHCO_3 , 0,286 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,031 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g Glucose, Aqua dest. ad 1000 ml; der Orthophosphat-Gehalt dieser Lösung beträgt rund $1\ \mu\text{M}/\text{ml}$, der pH-Wert wurde jeweils mit HCl bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt.

Die gewaschenen Erythrocyten wurden im eigenen heparinisierten Plasma — entsprechend einem normalen Hämatokrit von 45% — resuspendiert. Das Plasma war jeweils mit einer kleinen, empirisch ermittelten Menge von n HCl soweit angesäuert, daß sich nach Zugabe der Erythrocyten innerhalb weniger Minuten ein pH-Wert von 7,3–7,4 einstellte, der über mehr als 60 min konstant blieb. Nach einer Vorperiode von 10 min wurden die Suspensionen zum Zwecke einer für Effluxmessungen ausreichenden Beladung der Erythrocyten jeweils 45 min mit ^{32}P ($5\ \mu\text{C}/\text{ml}$ Suspension*) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze abgekühlt, und die Erythrocyten nach Abtrennung des Plasmas zweimal in einem Überschußvolumen einer Phosphat-Locke-Lösung von 0°C gewaschen, um anhaftende Reste des hochaktiven extracellulären Orthophosphates weitgehend zu entfernen.

Die kalten, mit ^{32}P beladenen Erythrocyten wurden dann — entsprechend einem Hämatokrit von 25% — in einem Gemisch von neun Teilen Phosphat-Locke-Lösung und einem Teil Plasma, aufgeschwemmt (Temperatur 37°C , pH 7,3–7,4). Nach gründlichem Durchmischen wurde diese Erythrocyten-Aufschwemmung in jeweils gleichen Portionen (2–4 ml) auf acht Inkubationsgefäße verteilt, von denen sieben bereits die zu prüfenden Substanzen — in einem Volumen von 0,1 ml gelöst — enthielten; der als Kontrolle dienende achte Ansatz war mit 0,1 ml Locke-Lösung vorbeschießt. Alle Ansätze wurden dann für die Dauer der Efflux-Meßperiode unter gleichmäßigem Schütteln im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Im allgemeinen wurden Messungen der ^{32}P -Abgabe nur während der ersten 30 min der Inkubation vorgenommen, da in dem verwendeten salinen Medium mit Verlängerung der Inkubationszeit eine zunehmende Hämolyse eintrat, die zu einer — die Meßwerte verfälschenden — zusätzlichen Phosphat-Freisetzung

* Die kommerzielle, schwach salzsaure Lösung von trägerfreiem ^{32}P -Orthophosphat (spezifische Aktivität 5–10 mC/ml) wurde vor ihrer Verwendung grundsätzlich mit 0,1 n HCl im Verhältnis von ca. 1:20 verdünnt, mit Orthophosphat ($1\ \mu\text{M}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$) versetzt und dann für 60 min auf 100°C erhitzt. Bei diesem Vorgehen werden die in der trägerfreien Radiophosphor-Lösung häufig enthaltenen, papierchromatographisch nachweisbaren Phosphat-Aggregationen bzw. Polyphosphate in Orthophosphat umgewandelt. Nach der Hydrolyse wurde die Lösung, die den Radiophosphor nur noch als ^{32}P -Orthophosphat enthält, neutralisiert.

führte. Unmittelbar vor Inkubationsbeginn (0-Zeit) sowie in bestimmten Zeitabständen während der Inkubation wurden allen Ansätzen kleine Proben (0,6 bis 0,8 ml) entnommen, rasch auf 0° C gekühlt und sofort in der Kälte abzentrifugiert. In einem Aliquot des Überstandes erfolgte nach Verdünnung die Messung der Radioaktivität durch Scintillationszählung unter Verwendung eines β -empfindlichen Bohrlochkristalles. Aus den erhaltenen Werten wurde durch Subtraktion der entsprechenden 0-Zeit-Aktivität die tatsächliche Radioaktivitätszunahme in der extracellulären Lösung berechnet, die ein relatives Maß der Phosphat-Abgabe darstellt.

b) Zur Bestimmung der Aufnahme und Inkorporation von Radiophosphor. Gewinnung, Waschung und Resuspension der Erythrocyten im eigenen Plasma bzw. in einer Plasma-haltigen Phosphat-Locke-Lösung, sowie die pH-Einstellung erfolgten wie oben beschrieben. Dann wurden die Erythrocyten-Suspensionen im allgemeinen für insgesamt 45 min unter gleichmäßigem Schütteln im Wasserbad bei 37° C inkubiert (pH 7,4). 15 min nach Beginn der Inkubation wurden den Ansätzen die zu prüfenden Substanzen als wäßrige Lösung in einem kleinen Volumen zugesetzt. Nach weiteren 15 min erfolgte die Zugabe von ^{32}P (5 $\mu\text{C}/\text{ml}$ Suspension, Vorbehandlung des Radiophosphors vgl. Fußnote S. 245). In jeder Versuchsreihe wurden Kontrollen in analoger Weise mitinkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Erythrocyten-Suspensionen rasch abgekühlt, zentrifugiert, und die Erythrocyten nach Abtrennung des Plasmas zweimal in einem großen Volumen einer Phosphat-haltigen, einmal mit einer kleineren Menge Phosphat-freier Locke-Lösung von 0° C gewaschen. Anschließend erfolgte die Extraktion der Erythrocyten mit dem doppelten Volumen einer 0,6 n HClO_4 in der Kälte. Nach Neutralisierung der Extrakte wurden die säurelöslichen Phosphor-Verbindungen (Orthophosphat, ATP, ADP, AMP, IMP, DPGS, HDP)* durch zweidimensionale Papierchromatographie im wesentlichen mittels bereits früher beschriebener Verfahren¹⁰ getrennt und ihre Konzentrationen durch Phosphor-Analysen nach einer neuen Arbeitsweise⁹ bestimmt. Die Radioaktivität der hierbei anfallenden Flüssigkeitsproben wurde ebenfalls durch Scintillationszählung unter Verwendung eines β -Bohrlochkristalles gemessen. Aus den Konzentrations- und Radioaktivitätswerten wurde für jede Verbindung die relative spezifische Aktivität = RSA (bezogen auf die jeweilige spezifische Aktivität des Plasma-Orthophosphats) berechnet.

Ergebnisse

A. Einige Charakteristica der Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten

Eine erste Versuchsreihe galt der Analyse des Prozesses der normalen ^{32}P -Abgabe aus menschlichen Erythrocyten, wie er bei Inkubation der mit Radiophosphor vorbeladenen Zellen in einer Plasma-haltigen Phosphat-Locke-Lösung beobachtet wird. In Abb. 1 ist der Verlauf des ^{32}P -Efflux während 30 min Inkubation bei 37°, 27° und 20° C dargestellt. Es zeigt sich erwartungsgemäß, daß die ^{32}P -Abgabe ein stark Temperatur-abhängiger Vorgang ist; die mittleren Temperatur-Faktoren (Q_{10} -Werte)

* Verwendete Abkürzungen: ATP, ADP und AMP = Adenosin-tri-, -di- und -monophosphat; IMP = Inosinmonophosphat; DPGS = 2,3-Diphosphoglycerinsäure; HDP = Hexose-1,6-diphosphat; EDTA = Äthylendiamintetraacetat (Di-Na-Salz); EGTA = Äthylenglykol-(bis)diäthanolaminotetraacetat.

betragen — unseren Versuchen zufolge — für den Bereich von 27° bis 37° C bzw. 20°—27° C durchschnittlich 4,0 bzw. 4,5, entsprechend einer Aktivierungsenergie von 25000 bzw. 26000 cal/mol. Diese Werte liegen in derselben Größenordnung, wie die von uns unter vergleichbaren Versuchsbedingungen bestimmten Daten für die Phosphat-Aufnahme menschlicher Erythrocyten. Ähnliche Werte wurden übrigens neuerdings auch für die ^{32}P -Abgabe aus Hunde-Erythrocyten gemessen¹³. Die hohe Temperaturabhängigkeit des ^{32}P -Efflux spricht dafür, daß die Orthophosphat-Abgabe aus Erythrocyten ebensowenig den Gesetzen der freien Diffusion gehorcht wie die Phosphat-Aufnahme in diese Zellen.

Um zu klären, welchen intracellulären Phosphat-Fractionen das in die Extracellulärlösung abgegebene Orthophosphat entstammt und worauf der nicht-lineare Kurvenverlauf des ^{32}P -Efflux beruht, wurden in ergänzenden Experimenten Messungen der ^{32}P -Abgabe mit Analysen der gleichzeitig erfolgenden Aktivitätsänderungen intraerythrocytärer Phosphat-Verbindungen kombiniert. In Tab.1 sind Resultate eines typischen Versuches dieser Art zusammengefaßt. Wie aus den Daten zunächst ersichtlich wird, kommt es im Verlauf einer Efflux-Meßperiode von 20 min weder zu nachweisbaren Konzentrationsveränderungen der dominierenden intracellulären P-Fractionen (Orthophosphat, ATP, DPGS), noch zu Veränderungen des extracellulären Orthophosphat-Spiegels, so daß Nettoverschiebungen von Phosphat unter diesen Bedingungen ausgeschlossen sind. Vergleicht man die nach verschiedenen Zeiten gemessenen Gesamtaktivitätsraten der einzelnen Fractionen (berechnet pro Gramm Erythrocyten), so werden hier beträchtliche Veränderungen deutlich: Die anfänglich sehr hohe ^{32}P -Aktivität der ATP-Fraktion nimmt progredient ab, und zwar interessanterweise jeweils um etwa den gleichen Betrag, um den die — initial noch verhältnismäßig geringe — Radioaktivität der DPGS ansteigt. Die Summe der in beiden Fractionen vorhandenen Radioaktivitäten vermindert sich nur geringfügig.

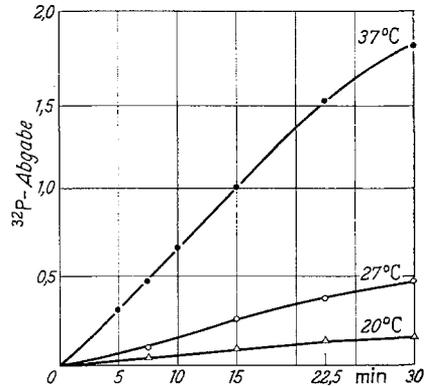


Abb. 1. Einfluß der Temperatur auf die ^{32}P -Abgabe menschlicher Erythrocyten während 30 min Inkubation in einem Phosphat-Locke-Plasma-Medium. Effluxmessungen nach 45 min Vorbeladung der Erythrocyten mit ^{32}P bei 37° C und anschließender zweimaliger Waschung mit Phosphat-Locke-Lösung bei 0° C. ^{32}P -Abgabe in relativen Einheiten, bezogen auf die nach 15 min Inkubation bei 37° C im extracellulären Medium vorhandene ^{32}P -Aktivität. (Weitere Einzelheiten vgl. Methodik)

Tabelle 1. Konzentrationen ($\mu\text{M/g}$) und Gesamtaktivitäten (Imp/min/g Erythrocyten) von ATP, DPGS, intracellulärem (i) und extracellulärem (e) Orthophosphat während einer Efflux-Meßperiode von 20 min

	0 min		10 min		20 min	
	Konzentration	Gesamtaktivität	Konzentration	Gesamtaktivität	Konzentration	Gesamtaktivität
ATP	1,22	144 000	1,20	124 000	1,24	112 000
DPGS	4,75	43 000	4,54	62 000	4,54	72 500
Orthophosphat _(i)	0,81	50 000	0,75	43 000	0,84	37 200
Orthophosphat _(e)	1,09	0	1,05	7 900	1,10	14 400
Σ Gesamtaktivitäten		237 000		236 900		236 100

Diese gegenläufigen Aktivitätsveränderungen der beiden dominierenden organischen P-Fractionen (ATP und DPGS), die auch von ZI-PURSKY et al.⁴² beobachtet wurden, sind unseres Erachtens auf Glykolyse-abhängige interfraktionelle Verschiebungen von Radiophosphor zwischen diesen beiden Verbindungen zurückzuführen. Dabei dürfte von ausschlaggebender Bedeutung sein, daß sich — wie bereits früher nachgewiesen¹⁰ — der relativ kleine „ATP-pool“ mit hoher Geschwindigkeit, der außerordentlich große „DPGS-pool“ dagegen nur mit geringer Geschwindigkeit umsetzt.

Parallel zu den Verschiebungen von ³²P zwischen ATP und DPGS vermindert sich die Aktivität der intracellulären Orthophosphat-Fraktion um einen Betrag, der rund 90% der Aktivitätszunahme des extracellulären Orthophosphats ausmacht. Die restlichen 10% der extracellulären Radioaktivität werden bilanzmäßig durch eine entsprechende Verminderung der Gesamtaktivität der beiden organischen Hauptfraktionen gedeckt. Da jedoch in den Erythrocyten energieverbrauchende Reaktionen ablaufen, bei denen ständig Orthophosphat aus energiereichen organischen Bindungen freigesetzt wird, darf man annehmen, daß die — scheinbar organischen Verbindungen entstammenden — 10% des abgegebenen Radiophosphors bereits vor ihrem Durchtritt durch die Erythrocyten-Membran als Orthophosphat vorgelegen haben. *Es läßt sich somit aus den vorliegenden Befunden folgern, daß die intracelluläre Orthophosphat-Fraktion unmittelbarer Vorläufer des aus den Erythrocyten austretenden Phosphats ist.*

Aus den in Tab.1 zusammengestellten Daten erklärt sich auch ohne Schwierigkeit die nicht-lineare Kinetik des ³²P-Efflux. Da nämlich die Gesamtaktivität der Orthophosphat-Fraktion — ebenso wie ihre spezifische Aktivität — als Folge des Austausches mit extracellulärem ³¹P-Orthophosphat exponentiell abfällt, und das intracelluläre Orthophosphat — wie oben dargelegt — als alleiniger Vorläufer für den ab-

gegebenen Radiophosphor anzusehen ist, muß selbstverständlich mit der Inkubationsdauer die ^{32}P -Abgabe immer geringer werden, obwohl die Phosphat-Austauschrates konstant bleibt.

B. Phosphat-Permeabilität menschlicher Erythrocyten unter dem Einfluß von Dipyridamol

1. Phosphat-Abgabe. Inkubiert man ^{32}P -vorbeladene menschliche Erythrocyten unter Zusatz von Dipyridamol, so läßt sich eine — von der Dipyridamol-Konzentration abhängige — Reduktion der Phosphat-Abgabe feststellen. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, wird eine Verminderung

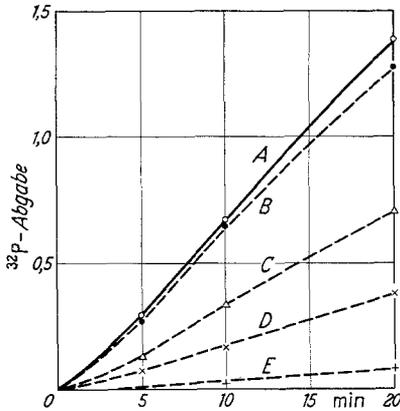


Abb. 2

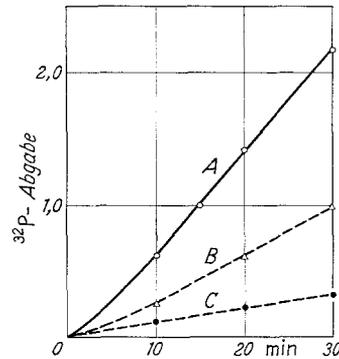


Abb. 3

Abb. 2. Einfluß von Dipyridamol auf den ^{32}P -Efflux menschlicher Erythrocyten bei 37°C . A Kontrolle; B—E Dipyridamol in verschiedenen Konzentrationen; B 10^{-6} mol/l; C $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l; D 10^{-5} mol/l; E $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. ^{32}P -Abgabe in relativen Einheiten, bezogen auf die nach 15 min Inkubation im Medium der Kontrollen vorhandene Radioaktivität

Abb. 3. ^{32}P -Abgabe von Taubenerythrocyten bei 37°C unter dem Einfluß von Dipyridamol. A Kontrolle; B Dipyridamol 10^{-5} mol/l; C Dipyridamol 10^{-4} mol/l

bereits bei einer Dipyridamol-Konzentration von 10^{-6} mol/l deutlich; in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l verursacht Dipyridamol ein fast vollständiges Sistieren der Phosphat-Abgabe. Diese Wirkung von Dipyridamol setzt sehr rasch ein und hält längere Zeit an. Schon bei der frühest möglichen ^{32}P -Efflux-Messung nach 5 min Inkubation ist die jeweilige Hemmung ebenso stark wie nach Inkubationszeiten von 10 und 20 min; in anderen Experimenten war sogar nach 150 min Inkubation noch eine unverminderte Reduktion des ^{32}P -Efflux nachweisbar, unabhängig von der zu diesem Zeitpunkt vorhandenen leichten Hämolyse.

Dipyridamol hemmt die Phosphat-Abgabe nicht nur bei kernlosen Menschen-Erythrocyten, sondern in fast gleichem Maße auch bei kern-

haltigen Tauben-Erythrocyten (vgl. Abb.3). Offensichtlich ist also die Wirkung von Dipyridamol nicht nur auf Erythrocyten mit rein glykolytischem Stoffwechsel beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf Erythrocyten, die ihre Energie ausschließlich aus oxydativen Stoffumsetzungen gewinnen. Diese Befunde lassen sich am einfachsten mit der Annahme deuten, daß Dipyridamol die Phosphat-Permeabilität der Erythrocyten-Membran unabhängig vom Energiestoffwechsel dieser Zellen reduziert.

2. Phosphat-Aufnahme. Weitere Untersuchungen galten der Analyse des Einflusses von Dipyridamol auf den Prozeß der Phosphat-Aufnahme und -Inkorporation an menschlichen Erythrocyten, wobei aus Gründen besserer Vergleichbarkeit die Inkubationsbedingungen in allen Einzelheiten denen der Efflux-Versuche entsprachen. Wie aus Tab.2a ersichtlich wird, sind bei 30 min Inkubation der Erythrocyten mit Dipyridamol (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) keine Veränderungen der Konzentrationen intraerythrocytärer Phosphor-Verbindungen nachweisbar. Auch höhere Konzentrationen von Dipyridamol, die wegen der geringen Löslichkeit dieses Stoffes bei pH 7,4 nur in einer Inkubationslösung von pH 6,3 geprüft wurden, beeinflussen nicht die für diese H^+ -Ionen-Konzentration charakteristische Verteilung säurelöslicher P-Verbindungen.

Im Gegensatz zur Konstanz der Konzentrationswerte sind jedoch die ^{32}P -Aktivitäten (RSA-Werte) — in Abhängigkeit von der Dipyridamol-Konzentration — vermindert, und zwar interessanterweise bei allen analysierten Phosphor-Fractionen in gleichem Maße wie in der Gesamtfraction des säurelöslichen Phosphors (vgl. Tab.2b)*. Eine derart gleichmäßige Reduktion der ^{32}P -Aktivität von intracellulärem Orthophosphat und von organischen P-Fractionen bei konstant bleibenden Konzentrationen dieser Verbindungen kann nur darauf beruhen, daß Dipyridamol den primären Prozeß der Phosphat-Aufnahme hemmt; hieraus müssen dann sekundär jeweils gleiche Verminderungen der Inkorporationsraten resultieren. Keinesfalls ist aber die gleichmäßig Reduktion aller ^{32}P -Aktivitätswerte als Ausdruck einer direkten Wirkung

* Die RSA-Werte der Gesamtfraction des säurelöslichen Phosphors stellen ein relatives Maß für die Phosphat-Aufnahme in die Erythrocyten dar. Bei vergleichenden Untersuchungen kann selbstverständlich aus Änderungen der RSA-Werte des säurelöslichen Phosphors auf entsprechende Veränderungen der Phosphat-Aufnahme nur dann geschlossen werden, wenn die Konzentration dieser Fraction konstant bleibt; andernfalls muß aus Konzentrations- und RSA-Werten die absolut aufgenommene Phosphat-Menge errechnet werden. [Einzelheiten der Berechnung vgl. Pfügers Arch. ges. Physiol. **266**, 547 (1958).] Prinzipiell das gleiche gilt natürlich auch bei Verwendung der relativen spezifischen Aktivitätswerte organischer P-Verbindungen als Maß für die jeweils inkorporierten Phosphat-Mengen.

Tabelle 2a. Konzentrationen säurelöslicher Phosphor-Verbindungen in Menschen-Erythrocyten nach 30 min Inkubation mit Dipyridamol bei 37° C

Konzentrationsangaben in $\mu\text{M/g}$ Erythrocyten und in Prozent vom gesamt-säurelöslichen Phosphor

	Ges.-säurelöslicher Phosphor $\mu\text{MP/g}$	Orthophosphat		ATP		ADP		DPGS	
		$\mu\text{M/g}$	%	$\mu\text{M/g}$	%	$\mu\text{M/g}$	%	$\mu\text{M/g}$	%
Kontrollen	16,38	0,80	4,9	1,15	21,0	0,25	3,0	4,32	52,6
Dipyridamol $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l	16,60	0,87	5,2	1,10	20,0	0,26	3,1	4,50	55,0
Dipyridamol $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	16,20	0,78	4,8	1,22	22,6	0,20	2,5	4,20	52,0
Dipyridamol $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l	16,70	0,80	4,8	1,20	21,5	0,24	2,9	4,10	49,0

Tabelle 2b. Aufnahme und Inkorporation von ^{32}P -Orthophosphat in säurelösliche Phosphor-Verbindungen menschlicher Erythrocyten bei Inkubation mit Dipyridamol
Inkubationszeit 30 min, nach 15 min ^{32}P -Zugabe; Temperatur 37° C; RSA = relative spezifische Aktivität

	Ges.-säurelöslicher Phosphor		Orthophosphat		ATP		DPGS	
	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %
Kontrollen	0,98	—	3,64	—	2,23	—	0,27	—
Dipyridamol $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l	0,38	61	0,90	65	0,70	68	0,10	63
Dipyridamol $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	0,54	45	1,93	47	1,22	45	0,16	41
Dipyridamol $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l	0,63	35	2,29	36	1,48	36	0,18	33

von Dipyridamol auf den glykolytischen Stoffwechsel der Erythrocyten anzusehen; denn wäre dies der Fall, so müßten bei den einzelnen P-Fractionen neben Konzentrationsverschiebungen vor allem unterschiedlich starke Veränderungen der ^{32}P -Aktivitäten erfolgen, wie dies z. B. bei Monojodacetat-vergifteten menschlichen Erythrocyten beobachtet wird¹¹. Gegen eine Beeinträchtigung des glykolytischen Stoffwechsels durch Dipyridamol spricht auch die Tatsache, daß — eigenen Befunden zufolge — die Lactat-Bildung, nach Ergebnissen von Koss (persönliche Mitteilung) auch der Glucose-Verbrauch der Erythrocyten unverändert bleiben. Aus den bisher mitgeteilten Resultaten kann man somit schließen, daß Dipyridamol tatsächlich isoliert die Permeation von

Orthophosphat durch die Erythrocyten-Membran in beiden Richtungen einschränkt oder sogar vollständig blockiert.

Vergleicht man nun die Effekte gleicher Dipyridamol-Konzentrationen auf Phosphat-Aufnahme und -Abgabe, so zeigt sich interessanterweise, daß beide Prozesse in unterschiedlichem Maße beeinflusst werden: Wie aus den in Abb.4 dargestellten Dosiswirkungs-Kurven zu ersehen ist, wird nämlich der Phosphat-Efflux jeweils weit stärker

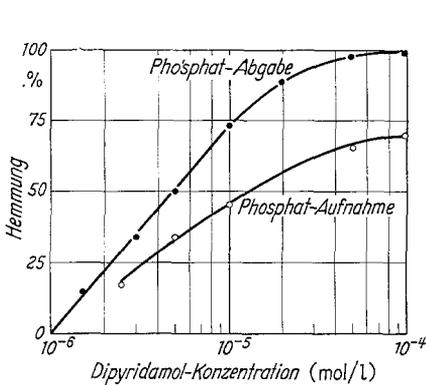


Abb. 4

Abb. 4. *Unterschiedliche Hemmung von Phosphat-Aufnahme und -Abgabe durch Dipyridamol (Dosiswirkungskurven).* Messungen des ^{32}P -Influx und -Efflux bei 37°C unter gleichen Inkubationsbedingungen

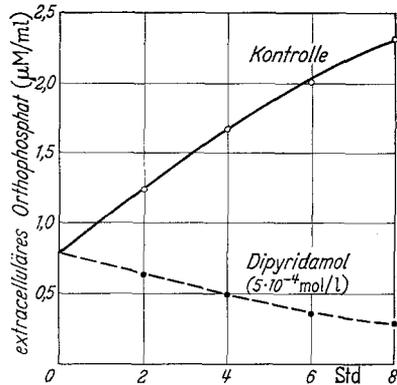


Abb. 5

Abb. 5. *Konzentrationen des extracellulären Orthophosphats während 8 Std Inkubation menschlicher Erythrocyten mit und ohne Dipyridamol.* Inkubation in Plasma (Hämatokrit 50%) bei 37°C und pH 7,4 unter Zusatz von 200 mg-% Glucose zu Versuchsbeginn. Die Verminderung des extracellulären Phosphatgehalts in Gegenwart von Dipyridamol beruht auf der unterschiedlich starken Hemmung von Phosphat-Abgabe und -Aufnahme

gehemmt als der Phosphat-Influx. So verursacht Dipyridamol in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l eine vollständige Blockierung der Phosphat-Abgabe, dagegen nur eine 65%ige Reduktion der Phosphat-Aufnahme. Bei Dipyridamol-Konzentrationen zwischen 10^{-6} und $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l verhalten sich die Hemmungsintensitäten annähernd konstant wie 3:2. Eine Erhöhung der Dipyridamol-Konzentration über 10^{-4} mol/l führt zu keiner stärkeren Phosphat-Aufnahme-Hemmung, da hierbei die — vom pH-Wert abhängige — Grenze der Löslichkeit von Dipyridamol überschritten wird. Verbessert man allerdings die Löslichkeit durch Senkung des pH-Wertes der Inkubationslösung auf 6,3, so läßt sich mit Dipyridamol-Konzentrationen zwischen 10^{-4} und 10^{-3} mol/l auch die Aufnahme von Phosphat nahezu vollständig blockieren.

3. Dipyridamol-Effekte bei längerer Inkubation. Die unterschiedliche Beeinflussung der Phosphat-Abgabe und -Aufnahme ließ vermuten, daß bei längerer Inkubation mit Dipyridamol mehr Orthophosphat von den

Erythrocyten aufgenommen als abgegeben wird, woraus zwangsläufig eine Verminderung der extracellulären Orthophosphat-Konzentration resultieren müßte. Tatsächlich konnte diese Vermutung durch spezielle Experimente bestätigt werden, bei denen die Erythrocyten im eigenen Plasma (Hämatokrit 50%) unter Zusatz von 200 mg-% Glucose für 6—8 Std mit und ohne Dipyridamol inkubiert wurden. Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, sinkt der extracelluläre Orthophosphat-Spiegel in den Dipyridamol-haltigen Erythrocyten-Suspensionen von 0,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ bei Inkubationsbeginn kontinuierlich auf 0,3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ nach 8 Std. Im Gegensatz dazu nimmt in den jeweiligen Kontrollansätzen während dieser Zeit der extracelluläre Orthophosphat-Gehalt sogar erheblich zu. Dieser extracelluläre Orthophosphat-Anstieg ist zum Teil bedingt durch die progrediente Konzentrationserhöhung des intracellulären Orthophosphats (vgl. Tab. 3 und Abschnitt C3 der Ergebnisse); außerdem dürfte er aber Folge der — mit der Inkubationsdauer sich verstärkenden — Hämolyse sein, die in unseren Versuchen nach 8 Std etwa 3—5% ausmachte. Da die Hämolyse in Anwesenheit von Dipyridamol das gleiche Ausmaß erreichte, vermindert sich der extracelluläre Orthophosphat-Gehalt in diesen Ansätzen nicht nur um 0,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$, sondern de facto — im Vergleich zu den Kontrollen — um ca. 1,9 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Tabelle 3. Konzentrationen ($\mu\text{M}/\text{g}$) von Orthophosphat, ATP und DPGS in menschlichen Erythrocyten während mehrstündiger Inkubation ohne und mit Dipyridamol ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)

Inkubationszeit (Std)	ohne Dipyridamol			mit Dipyridamol		
	Ortho- phosphat	ATP	DPGS	Ortho- phosphat	ATP	DPGS
0	0,59	1,44	3,82	0,51	1,43	3,94
2	0,71	1,39	3,58	0,50	1,45	4,05
6	1,04	1,45	2,90	0,59	1,40	3,96

In den Experimenten mit längeren Inkubationszeiten wurde neben den Veränderungen des extracellulären Orthophosphats auch das Konzentrationsverhalten einiger wichtiger intracellulärer P-Fractionen analysiert (vgl. Tab. 3). Dabei zeigt sich in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren²⁷, daß in normalen Erythrocyten während 6stündiger Inkubation der ATP-Gehalt unverändert bleibt, die DPGS-Konzentration dagegen progredient abfällt, während das intracelluläre Orthophosphat beträchtlich zunimmt. Interessanterweise treten diese Konzentrationsveränderungen von DPGS und intracellulärem Orthophosphat bei gleich langer Inkubation der Erythrocyten in Gegenwart von Dipyridamol nicht ein. Eine Erklärung dieser speziellen Befunde ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich; insbesondere muß die Frage offenbleiben,

ob die Konstanz der DPGS-Konzentration in irgendeinem Zusammenhang mit der — während der ganzen Inkubationszeit unverändert anhaltenden — Reduktion der Phosphat-Permeabilität steht.

4. Art und Reversibilität der Dipyridamol-Wirkung. In ergänzenden Experimenten sollte geprüft werden, wie die Wirkung von Dipyridamol auf den Prozeß der Phosphat-Aufnahme durch steigende extracelluläre Orthophosphat-Konzentrationen ($1-20 \mu\text{M}/\text{ml}$) beeinflusst

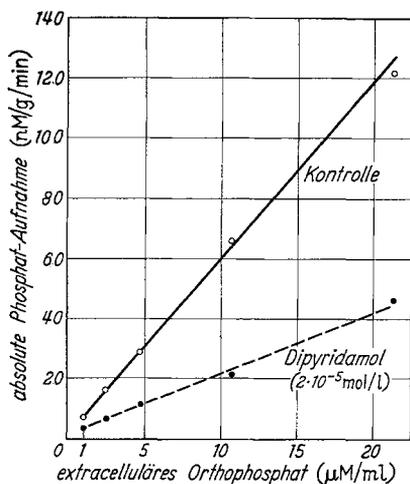


Abb. 6

Abb. 6. Einfluß von Dipyridamol auf die Phosphat-Aufnahme menschlicher Erythrocyten bei erhöhten extracellulären Orthophosphatkonzentrationen. Zwischen 1 und $20 \mu\text{M}$ Orthophosphat/ml bleibt die Phosphat-Aufnahme-Hemmung praktisch konstant. Berechnung der absolut aufgenommenen Phosphatmengen aus RSA- und Konzentrationswerten des säurelöslichen Phosphors

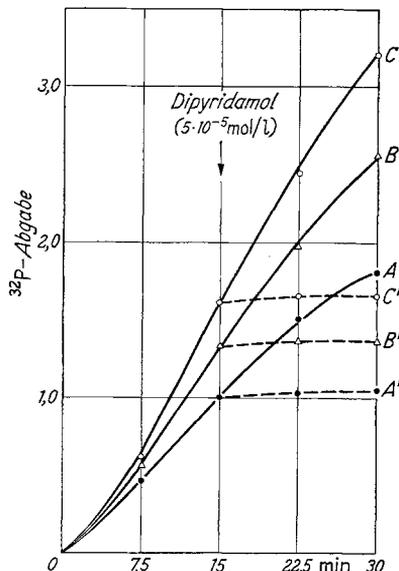


Abb. 7

Abb. 7. Steigerung der ^{32}P -Abgabe aus menschlichen Erythrocyten bei Einwirkung von Glykolyse-inhibitoren. A Kontrolle; B Na-Fluorid (10^{-2} mol/l); C Monojodacetat ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$). In jeweiligen Parallelansätzen (A' , B' , C') erfolgte nach 15 min Zugabe von Dipyridamol; hierdurch wird der ^{32}P -Efflux vollständig blockiert. (Vorbeladung der Erythrocyten mit ^{32}P in Abwesenheit der Hemmstoffe; ^{32}P -Abgabe in relativen Einheiten, bezogen auf die extracelluläre ^{32}P -Aktivität der Kontrollen nach 15 min Inkubation)

wird. Abb. 6 zeigt, daß unter derartigen Bedingungen keine Abschwächung der Wirkungsintensität von Dipyridamol eintritt; eher werden die Effekte durch Phosphat-Konzentrationen $> 5 \mu\text{M}/\text{ml}$ noch verstärkt. Zwar kann durch diese Resultate nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß der Dipyridamol-Wirkung auf den Phosphat-Influx ein Substrat-kompetitiver Hemmungsmechanismus zugrunde liegt, doch dürfte dies wenig wahrscheinlich sein.

Das gleiche gilt vermutlich auch für den Prozeß der Phosphat-Abgabe. Wird nämlich Jodacetat- bzw. Fluorid-vergifteten Erythrocyten, deren intracellulärer

Orthophosphat-Gehalt stark erhöht ist, während einer Efflux-Meßperiode Dipyridamol in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l zugesetzt, so kommt es bei diesen vergifteten Erythrocyten zu einer gleichstarken Hemmung des Phosphat-Ausstroms wie bei normalen Zellen (vgl. Abb. 7). Die Wirkung von Dipyridamol auf die Phosphat-Abgabe erweist sich somit auch als unabhängig von der jeweiligen intraerythrocytären Orthophosphat-Konzentration.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Dipyridamol-bedingte Hemmung der Phosphat-Aufnahme reversibel ist, wurden mit Dipyridamol vorbehandelte Erythrocyten zweimal mit einem Überschuß-Volumen einer Phosphat-Locke-Lösung gewaschen und erst anschließend in üblicher Weise mit ^{32}P inkubiert. Bei diesem Vorgehen ließ sich nur eine etwa 50%ige Reversibilität der Dipyridamol-Wirkung erzielen (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4. Partielle Reversibilität der Dipyridamol-Wirkung auf die ^{32}P -Aufnahme menschlicher Erythrocyten

RSA = relative spezifische Aktivität

Vorinkubation (15 min)	Washung (2mal Phosphat- Locke-Lösung)	^{32}P -Inkubation (15 min)	RSA Ges.-säurelös. Phosphor	Hemmung %
ohne Dipyridamol (Kontrollen)			0,83	—
mit Dipyridamol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l)			0,19	77
mit Dipyridamol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l)	ohne Dipyridamol		0,51	38

Diese Beobachtung spricht dafür, daß Dipyridamol zum Teil relativ fest an die Erythrocyten bzw. die Membranen dieser Zellen gebunden wird; denn die Waschvolumina waren so bemessen, daß bei freier Verteilung von Dipyridamol die nach der Washung noch vorhandene Konzentration dieses Stoffes kleiner als 10^{-6} mol/l und damit unwirksam hätte sein müssen.

C. Phosphat-Permeabilität menschlicher Erythrocyten unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka, Stoffwechsellinhibitoren und Substrate

Dipyridamol ist nicht die einzige Substanz, die den Prozeß der Permeation von Phosphat an menschlichen Erythrocyten beeinflusst. Bei Prüfung einer großen Reihe von pharmakologisch aktiven Stoffen und anderen Verbindungen fand sich nämlich eine Anzahl weiterer wirksamer Substanzen, deren — teilweise sehr unterschiedliche — Effekte auf die Phosphat-Abgabe und -Aufnahme genauer untersucht wurden.

1. Hemmung von Phosphat-Abgabe und -Aufnahme. Tab. 5 gibt eine Übersicht über die zu verschiedenen organischen Stoffklassen gehörenden Substanzen, die sich in der üblichen Efflux-Versuchsordnung als unterschiedlich stark wirkende Hemmstoffe der Phosphat-Abgabe

Tabelle 5. Daten zur Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten

Mittelwerte aus Messungen des ^{32}P -Efflux nach 15 und 30 min

		Konzentration (mol/l)	Phosphat-Abgabe- Hemmung %
3,5-Dioxo- pyrazolidine	Phenylbutazon ¹	$5 \cdot 10^{-4}$	73
		$5 \cdot 10^{-5}$	18
	Oxyphenbutazon ²	$5 \cdot 10^{-4}$	28
		$5 \cdot 10^{-5}$	< 10
Sulfinpyrazon ³	$5 \cdot 10^{-4}$	67	
	$5 \cdot 10^{-5}$	10	
	Phenopyrazon ⁴	$5 \cdot 10^{-4}$	90
		$5 \cdot 10^{-5}$	18
Phloretin		$5 \cdot 10^{-4}$	65
		$2,5 \cdot 10^{-4}$	45
		$5 \cdot 10^{-5}$	0
Papaverin		$5 \cdot 10^{-4}$	33
Reserpin		$1 \cdot 10^{-4}$	45
		$5 \cdot 10^{-5}$	20
2,4-Dinitrophenol		$5 \cdot 10^{-4}$	30
Tannin		$1,2 \cdot 10^{-3}$	84

¹ 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin (Butazolidin®).² 1-Phenyl-2-(p-hydroxyphenyl)-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin (Tanderil®).³ 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-(2'-phenylsulfinyl-aethyl)-pyrazolidin (Anturan®).⁴ 1,4-Diphenyl-3,5-dioxopyrazolidin (Bestandteil von Osadrin®).

erwiesen. Zu diesen Substanzen gehören neben Pyrazolidin-Derivaten, für die Permeabilitätsbeeinflussungen vielfältiger Art nachgewiesen wurden³⁵, vor allem Phloretin und Tannin, die als Hemmstoffe anderer Permeationsvorgänge am Erythrocyten schon länger bekannt sind^{4,40}. Über Permeabilitätseffekte der übrigen Verbindungen scheinen — zumindest für den Erythrocyten — bisher keine Angaben vorzuliegen. Beachtung verdient die Tatsache, daß von allen in Tab. 5 aufgeführten Substanzen durchschnittlich 10—100fach höhere Konzentrationen als von Dipyridamol notwendig sind, um eine annähernd gleichstarke Reduktion der Phosphat-Abgabe zu erzielen. Interessanterweise bleibt bei diesen Stoffen — genauso wie bei Dipyridamol — die Hemmwirkung auf den Phosphat-Efflux über längere Zeit unverändert erhalten.

Für einige der genannten Substanzen wurde zusätzlich geprüft, ob ihre Wirkungsweise auch in anderer Hinsicht der von Dipyridamol ähnlich ist. Wie zunächst aus Tab. 6a hervorgeht, verursachen Phenylbutazon, Phenopyrazon, Phloretin und Tannin — ebensowenig

Tabelle 6a. Konzentrationen säurelöslicher Phosphor-Verbindungen in Menschen-Erythrocyten nach 30 min Inkubation mit verschiedenen Substanzen bei 37° C

	Ges.-säurelöslicher Phosphor $\mu\text{M}/\text{g}$	Orthophosphat		ATP		ADP		DPGS	
		$\mu\text{M}/\text{g}$	%	$\mu\text{M}/\text{g}$	%	$\mu\text{M}/\text{g}$	%	$\mu\text{M}/\text{g}$	%
Kontrollen	15,10	0,65	4,3	1,04	20,6	0,24	3,2	4,31	57,0
Phenylbutazon $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	15,30	0,81	5,3	1,04	20,4	0,24	3,1	4,51	59,0
Phenopyrazon $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	15,40	0,82	5,3	1,07	20,8	0,22	2,9	4,32	56,0
Phloretin $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	15,50	0,77	4,9	1,10	21,2	0,24	3,1	4,53	58,0
Tannin 10^{-3} mol/l	15,40	0,82	5,3	1,07	20,8	0,22	2,9	4,56	59,0

Tabelle 6b. Aufnahme und Inkorporation von ^{32}P -Orthophosphat in säurelösliche Phosphor-Verbindungen menschlicher Erythrocyten bei Inkubation mit verschiedenen SubstanzenInkubationszeit 30 min, nach 15 min ^{32}P -Zugabe; RSA = relative spezifische Aktivität

	Ges.-säurelöslicher Phosphor		Orthophosphat		ATP		DPGS	
	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %	RSA	Hemmung %
Kontrollen	0,85	—	3,50	—	2,55	—	0,21	—
Phenylbutazon $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	0,42	51	1,66	52	1,18	54	0,10	52
Phenopyrazon $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	0,43	50	1,60	54	1,09	57	0,10	52
Phloretin $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l	0,56	34	2,28	35	1,66	35	0,14	33
Tannin 10^{-3} mol/l	0,22	74	1,06	70	0,62	75	0,06	72

wie Dipyridamol — Konzentrationsveränderungen intraerythrocytärer P-Fractionen; das gleiche gilt übrigens — wie schon früher nachgewiesen wurde¹¹ — für 2,4-Dinitrophenol. Auch bezüglich ihres Einflusses auf die Phosphat-Aufnahme und -Inkorporation unterscheiden sich Dinitrophenol (vgl. hierzu¹¹) sowie Phenylbutazon, Phenopyrazon, Phloretin und Tannin nicht von Dipyridamol; denn auch diese Stoffe führen, wie Tab. 6b zeigt, zu einer jeweils gleichmäßigen Reduktion der ^{32}P -Aktivitätswerte aller analysierten intraerythrocytären P-Verbindungen.

Ein weiterer Parallelismus zwischen Dipyridamol und den anderen wirksamen Substanzen, mit Ausnahme von Tannin, läßt sich daran erkennen, daß bei gleichen Hemmstoff-Konzentrationen stets die Phosphat-Abgabe stärker eingeschränkt wird als die Phosphat-Aufnahme (Verhältnis der Hemmungsintensitäten 3:2). *Aus allen diesen Befunden kann man somit folgern, daß die Effekte der hier genannten Stoffe tatsächlich in wesentlichen Einzelheiten denen von Dipyridamol entsprechen und daher nur auf einer Beeinträchtigung der Membranpermeabilität für Phosphat beruhen.*

2. Steigerung von Phosphat-Abgabe und -Aufnahme. Ausgehend von der Überlegung, daß möglicherweise Calcium beim Prozeß der Phosphat-Permeation eine Rolle spielen könnte, wurde im Rahmen unserer Untersuchungen der Einfluß einiger Ca^{++} -bindender Substanzen geprüft. Die Resultate derartiger Experimente sind in Tab.7 zusammengefaßt. Wie hieraus zunächst hervorgeht, verursachen die Chelatbildner EDTA und EGTA, aber auch ATP, AMP, Phytinsäure und Na-Oxalat eine teilweise recht erhebliche Steigerung der Phosphat-Abgabe, wobei auffälligerweise in den meisten Fällen mit zunehmender Inkubationsdauer eine Verstärkung dieses Effektes beobachtet wird. Na-Citrat sowie Ca^{++} -freie Inkubation der Erythrocyten beeinflussen dagegen die Phosphat-Abgabe nicht. Demnach kann die Wirkung der oben genannten Stoffe nicht auf einer einfachen Bindung von Ca^{++} im extracellulären Medium beruhen. Trotzdem scheint aber Ca^{++} in irgendeiner Weise für die beobachtete Steigerung der Phosphat-Abgabe mitverantwortlich zu sein; denn werden beispielsweise EDTA und EGTA Ca^{++} -freien Erythrocyten-Suspensionen zugesetzt, so wird der Phosphat-Efflux gegenüber der Norm nicht beschleunigt.

Einige Substanzen, die eine besonders deutliche Steigerung der Phosphat-Abgabe hervorrufen, wurden außerdem auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Phosphat-Aufnahme geprüft. Dabei ergab sich, daß unter dem Einfluß von EDTA, ATP und Oxalat dieser Prozeß ebenfalls intensiviert wird, im ganzen gesehen jedoch wesentlich schwächer als die Phosphat-Abgabe (vgl. Tab.7). Als Maß für die Phosphat-Aufnahme konnten auch in diesen Experimenten jeweils die ^{32}P -Aktivitätswerte (RSA) der Gesamtfractionen des säurelöslichen Phosphors verwendet werden, da deren Konzentrationen in allen Fällen konstant blieben (vgl. auch Fußnote S. 250).

Wie sich durch detaillierte Analysen nachweisen ließ, kommt es bei 30 min Inkubation mit EDTA und ATP auch nicht zu Konzentrationsveränderungen der einzelnen intraerythrocytären P-Verbindungen. Die ^{32}P -Aktivitätswerte dieser Fractionen sind — mit Ausnahme der DPGS — jeweils in gleichem Maße erhöht wie die entsprechenden Werte der Gesamtfraction des säurelöslichen Phosphors. Wengleich diese Befunde

Tabelle 7. Steigerung der Phosphat-Abgabe und -Aufnahme menschlicher Erythrocyten unter dem Einfluß verschiedener Substanzen

	Konzentration (mol/l)	Steigerung der Phosphat- Abgabe (%) nach		Steigerung der Phosphat- Aufnahme (%) nach
		15 min	30 min	30 min
EDTA	$5 \cdot 10^{-3}$	44	67	20
EGTA	$5 \cdot 10^{-3}$	45	76	—*
ATP	$5 \cdot 10^{-3}$	41	69	10
AMP	$5 \cdot 10^{-3}$	30	29	—*
Phytinsäure (Na-Salz)	$5 \cdot 10^{-4}$	25	23	—*
Na-Oxalat	$2,5 \cdot 10^{-3}$	43	50	20
Na-Citrat	$5 \cdot 10^{-3}$	0	0	0
Ca ⁺⁺ -freie Inkubation	—	0	0	—*
Ca ⁺⁺ -freie Inkubation + EDTA bzw. EGTA	je $5 \cdot 10^{-3}$	0	0	—*

* Nicht geprüft.

Tabelle 8. Konzentrationsveränderungen säurelöslicher Phosphor-Verbindungen nach 20 min Inkubation mit Na-Oxalat

Konzentrationsangaben in $\mu\text{M/g}$ Erythrocyten

	Ges.- säure- löslicher Phosphor*	Ortho- phos- phat	ATP	ADP	AMP	IMP	HDP	DPGS
Kontrollen	13,83	0,63	1,10	0,24	<0,05	—	0,18	3,92
Na-Oxalat $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l	13,81	0,81	0,52	0,45	0,30	0,15	0,43	3,87

* $\mu\text{M P/g}$.

eine gewisse Stoffwechselwirksamkeit von EDTA und ATP nicht ganz ausschließen, so machen sie doch sehr wahrscheinlich, daß die Steigerung der Phosphat-Abgabe und -Aufnahme in diesen beiden Fällen in erster Linie durch Permeabilitätsveränderungen verursacht wird. Hierfür spricht außerdem auch die Tatsache, daß weder ATP noch EDTA^{26,32} in den Erythrocyten eindringen. Da die Erythrocyten-Membran sicherlich auch für EGTA, AMP und Phytinsäure impermeabel ist, geht man wohl kaum in der Annahme fehl, daß die Effekte dieser Stoffe in ähnlicher Weise zustande kommen wie die von EDTA und ATP.

Wesentlich komplizierter liegen die Verhältnisse im Falle von Oxalat; dieser Stoff dringt nämlich in die Erythrocyten ein und verursacht hier eine Stoffwechselschädigung infolge Hemmung Mg⁺⁺-abhängiger

Enzyme der Glykolyse²¹. Als Ausdruck eines derartigen Stoffwechseleffektes von Oxalat zeigten sich auch in unseren Versuchen recht beträchtliche Konzentrationsverschiebungen bei den intraerythrocytären organischen P-Verbindungen (vgl. Tab.8). Die ³²P-Aktivität war bei allen Fraktionen zwar erhöht, aber jeweils in ganz unterschiedlichem Ausmaß. Eine Entscheidung darüber, ob die Stoffwechselalteration durch Oxalat für die gesteigerte Phosphat-Abgabe und -Aufnahme verantwortlich ist oder ob auch hier Permeabilitätsveränderungen der Membran eine Rolle spielen, erschien nur durch vergleichende Analyse der Wirkung anderer Glykolyse-Inhibitoren auf die Phosphat-Permeation möglich.

3. Steigerung der Phosphat-Abgabe bei normaler Aufnahme. Inkubiert man mit ³²P vorbeladene Erythrocyten in der üblichen Efflux-Versuchsanordnung unter Zusatz von Hemmstoffen der Glykolyse (Monojodacetat, Fluorid, Arsenat), so läßt sich, wie Tab.9 zeigt, in allen

Tabelle 9. *Wirkung von Glykolyse-Inhibitoren auf die Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten*

	Konzentration (mol/l)	Steigerung der Phosphat-Abgabe (%/o) nach	
		15 min	30 min
Monojodacetat	$5 \cdot 10^{-4}$	46	107
Na-Fluorid	10^{-2}	31	59
Na-Arsenat	$5 \cdot 10^{-4}$	19	28

Fällen eine — mit Verlängerung der Inkubationszeit zunehmende — Steigerung der Phosphat-Abgabe nachweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden neuerdings auch an Hunde-Erythrocyten gemacht¹³. Unter diesen Vergiftungs-Bedingungen kommt es gleichzeitig zu den bekannten, für die

einzelnen Inhibitoren charakteristischen Konzentrationsveränderungen intracellulärer P-Verbindungen (insbesondere Verminderung von ATP und beträchtliche Zunahme von Orthophosphat (vgl.^{7,11,15,30}).

Mißt man unter dem Einfluß der gleichen Hemmstoffe die Aufnahme und Inkorporation von ³²P-Orthophosphat (vgl. Abb.8), so ergibt sich in Übereinstimmung mit Befunden von PFLEGER³¹, daß die Phosphat-Aufnahme als solche praktisch unverändert bleibt. Da jedoch die Stoffwechsel-abhängige Inkorporation in organische Bindung beträchtlich reduziert ist, liegt in diesen vergifteten Erythrocyten jeweils ein weit größerer Anteil des aufgenommenen Phosphats in anorganischer Form vor.

Unsere Untersuchungen mit den typischen Glykolyse-Giften zeigen somit eindeutig, daß eine Schädigung des Energiestoffwechsels der Erythrocyten den Prozeß der Phosphat-Aufnahme nicht beeinflusst, während die Phosphat-Abgabe — vermutlich infolge der Erhöhung des intracellulären Orthophosphat-Spiegels — erheblich gesteigert ist. Unter Berücksichtigung

dieser Tatsachen lassen sich nunmehr auch die oben beschriebenen Effekte von Oxalat interpretieren: Da diese Substanz, wie Abb. 8 veranschaulicht, im Gegensatz zu den anderen Glykolyse-Giften die Phosphat-Aufnahme steigert, dürften sich hier Stoffwechselwirkungen und Permeabilitätsveränderungen überlagern. Die Beobachtungen von JEANES u. Mitarb.²¹ zur Wirkung von Oxalat an Erythrocyten lassen sich wegen der ganz andersartigen Versuchsbedingungen mit den eigenen Resultaten nicht vergleichen.

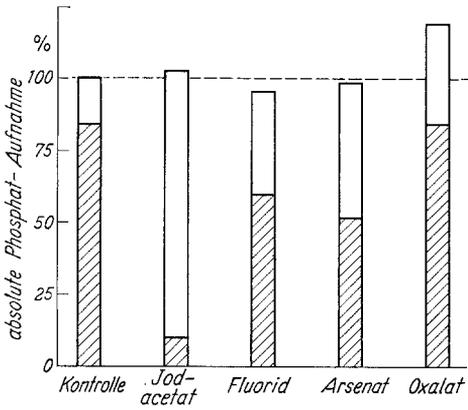


Abb. 8

Abb. 8. Absolute Aufnahme von extracellulärem Orthophosphat in den säurelöslichen Phosphor menschlicher Erythrocyten unter dem Einfluß von Monojodacetat ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l), Fluorid ($2 \cdot 10^{-2}$ mol/l), Arsenat ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) und Oxalat ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l). Die Absolutaufnahme wurde jeweils aus den RSA- und Konzentrationswerten als nM P/g Erythrocyten/min berechnet und auf die Kontrollen (100%) bezogen. Schraffierter Säulentheil: Anteil des aufgenommenen Phosphats in organischer Bindung; nicht-schraffierter Säulentheil: Anteil des aufgenommenen Phosphats in der intracellulären Orthophosphatfraktion

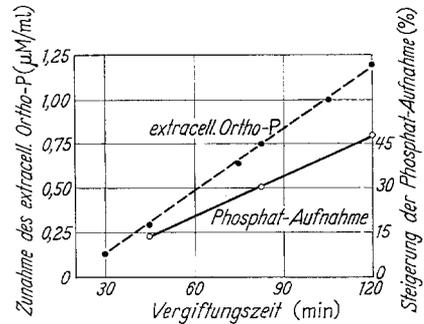


Abb. 9

Abb. 9. Beziehungen zwischen extracellulärem Orthophosphatgehalt und Phosphat-Aufnahme bei längerer Vergiftung von Erythrocyten mit Monojodacetat ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Messung der Phosphataufnahme in einem Aliquot eines gemeinsamen Ansatzes durch jeweilige Exposition mit ^{32}P für 15 min nach 30, 67,5 und 105 min Inkubation

Unter dem Einfluß der typischen Glykolyse-Gifte kommt es infolge der gesteigerten Phosphat-Abgabe bei normaler Phosphat-Aufnahme zu Nettoverschiebungen, so daß die extracelluläre Orthophosphat-Konzentration — wie dies schon früher beobachtet wurde^{11,15,29,33} — progressiv ansteigt. Diese Zunahme des extracellulären Orthophosphat-Gehalts hat ihrerseits bedeutsame Rückwirkungen auf den Prozeß der Phosphat-Aufnahme. Wie nämlich im einzelnen noch zu zeigen sein wird, führt jede Erhöhung der extracellulären Phosphat-Konzentration zu einer Intensivierung des Phosphat-Einstroms. Es war daher zu vermuten, daß die Phosphat-Aufnahme von Erythrocyten nach längerer Vorvergiftung, z. B. mit Jodacetat, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen nicht mehr unverändert, sondern erhöht sein würde.

Diese Vermutung konnte nun tatsächlich bestätigt werden. In Abb. 9 sind Ergebnisse von Experimenten dargestellt, bei denen die

Phosphat-Aufnahme Jodacetat-vergifteter Erythrocyten zu verschiedenen Zeiten nach Vergiftungsbeginn durch jeweils 15 min Exposition mit ^{32}P gemessen und außerdem die Konzentrationszunahme des extracellulären Orthophosphats analysiert wurden. Es ist zu ersehen, daß eine Proportionalität zwischen der Phosphat-Aufnahme-Steigerung und dem extracellulären Orthophosphat-Anstieg besteht. Unter Verwendung der in Abb. 10 enthaltenen Daten über den Einfluß erhöhter extracellulärer Phosphat-Konzentrationen auf die Phosphat-Aufnahme normaler Erythrocyten läßt sich berechnen, daß die während längerer Vergiftungszeiten mit Jodacetat eintretende Erhöhung der Phosphat-Aufnahmeraten ausschließlich auf den Anstieg der extracellulären Orthophosphat-Konzentration zurückzuführen ist. Dementsprechend lassen sich die Differenzen zwischen der Phosphat-Aufnahme der Kontrollen und der vergifteten Erythrocyten zum Verschwinden bringen, wenn man durch Zugabe von Orthophosphat den extracellulären Phosphat-Spiegel der Kontroll-Ansätze dem der Jodacetat-Ansätze angleicht. Damit dürfte bewiesen sein, daß auch bei längerer Einwirkung von Jodacetat der Prozeß der Phosphat-Aufnahme als solcher normal bleibt.

4. Verminderung der Phosphat-Abgabe bei normaler Aufnahme. Die vorausgehend beschriebenen Versuche mit Stoffwechsel-Inhibitoren hatten Anlaß zu der Vermutung gegeben, daß die gesteigerte Phosphat-Abgabe bei vergifteten Erythrocyten durch den Konzentrationsanstieg der intracellulären Orthophosphat-Fraktion verursacht wird. Trifft diese Annahme zu, so sollte umgekehrt bei Erniedrigung des intracellulären Phosphat-Spiegels die Phosphat-Abgabe vermindert sein.

Eine Reduktion des intracellulären Orthophosphat-Gehaltes läßt sich in einfacher Weise durch Inkubation normaler Erythrocyten in Gegenwart von Inosin oder anderen Purin-Nucleosiden erzielen. Diese Stoffe dringen bekanntlich in die Erythrocyten ein^{23,24,39}, und werden hier hauptsächlich unter Beteiligung der Nucleosidphosphorylase und der Enzyme des Pentosephosphat-Cyclus metabolisiert (vgl. z. B. 2,3,5,6,33,34), wobei Orthophosphat vermehrt in organische Bindung überführt wird. Dementsprechend konnten wir zeigen, daß bereits innerhalb einer 15 min-Inkubation normaler Erythrocyten mit Inosin ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) die intracelluläre Orthophosphat-Konzentration um mehr als 50% abnimmt, während gleichzeitig der HDP-Gehalt nahezu verdreifacht wird und außerdem — infolge Phosphorylierung des eingedrungenen Inosins — eine beachtliche Neubildung von IMP erfolgt; eine Konzentrationszunahme des gesamt-säurelöslichen Phosphors läßt sich aber bei dieser kurzen Inkubationszeit noch nicht nachweisen.

Parallel zu den genannten Konzentrationsveränderungen kommt es — wie aus Tab. 10 ersichtlich — zu einer ca. 90%igen Verminderung der Phosphat-Abgabe aus diesen Erythrocyten. Eine gleichstarke Wirkung

auf den Phosphat-Efflux hat Inosin auch noch in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l; bei kleineren Inosin-Mengen ist dagegen der Effekt deutlich schwächer. Adenosin und Guanosin erweisen sich in vergleichbaren Konzentrationen als ebenso wirksam wie Inosin.

Im Gegensatz zu der auffälligen Reduktion der Phosphat-Abgabe bleibt interessanterweise die Aufnahme von Phosphat in die Erythrocyten bei 15 min Inkubation mit Inosin unverändert. Die Ergebnisse unserer Experimente mit Inosin lassen somit erkennen, daß tatsächlich zwischen dem intracellulären Orthophosphat-Gehalt und dem Ausmaß der Phosphat-Abgabe enge Beziehungen bestehen. Eine ähnlich enge Korrelation zwischen dem intraerythrocytären Orthophosphat-Spiegel und der Phosphat-Aufnahme scheint dagegen nicht zu existieren, wie dies auch schon die Versuche mit Glykolyse-Giften gezeigt haben.

Tabelle 10. Wirkung von Purin-Nucleosiden auf die Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten

Mittelwerte aus Messungen des ^{32}P -Efflux nach 15 und 30 min

	Konzentration (mol/l)	Verminderung der Phosphat-Abgabe %
Inosin	$5 \cdot 10^{-3}$	88
	$1 \cdot 10^{-3}$	87
	$1 \cdot 10^{-4}$	38
Adenosin	$1 \cdot 10^{-3}$	79
Guanosin	$1 \cdot 10^{-3}$	85

5. Einfluß erhöhter extracellulärer Orthophosphat-Konzentrationen auf die Phosphat-Abgabe und -Aufnahme. In Ergänzung zu den vorausgehend beschriebenen Studien über die Bedeutung des intracellulären Orthophosphat-Spiegels für die Größe des Phosphat-Efflux wurde in weiteren Experimenten noch von einer anderen Möglichkeit Gebrauch gemacht, die intracelluläre Orthophosphat-Konzentration zu variieren. Werden nämlich Erythrocyten bei erhöhtem extracellulärem Orthophosphat-Gehalt inkubiert, so führt dies zu einer Zunahme der intracellulären Orthophosphat-Konzentration (vgl. auch ³⁸), ohne daß sich dabei — zumindest während kürzerer Inkubationszeiten — der Gehalt der Erythrocyten an organischen P-Verbindungen nachweisbar ändert.

Analysiert man im einzelnen den jeweiligen intracellulären Orthophosphat-Gehalt nach 15 minütiger Inkubation bei verschiedenen extracellulären Orthophosphat-Konzentrationen ($1-10 \mu\text{M}/\text{ml}$), so zeigt sich, daß die intracelluläre Orthophosphat-Zunahme jeweils dem extracellulären Orthophosphat-Spiegel proportional ist (vgl. Abb. 10). Mißt man außerdem in denselben Versuchen die ^{32}P -Aufnahme in die Gesamtfraktion des säurelöslichen Phosphors der Erythrocyten und berechnet hieraus, unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivitäten des extracellulären Orthophosphats, die während dieser 15 min jeweils zusätzlich aufgenommenen absoluten Phosphat-Mengen, so ergibt sich — wie aus

Abb.10 hervorgeht — eine volle Übereinstimmung dieser Werte mit den aus Konzentrationsanalysen ermittelten Daten für den intracellulären Orthophosphat-Zuwachs. Diese Resultate lassen somit erkennen, daß mit Erhöhung des extracellulären Orthophosphat-Gehalts die Phosphat-Aufnahme progredient ansteigt (vgl. auch⁴¹), wobei das zusätzlich aufgenommene Phosphat im Inneren der Erythrocyten nur in anorganischer Form vorliegt.

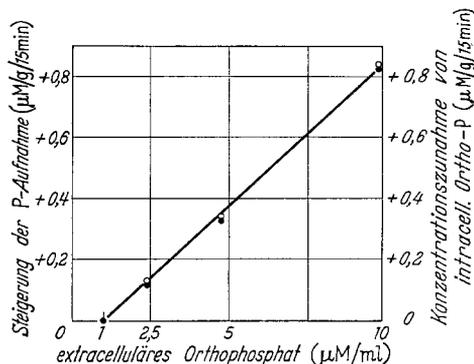


Abb. 10

Abb.10. Steigerung der Phosphataufnahme in den säurelöslichen Phosphor und Zunahme der intracellulären Orthophosphatkonzentration menschlicher Erythrocyten in Abhängigkeit vom extracellulären Phosphat Spiegel. Die Ansätze wurden nach gleichzeitigem Hinzufügen von ³²P und Orthophosphat jeweils für 15 min bei 37° C inkubiert. ○—○ Werte für die zusätzlich in den säurelöslichen Phosphor aufgenommene Phosphatmenge (µM/g Erythrocyten/15 min), berechnet aus RSA und Konzentration dieser Fraktion; ●—● Werte für den Konzentrationszuwachs des intracellulären Orthophosphats (µM/g/15 min)

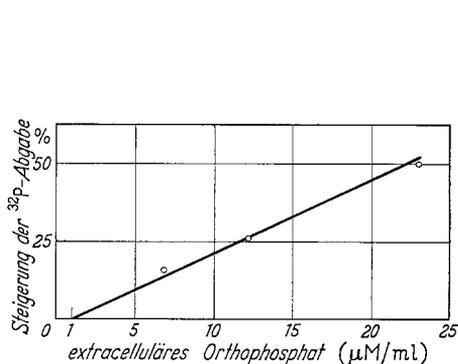


Abb. 11

Abb. 11. Intensivierung der ³²P-Abgabe aus menschlichen Erythrocyten bei Erhöhung des extracellulären Orthophosphatgehalts. Versuchsbedingungen: Vorbeladung der Erythrocyten mit ³²P bei 37° C und normaler extracellulärer Orthophosphatkonzentration (1 µM/ml). Messung des ³²P-Efflux nach 10 min Inkubation bei erhöhtem extracellulärem Phosphatgehalt

In Anbetracht dieser Tatsache überrascht es nun nicht, daß bei Zunahme der extracellulären Orthophosphat-Konzentration nicht nur die Aufnahme, sondern auch die Abgabe von Phosphat gesteigert ist. Wie Abb.11 zeigt, besteht zwischen dem Ausmaß der Phosphat-Abgabe-Steigerung und dem jeweiligen extracellulären Phosphat-Gehalt ebenfalls eine direkte Proportionalität. Letztlich dürfte aber natürlich hierfür der — dem extracellulären Phosphat-Spiegel proportionale — Konzentrationsanstieg des intracellulären Orthophosphats verantwortlich sein.

Die lineare Abhängigkeit der Phosphat-Abgabe-Steigerung von der erhöhten extra- bzw. intracellulären Orthophosphat-Konzentration läßt sich aus rein methodischen Gründen nur während der ersten 5—10 min der Efflux-Messungen einwandfrei nachweisen. Nach längeren Meßzeiten werden die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß die ³²P-Aktivität der intracellulären Orthophosphat-Fraktion, die unseren Befunden zufolge Vorläufer des austretenden Phosphats ist, in unterschiedlich starkem Maße verändert wird. Bei Erhöhung des extracellulären Phosphat-Gehalts kommt es nämlich infolge des Eindringens größerer Mengen von nicht-markiertem ³¹P-Orthophosphat zu einer rasch fortschreitenden Reduktion der

spezifischen Aktivität der intracellulären Orthophosphat-Fraktion, die um so stärker in Erscheinung tritt, je höher der extracelluläre Phosphat-Spiegel ist.

Unsere Befunde zur gesteigerten Phosphat-Abgabe bei erhöhtem extracellulärem Orthophosphat-Gehalt erlauben selbstverständlich — im Gegensatz zu den Resultaten der entsprechenden Phosphat-Aufnahme-Studien — keine Berechnung der absolut abgegebenen Phosphat-Mengen. Man kann aber trotzdem mit Sicherheit sagen, daß *unter dem Einfluß erhöhter extracellulärer Orthophosphat-Konzentrationen die Phosphat-Abgabe initial weniger intensiviert wird als die Phosphat-Aufnahme*, da es andernfalls innerhalb der von uns gewählten kurzen Inkubationszeiten noch nicht zu Nettoverschiebungen des beobachteten Ausmaßes hätte kommen können*.

6. Über den Einfluß weiterer Substanzen auf den Phosphat-Efflux menschlicher Erythrocyten. Tab. 11 gibt eine Übersicht über eine größere Anzahl von Substanzen, die nur eine geringe oder keine Wirkung auf die Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten zeigten. Die Auswahl dieser Stoffe erfolgte in erster Linie unter Berücksichtigung physiologischer, biochemischer und pharmakologischer Gesichtspunkte. Wie aus Tab. 11 hervorgeht, erwiesen sich insbesondere die in hoher Dosierung geprüften Hormone und Vitamine — mit Ausnahme von Oestriol und Thiamin — als wirkungslos. Man kann hieraus sicherlich folgern, daß diese Stoffe bei der physiologischen Regulation der Phosphat-Abgabe aus menschlichen Erythrocyten in vivo keine direkte Rolle spielen. Auch zahlreiche andere Substanzen, für die eine Einflußnahme auf verschiedenartigste Stoffwechsel- und Permutationsprozesse an Erythrocyten nachgewiesen wurde, wie z. B. für Cystamin, Pyruvat, Nitrit, Ferricyanid, Ouabain, Acetazolamid und andere, haben in den geprüften Konzentrationen keine Wirkung auf den Phosphat-Efflux. Interessant erscheint auch die Tatsache, daß einige — den stark hemmend wirkenden Pyrazolidin-Derivaten (vgl. Tab. 5) chemisch nahestehende — Pyrazolon-Verbindungen (Antipyrin, Aminopyrin, Metamizol) keinen oder sogar einen steigernden Effekt haben. Erwähnenswert ist schließlich noch, daß in auffälligem Gegensatz zu Dipyridamol andere coronardilatierende Pharmaka (Prenylamin, D₃₆₅, Carbochromen) die Phosphat-Abgabe nur sehr schwach oder überhaupt nicht beeinflussen. Als ebensowenig wirksam erwiesen sich auch Stoffe aus der Gruppe der Antihistaminica, Lokalanaesthetica, Barbiturate, Purin-Verbindungen und Antidiabetica.

* *Anmerkung während der Korrektur.* GLADER, BARBACKI u. OMACHI [Fed. Proc. **23**, 114 (1964)] haben neuerdings ebenfalls den Einfluß erhöhter extracellulärer Orthophosphat-Konzentrationen sowie die Wirkung von Inosin und Glykolyse-Inhibitoren auf die ³²P-Abgabe menschlicher Erythrocyten untersucht. Ihre Resultate stimmen im wesentlichen mit unseren Befunden überein.

Tabelle 11. Übersicht über die Wirkung biologisch und pharmakologisch aktiver Substanzen auf die Phosphat-Abgabe menschlicher Erythrocyten

0 = keine Wirkung; + = Steigerung; - = Hemmung

	Endkonzentration mmol/l	Wirkung		Endkonzentration mmol/l	Wirkung
Adrenalin	0,05	0	Atropin	0,05	0
Thyroxin	0,05	0	Neostigmin	0,05	0
Histamin	0,5	0	Pilocarpin	0,05	0
Prednisolon-hemisuccinat	0,1	0	Ouabain	0,05	0
Oestriol-hemisuccinat	0,5	-	Phentolamin (Regitin®)	0,5	0
Insulin	1 IE/ml	0	Dihydroergotamin-methansulfonat (Dihyergot®)	0,05	0
Parathormon	1 IE/ml	0			
Thiamin	0,5	(+)	Coffein	0,5	0
Nicotinsäureamid	0,05	0	Oxypropyltheophyllin	0,05	0
Pyridoxamin	0,5	0	Pentetrazol (Cardiazol®)	0,05	0
Riboflavin	0,5	0	Mersalyl	0,5	(+)
Folsäure	0,5	0	Acetazolamid (Diamox®)	0,05	0
Cyanocobalamin	0,5	0	Phenprocoumon (Marcumar®)	0,5	-
Ascorbinsäure	0,5	0	Procain	0,05	0
Rutin	0,5	0	Tetracain (Pantocain®)	0,05	0
Menadiol-diphosphat (Synka-Vit®)	0,5	0	Urethan	0,05	0
Cystin	1,0	0	Hexobarbital	0,1	0
Cystamin	5,0	0	Thiopental	0,5	0
Tryptophan	0,5	0	Pethidin (Dolantin®)	0,5	0
Prolin	0,5	0	Chlorpromazin	0,5	0
Diäthanolamin	0,1	0	Bamipin (Soventol®)	0,5	0
D,L-Pyruvat	5,0	0	Brompheniramin (Ilvin®)	0,05	0
D,L-Lactat	5,0	0	Prenylamin (Segontin®)	0,5	(-)
CaCl ₂	5,0	0	D ₃₆₅ (Isoptin®)	0,5	0
Na-Pyrophosphat	5,0	0	Carbochromen (Intensain®)	0,5	0
Na-Nitrit	0,5	0	Phenethylbiguanid (DBI)	0,5	(+)
NaCN	5,0	(-)	Tolbutamid (Rastinon®)	0,5	0
Na-Azid	0,5	(+)			
K-Ferricyanid	5,0	0			
Na-Salicylat	0,5	0			
Antipyrin	0,5	0			
Aminopyrin	0,5	(+)			
Metamizol (Novalgin®)	0,05	+			
Metamizol	0,5	++			
Isopyrin	0,5	(+)			
Phenacetin	0,25	(-)			

Besprechung

Wie die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, läßt sich der Phosphat-Austausch menschlicher Erythrocyten, der sich aus den beiden Komponenten Phosphat-Aufnahme und Phosphat-Abgabe zusammensetzt, durch verschiedene Substanzen in sehr unterschiedlicher Weise beeinflussen: Eine Gruppe von Stoffen verursacht eine Reduktion der Phosphat-Aufnahme und -Abgabe; eine Reihe anderer Substanzen führt zu einer Steigerung beider Prozesse. Hemmstoffe der Glykolyse erhöhen die Phosphat-Abgabe, Purinnucleoside vermindern sie, bei jeweils unveränderter Aufnahme von Phosphat. Diese verschiedenartigen Effekte lassen sich prinzipiell aber — wie im folgenden gezeigt wird — auf Veränderungen von nur zwei Größen zurückführen, nämlich der *Membranpermeabilität für Phosphat* oder der *Konzentrationsdifferenz zwischen intra- und extracellulärem Orthophosphat*.

a) Zur Beeinflussung des Phosphat-Austauschs infolge von Permeabilitätsveränderungen

Auf alleinige Permeabilitätsveränderungen dürften die Wirkungen derjenigen Stoffe zurückzuführen sein, die eine gleichsinnige Beeinflussung von Phosphat-Aufnahme und -Abgabe bedingen, ohne daß dabei primär die Konzentrationen intracellulärer Phosphat-Verbindungen oder der glykolytische Stoffwechsel in nennenswertem Maße alteriert werden. Hierher gehören somit einerseits Substanzen, die den Phosphat-Austausch hemmen (z. B. Dipyridamol, Pyrazolidine, Phloretin, 2,4-Dinitrophenol und andere), zum anderen sehr wahrscheinlich auch verschiedene Stoffe, die den Phosphat-Austausch beschleunigen (EDTA, EGTA, ATP und andere). Besonders interessant ist dabei, daß diese Stoffe generell den Efflux von Phosphat stärker beeinflussen als den Influx, woraus bei langzeitigen Versuchen Nettoverschiebungen von Phosphat resultieren. Die Frage liegt natürlich nahe, ob diese unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Teilprozesse des Phosphat-Austausches möglicherweise Ausdruck einer gewissen Verschiedenartigkeit derjenigen Mechanismen ist, die für den Phosphat-Durchtritt von außen nach innen und von innen nach außen verantwortlich sind. Eine Entscheidung dieser Frage erscheint aber im Augenblick noch verfrüht. Das gleiche gilt im wesentlichen auch für das Problem, von welchen chemischen bzw. physiko-chemischen Eigenschaften die Permeabilitätseffekte der verschiedenen Substanzen abhängen; hier haben sich bisher nur wenige Anhaltspunkte ergeben.

Für die Wirkung einer Anzahl von Stoffen, die die Phosphat-Permeabilität steigern, scheint ihre Fähigkeit zur Bindung von Ca^{++} bedeutungsvoll zu sein. Da sich aber die Permeabilität bei Ca^{++} -freier Inkubation sowie in Gegenwart von Citrat nicht nachweisbar ändert,

Substanzen wie EDTA oder EGTA jedoch nur in einem Ca^{++} -haltigen Medium wirksam sind, dürften die Effekte nicht Folge einer einfachen Verminderung des ionisierten Calciums sein. Viel eher wäre daran zu denken, daß die beobachteten Permeabilitätserhöhungen durch — im extracellulären Medium oder an der Erythrocyten-Membran entstehende — Ca^{++} -Chelate als solche ausgelöst werden. In Anbetracht der Tatsache, daß die Erythrocyten für die geprüften Chelat-Bildner sowie für ATP und andere organische Phosphat-Verbindungen impermeabel sind, können sich die zur Permeabilitätssteigerung führenden Prozesse sicherlich nur an der Erythrocyten-Oberfläche abspielen.

Im Falle der permeabilitäts-mindernd wirkenden Stoffgruppe sind die Verhältnisse besonders kompliziert. Hier handelt es sich um Verbindungen ganz verschiedener chemischer Konstitution, unterschiedlicher Wasser- bzw. Lipoid-Löslichkeit und sehr differenter Reaktivität. Aber selbst einander sehr ähnliche Substanzen dieser Gruppe, die sich z. B. nur durch das Vorhandensein einer phenolischen Hydroxyl-Gruppe unterscheiden (Phenylbutazon und Oxyphenbutazon), weisen bereits beträchtliche Wirkungsunterschiede auf. Auch bei Prüfung einer Vielzahl Dipyridamol-ähnlicher Pyrimido-Pyrimidin-Verbindungen konnten wir zeigen, daß schon eine geringe Veränderung bzw. ein Austausch der Substituenten genügt, um die Wirkungsintensität beträchtlich zu variieren. Über Einzelheiten dieser Studien wird an anderer Stelle berichtet.

Weiterhin ist von Interesse, daß einige der Substanzen, die eine Verminderung der Phosphat-Permeabilität hervorrufen (Dipyridamol, Phenylbutazon, Phloretin) auch die Permeation von Adenosin²³ sowie von verschiedenen Monosacchariden¹ durch die Erythrocyten-Membran hemmen. Dieser auffällige Wirkungs-Parallelismus könnte einerseits dafür sprechen, daß die genannten Stoffe auf die Erythrocyten-Membran relativ unspezifisch „abdichtend“ wirken; andererseits könnte er aber auch zeigen, daß zwischen den Transfer-Mechanismen von Orthophosphat, Adenosin und Monosacchariden gewisse Ähnlichkeiten bestehen. Wenngleich unsere bisherigen Studien mit permeabilitäts-verändernden Stoffen noch keine detaillierten Aussagen über ihre eigentliche Wirkungsweise erlauben, so dürften sich doch aus ihnen einige neue Möglichkeiten zur weiteren experimentellen Bearbeitung des Problems der Phosphat-Permeabilität des Erythrocyten ergeben.

Die Frage, ob die an Erythrocyten erhobenen Befunde über die Effekte der verschiedenen Substanzen auf die Phosphat-Permeabilität auch für andere Organe und Gewebe Gültigkeit besitzen, läßt sich vorerst noch nicht mit Sicherheit beantworten. Da aber Erythrocyten auf Grund ihrer besonderen Membraneigenschaften, wie z. B. der hohen Anionen-permeabilität bei relativ geringer Kationenpermeabilität, und ihres

ausschließlich glykolytischen Stoffwechsels eine Sonderstellung beanspruchen, dürfte eine unmittelbare Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse von vornherein wenig wahrscheinlich sein. Es überrascht daher auch nicht, daß nach eigenen Untersuchungen beispielsweise Dipyridamol in den am Erythrocyten stark permeabilitäts-mindernd wirkenden Konzentrationen die ^{32}P -Abgabe isolierter Meerschweinchen- und Kaninchen-Vorhöfe nicht beeinträchtigt.

b) Zum Einfluß der intra- und extracellulären Orthophosphat-Konzentration auf den Phosphat-Austausch

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Aufnahme von extracellulärem Orthophosphat in die Erythrocyten ein vom Stoffwechsel unabhängiger Prozeß, wobei das aufgenommene Phosphat primär in der intracellulären Orthophosphat-Fraktion erscheint. Diese Auffassung basiert einmal auf der auch durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigten Erkenntnis³¹, daß die Phosphat-Aufnahme bei Hemmung des glykolytischen Stoffwechsels nicht unmittelbar verändert wird; zum anderen wird sie gestützt durch Befunde über eine gegensinnige pH-Abhängigkeit von Glykolyse-Intensität und Phosphat-Permeabilität³⁶ sowie durch kinetische Studien über die Phosphat-Aufnahme bei hohen extracellulären Phosphat-Konzentrationen³⁷. Durch zahlreiche Untersuchungen^{10,16,18,33} u. a. ist außerdem gesichert, daß die Aufnahme von Phosphat nicht Folge eines freien Diffusionsprozesses ist; denn mit einem einfachen Diffusionsvorgang sind weder die beobachteten hohen Temperaturkoeffizienten vereinbar, noch die Tatsache, daß bei Messungen mit Radiophosphor ein Gleichgewichtszustand zwischen intra- und extracellulärer Radioaktivität erst nach längeren Zeiten erreicht wird.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nunmehr der Nachweis erbracht werden, daß der Prozeß der Phosphat-Abgabe eine ähnlich starke Temperaturabhängigkeit zeigt wie die Phosphat-Aufnahme; dementsprechend handelt es sich auch hierbei nicht um einen freien Diffusionsvorgang. Ebenso wenig ist aber — unseren Befunden zufolge — die Abgabe von Phosphat ein vom Stoffwechsel der Erythrocyten direkt abhängiger Vorgang; denn wäre dies der Fall, so sollte bei Hemmung des glykolytischen Stoffwechsels die Phosphat-Abgabe vermindert sein. Tatsächlich erweist sich aber der Phosphat-Efflux vergifteter Erythrocyten als gesteigert bei primär normal bleibendem Phosphat-Influx. Die gesteigerte Phosphat-Abgabe, die übrigens bei längeren Vergiftungszeiten immer stärker wird und zu einem beträchtlichen Anstieg des extracellulären Orthophosphat-Spiegels führt, ist sicherlich nur Folge der — durch den Zusammenbruch organischer Phosphat-Verbindungen verursachten — kontinuierlichen Konzentrationszunahme der intracellulären Orthophosphat-Fraktion. Gestützt wird diese Auffassung

insbesondere auch durch die Tatsache, daß unseren Befunden zufolge allein das intracelluläre Orthophosphat als Vorläufer des abgegebenen Phosphats fungiert.

Die den Inhibitorwirkungen entgegengesetzten Effekte der Purin-Nucleoside, nämlich eine starke Reduktion des Phosphat-Efflux bei normalem Phosphat-Influx, lassen sich zwanglos durch die — aus einer Fixation von Phosphat in organischer Bindung resultierende — Konzentrationsverminderung der intracellulären Orthophosphat-Fraktion erklären. Bei längerer Inkubation mit Purin-Nucleosiden müßte es allein auf Grund der verminderten Efflux-Raten zu einer progredienten intracellulären Phosphat-Anreicherung kommen. Tatsächlich wurden derartige Effekte von verschiedenen Autoren^{6,22,34} u. a. beobachtet. Da aber unter derartigen Bedingungen keine Messungen der Phosphat-Abgabe durchgeführt wurden, herrschte die Meinung vor, daß die intracelluläre Phosphat-Anreicherung in Nucleosid-behandelten Erythrocyten Folge einer stimulierten Phosphat-Aufnahme sei, was aber den tatsächlichen Verhältnissen nicht entspricht. *Bei Hemmung des Stoffwechsels mit typischen Glykolyse-Giften sowie auch bei Intensivierung des Stoffwechsels mit Purin-Nucleosiden wird also die jeweilige Größe der Phosphat-Abgabe vom intracellulären Orthophosphat-Spiegel bestimmt; dagegen beeinflussen weder die typischen Glykolyse-Inhibitoren noch Purin-Nucleoside den Prozeß der Phosphat-Permeation als solchen.*

Offensichtlich gibt es aber auch Bedingungen, bei denen Steigerungen oder Verminderungen der Phosphat-Abgabe nicht allein auf Verschiebungen der intracellulären Orthophosphat-Konzentration, sondern zusätzlich noch auf Permeabilitätsveränderungen der Membran beruhen. Dies ist einmal der Fall, wie oben gezeigt, bei Einwirkung von Oxalat (vgl. Abb. 8); zum anderen trifft es aber auch zu für die von RUMMEL u. Mitarb.³⁶ nachgewiesenen Veränderungen der Phosphat-Abgabe bei Variation der extracellulären Wasserstoff-Ionenkonzentration. Verschiebungen des pH-Wertes führen nämlich zu Veränderungen der intracellulären Orthophosphat-Konzentration^{12,31} und gleichzeitig auch zu Änderungen der Anionen-Permeabilität der Erythrocyten-Membran²⁸.

Von ähnlicher Bedeutung wie der intracelluläre Orthophosphat-Gehalt für das Ausmaß der Phosphat-Abgabe ist der extracelluläre Orthophosphat-Spiegel für die Größe der Phosphat-Aufnahme; denn jede Erhöhung der extracellulären Phosphat-Konzentration führt zu einer proportionalen Phosphat-Influx-Steigerung und damit zu einer Zunahme des intracellulären anorganischen Phosphats, interessanterweise aber nicht zu einer nennenswerten Vermehrung von organisch gebundenem Phosphat. Aus dem intracellulären Orthophosphat-Anstieg resultiert selbstverständlich wiederum eine Steigerung der Phosphat-Abgabe, die aber im Grunde nur sekundärer Natur ist.

In diesem Zusammenhang scheint es von Interesse, daß die vorliegenden Untersuchungen auch eine Erklärung der gegensätzlichen Auffassungen hinsichtlich des Einflusses von Glykolyse-Giften auf die Phosphat-Aufnahme menschlicher Erythrocyten ermöglichen. Einige Autoren^{14,15,33,41} haben festgestellt, daß bei längerer Inkubation von Erythrocyten mit ^{32}P die extracelluläre Radioaktivität in Gegenwart von Stoffwechsel-Inhibitoren deutlich langsamer abnimmt als in den entsprechenden Kontrollen; diese Beobachtung wurde als Beweis dafür angesehen, daß die Phosphat-Aufnahme durch Glykolyse-Gifte gehemmt wird. Bei dieser Interpretation scheint aber nicht genügend berücksichtigt worden zu sein, daß bei derartigen Langzeit-Versuchen der extracelluläre Phosphat-Gehalt im Medium vergifteter Erythrocyten — infolge der bei diesen Zellen gesteigerten Phosphat-Abgabe — erheblich zunimmt. Da nun in der Hauptsache nichtradioaktives Phosphat aus den Erythrocyten austritt, nimmt — wie wir zeigen konnten — die spezifische Aktivität der extracellulären Orthophosphat-Fraktion in Vergiftungsansätzen wesentlich stärker ab, als dies auf Grund der vergleichsweise viel geringeren physiologischen Phosphat-Abgabe in Kontrollansätzen der Fall ist. Bei unveränderter bzw. sogar gesteigerter Phosphat-Aufnahme der vergifteten Erythrocyten wirkt sich diese Verminderung der spezifischen Aktivität des extracellulären Orthophosphats in der Weise aus, daß mit den gleichen absolut aufgenommenen Phosphat-Mengen weit weniger ^{32}P in die vergifteten als in die Kontroll-Erythrocyten gelangt. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß natürlich während langer Vergiftungszeiten in Gegenwart von ^{32}P als Folge der progredienten Steigerung der Phosphat-Abgabe bereits aufgenommener Radiophosphor die Erythrocyten in verstärktem Maße wieder verläßt. Aus diesen Vorgängen resultiert zwar tatsächlich eine — im Vergleich zu den Kontrollen — langsamere Aktivitätsabnahme im extracellulären Medium der vergifteten Erythrocyten; dies ist aber mit Sicherheit nicht Ausdruck einer Hemmung der Phosphat-Aufnahme, sondern Auswirkung der intensivierten Phosphat-Abgabe.

Auf Grund dieser Gegebenheiten und unter Berücksichtigung unserer Befunde zur Wirkung von Purin-Nucleosiden läßt sich nunmehr auch eine interessante Beobachtung von ZIPURSKY u. ISRAELS⁴¹ erklären: Wie diese Autoren nämlich gezeigt haben, kommt es bei Vergiftung von Erythrocyten mit Jodacetat in gleichzeitiger Anwesenheit von Adenosin nicht zu der charakteristischen Verlangsamung der extracellulären Radioaktivitäts-Abnahme. Dies wird nunmehr ohne weiteres verständlich; denn die durch Adenosin ausgelösten, nicht Jodacetat-empfindlichen Phosphorylierungsreaktionen, auf Grund derer intracelluläres Orthophosphat vermehrt in organische Bindung überführt wird, haben zur Folge, daß der Jodacetat-bedingte intracelluläre Orthophosphat-

Anstieg unterbleibt und damit auch die Steigerung der Phosphat-Abgabe. Während Adenosin die Effekte von Jodacetat auf die Phosphat-Abgabe aufhebt, bleibt es bei Arsenat-vergifteten Erythrocyten wirkungslos³³. Verantwortlich hierfür ist der Umstand, daß Arsenat nicht nur die Glykolyse, sondern außerdem auch die durch Adenosin induzierten Phosphorylierungsprozesse hemmt.

Sieht man von diesen speziellen Problemen ab, so verdient besondere Beachtung die Tatsache, daß offenbar die Prozesse der Phosphat-Aufnahme und Phosphat-Abgabe, obgleich in verschiedenster Weise und weitgehend unabhängig voneinander beeinflussbar, unter physiologischen Bedingungen in einem sehr fein aufeinander abgestimmten dynamischen Gleichgewicht stehen. Dieser Gleichgewichtszustand zwischen Phosphat-Aufnahme und Phosphat-Abgabe, der allein als ein echter Phosphat-Austausch bzw. Phosphat-Turnover anzusehen ist, gewährleistet die physiologische Konstanz der intraerythrocytären Phosphat-Konzentration.

Die Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Frl. A. KEMPFER und Frl. S. FIDORA gilt unser besonderer Dank für technische Assistenz.

Literatur

- ¹ DEUTICKE, B., J. DUHM u. E. GERLACH: Beeinflussung der Monosaccharid-Permeabilität des Menschen-Erythrocyten durch eine Pyrimido-Pyrimidin-Verbindung. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **280**, 275 (1964).
- ² DISCHE, Z.: Phosphorylierung der im Adenosin enthaltenen D-Ribose und nachfolgender Zerfall des Esters unter Triosephosphatbildung im Blute. *Naturwissenschaften* **26**, 252 (1938).
- ³ — Synthesis of hexosemono- and diphosphate from adenosine and ribose-5-phosphate in human blood. *Symposium on Phosphorus Metabolism*, Vol. 1, p. 171. Baltimore: John Hopkins Press 1951.
- ⁴ EDELBERG, R.: The action of tannic acid on model systems formed of constituents of the erythrocyte membrane. *J. cell. comp. Physiol.* **41**, 37 (1953).
- ⁵ GABRIO, B. W., C. A. FINCH, and F. M. HUENNEKENS: Erythrocyte preservation: A topic in molecular biochemistry. *Blood* **11**, 103 (1956).
- ⁶ — M. HENNESSEY, J. THOMASSON, and C. A. FINCH: Erythrocyte preservation. IV. In vitro reversibility of the storage lesion. *J. biol. Chem.* **215**, 357 (1955).
- ⁷ GÁRDOS, G., u. F. B. STRAUB: Über die Rolle der Adenosintriphosphorsäure (ATP) in der K-Permeabilität der menschlichen roten Blutkörperchen. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.* **12**, 1 (1957).
- ⁸ GERLACH, E., u. B. DEUTICKE: Der Einfluß von α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -amino-propyl]-3,4-dimethoxyphenylacetonitril, einer coronargefäÙerweiternden Substanz, auf den Abbau von Adenin-Nucleotiden im Myokard bei Sauerstoffmangel. *Arzneimittel-Forsch.* **13**, 177 (1963).
- ⁹ — — Eine einfache Methode zur Mikrobestimmung von Phosphat in der Papierchromatographie. *Biochem. Z.* **337**, 477 (1963).
- ¹⁰ — A. FLECKENSTEIN u. E. GROSS: Der intermediäre Phosphat-Stoffwechsel des Menschen-Erythrocyten. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **266**, 528 (1958).

- ¹¹ GERLACH, E., u. K. LÜBBEN: Der Phosphat-Stoffwechsel in Tauben- und Menschen-Erythrocyten unter dem Einfluß von 2,4-Dinitrophenol, Natriumcyanid, Monojodacetat sowie von Thyroxin und Triäthylmelamin. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **269**, 520 (1959).
- ¹² — u. B. DEUTICKE: Studien über den Phosphat-Stoffwechsel in normalen und pathologischen Erythrocyten unter Verwendung von Radiophosphor (³²P). *Nucl.-Med. (Stuttg.)* **2**, Suppl. 1, 151 (1962).
- ¹³ GINSKI, J. M., J. F. THOMSON, and A. OMACHI: Phosphate release from dog erythrocytes. *Amer. J. Physiol.* **202**, 981 (1962).
- ¹⁴ GOURLEY, D. R. H.: Inhibition of uptake of radioactive phosphate by human erythrocytes in vitro. *Amer. J. Physiol.* **164**, 213 (1950).
- ¹⁵ — Glycolysis and phosphate turnover in the human erythrocyte. *Arch. Biochem.* **40**, 13 (1952).
- ¹⁶ —, and C. L. GEMILL: The effect of temperature upon the uptake of radioactive phosphate by human erythrocytes in vitro. *J. cell. comp. Physiol.* **35**, 341 (1950).
- ¹⁷ HAHN, L., and G. HEVESY: Rate of penetration of ions into erythrocytes. *Acta physiol. scand.* **3**, 193 (1942).
- ¹⁸ HALPERN, L.: The transfer of inorganic phosphorus across the red blood cell membrane. *J. biol. Chem.* **114**, 747 (1936).
- ¹⁹ HARRIS, A. J., and T. A. J. PRANKERD: Phlorhidzin and red cell phosphate turnover. *Experientia (Basel)* **14**, 249 (1958).
- ²⁰ HEVESY, G., and A. H. W. ATEN: Interaction of plasma phosphate with the phosphorus compounds present in the corpuscles. *Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Biol. Medd.* **14**, 5 (1939).
- ²¹ JEANES, J. K., and A. F. REID: Effect of oxalate on turnover of radioactive phosphate by the human erythrocyte. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **106**, 432 (1961).
- ²² KAHN, J. B., jr.: Effects of ribosides and related compounds on phosphate transport in incubated fresh and cold-stored human erythrocytes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **120**, 239 (1957).
- ²³ KOSS, F. W., G. BEISENHERZ u. R. MAERKISCH: Die Eliminierung von Adenosin aus dem Blut unter dem Einfluß von 2,6-Bis(diäthanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimido (5,4-d)pyrimidin und Papaverin. *Arzneimittel-Forsch.* **12**, 1130 (1962).
- ²⁴ KÜBLER, W., u. H. J. BRETSCHEIDER: Die Permeation von Adenosin durch die Erythrocytenmembran des Hundes. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277**, 141 (1963).
- ²⁵ LAITY, J. L. H.: The action of certain drugs on the uptake of ³²P by human erythrocytes. *Biochem. J.* **71**, 528 (1959).
- ²⁶ LEPKE, S., u. H. PASSOW: Hemmung des Kaliumverlustes fluorid-vergifteter Erythrocyten durch Komplexbildner. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 389 (1960).
- ²⁷ MILLS, G. C., and L. B. SUMMERS: The metabolism of nucleotides and other phosphate esters in erythrocytes during in vitro incubation at 37°. *Arch. Biochem.* **84**, 7 (1959).
- ²⁸ MOND, R.: Umkehr der Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen in eine elektive Durchlässigkeit für Kationen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **217**, 618 (1927).
- ²⁹ MUELLER, C. B., and A. B. HASTINGS: The rate of transfer of phosphorus across the red blood cell membrane. *J. biol. Chem.* **189**, 869 (1951).
- ³⁰ — — Glycolysis and phosphate fractions of red blood cells. *J. biol. Chem.* **189**, 881 (1951).

- ³¹ PFLÉGER, K., u. E. SEIFEN: Zur Frage der Stoffwechselabhängigkeit des Phosphatdurchtritts durch die Erythrocytenmembran. *Biochem. Z.* **335**, 595 (1962).
- ³² PRÁGAY, D.: Über die Kaliumakkumulation „reversibel hämolysierter“ menschlicher Erythrocyten. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.* **12**, 9 (1957).
- ³³ PRANKERD, T. A. J., and K. I. ALTMAN: A study of the metabolism of phosphorus in mammalian red cells. *Biochem. J.* **58**, 622 (1954).
- ³⁴ — — The effect of adenosine on the phosphate exchange in mammalian red blood cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **15**, 158 (1954).
- ³⁵ RECHENBERG, H. K. v.: Butazolidin®-Phenylbutazon, 2. Aufl. Stuttgart: G. Thieme 1961.
- ³⁶ RUMMEL, W., K. PFLÉGER u. E. SEIFEN: Die pH-Abhängigkeit der Aufnahme und Abgabe von anorganischem Phosphat am Erythrocyten. *Biochem. Z.* **330**, 310 (1958).
- ³⁷ VESTERGAARD-BOGIND, B.: The transport of phosphate ions across the human red cell membrane. II. The influence of the concentration of inorganic phosphate on the kinetics of the uptake of ³²P phosphate ions. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **66**, 93 (1963).
- ³⁸ —, and T. HESSELBO: The transport of phosphate ions across the human red cell membrane. I. The distribution of phosphate ions in equilibrium at comparatively high phosphate concentrations. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **44**, 117 (1960).
- ³⁹ WHITTAM, R.: The high permeability of human red cells to adenine and hypoxanthine and their ribosides. *J. Physiol. (Lond.)* **154**, 614 (1960).
- ⁴⁰ WILBRANDT, W.: Permeabilitätsprobleme. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. exp. Path. Pharmacol.* **212**, 9 (1950).
- ⁴¹ ZIPURSKY, A., and L. G. ISRAELS: Transport of phosphate into the erythrocyte. *Nature (Lond.)* **189**, 1013 (1961).
- ⁴² — D. MAYMAN, and L. G. ISRAELS: Phosphate metabolism in erythrocytes of normal humans and of patients with hereditary spherocytosis. *Canad. J. Biochem.* **40**, 95 (1962).

Dozent Dr. E. GERLACH und Dr. B. DEUTICKE,
Physiologisches Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Str. 7