

## Gentamicin이 적혈구막을 통한 $\text{Na}^+$ 이동에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

김 경 호 · 박 계 숙 · 김 희 진  
신 호 임 · 안 미 라 · 강 복 순

(1989년 4월 22일 접수)

— Abstract —

### Effect of Gentamicin on Sodium Transport in Human Erythrocytes

Kyung Hyo Kim, Kae Sook Park, Hee Jin Kim, Ho Im Shin,  
Mi Ra An and Bok Soon Kang

*Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine*

Gentamicin (GM) is a polybasic, aminoglycoside antibiotic used frequently for the treatment of serious gram-negative infections. The major limiting factors in the clinical use of GM as well as other aminoglycoside antibiotics are their nephrotoxicity and ototoxicity. The primary mechanism of cell injury in aminoglycoside toxicity appears to be the disruption of normal membrane function and the inhibition of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activity.

There are both indirect and direct evidences which suggests that the effect of aminoglycoside antibiotics on  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase may explain, or contribute to, their toxicity. It has been shown that aminoglycoside reduce total ATPase activity (Kaku et al., 1973) and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activity (Iinuma et al., 1967) in the stria vascularis and spiral ligament of the guinea-pig cochlea. Lipsky and Lietman (1980) reported that aminoglycoside antibiotics inhibited the activity of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase in microsomal fractions of the cortex and medulla of the guinea-pig kidney, isolated rat renal tubule and human erythrocyte ghosts.

The present investigation was undertaken to elucidate the mechanism of GM on human erythrocytes by examining its effect on  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activity, active sodium and potassium transport across red blood cell and  $^3\text{H}$ -ouabain binding to red blood cell membranes.

The results obtained are summarized as follows:

- 1) GM inhibited significantly both the activity of total ATPase and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase at all concentrations tested.
- 2) GM inhibited active  $^{22}\text{Na}$  efflux across red blood cell. When ouabain is present, the rate of  $^{22}\text{Na}$  efflux was completely inhibited. When both GM and ouabain were added, the inhibitory effect of active  $^{22}\text{Na}$  efflux was more pronounced.
- 3) Active  $^{86}\text{Rb}$  influx was inhibited significantly by GM. In the presence of ouabain, the rate of  $^{86}\text{Rb}$  influx is markedly inhibited. But  $^{86}\text{Rb}$  influx is not appreciably altered by the presence of both GM and ouabain.

\*본 연구의 일부는 연세대학교 의과대학 조교 유한연구비(1987, 1988년도)와 1988년도 기초의학 학술연구비에 의하여 이루어졌음.

4) In the presence of GM, <sup>3</sup>H-ouabain binding to red blood cell membrane increased.

From the above results, it may be concluded that the inhibition of active sodium and potassium transport across red blood cell by gentamicin appears to be due to the inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity and an increase in ouabain binding to red blood cell membranes.

## 서 론

Aminoglycoside 항생제의 일종인 gentamicin (GM)은 그람음성균 치료에 널리 사용되고 있으나 이 항생제를 장기간 사용하게 되면 합병증으로 신독성과 내이독성이 나타난다는 것이 단점으로 지적되고 있다(Bennet et al, 1976; Gary et al, 1976; Kaloyanides & Pastoriza-Munoz, 1980).

GM에 의하여 유발되는 신장과 내이독성의 발생기전은 항생제가 세포막의 integrity와 막효소의 기능에 변화를 초래하기 때문이라고 하는데 이를 요약하면 다음과 같다.

1) 세포의 괴사 : GM이 pinocytosis에 의해 세포내로 이동되면 항생제가 lysosome과 융합하여 lysosome 막을 파열시키므로써 세포의 괴사가 나타나게 된다고 하며(Johansson et al, 1982), 신장에서 aminoglycosides의 polycationic group이 신장 근위세뇨관 세포막의 aminophospholipid receptor에 결합하여 세포막을 통한 1가 또는 2가 이온 투과도를 변화시키므로써 세포가 손상될 수 있다고 한다(Trump et al, 1973; Schanne et al, 1979; Humes & Weinberg, 1980; Kaloyanides & Pastoriza-Munoz, 1980).

2) 막효소의 기능억제 : Guinea pig의 cochlea stria vascularis와 spiral ligament에 존재하는 총 ATPase 활성도(Kaku et al, 1973)와 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도(Iinuma et al, 1967)가 모두 aminoglycosides 항생제에 의해 억제된다고 하며, 개 신장의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도도 neomycin에 의해 억제되는데, 그 억제정도는 항생제의 농도에 비례하여 나타난다고 하였다.

Lipsky 및 Lietman(1980)과 Chahwala 및 Harpur(1982)는 gentamicin, neomycin, kanamycin, rybostamicin, streptomycin 및 dihydrostreptomycin

등의 aminoglycosides 항생제들도 guinea pig 신장의 피질과 수질에서 분리한 microsome 분획과 사람의 적혈구막 소편에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 억제한다고 하였다.

일반적으로 생체내 모든 조직에서 Na<sup>+</sup> 농도는 세포내액보다 세포외액에서 높고 반대로 K<sup>+</sup>의 농도는 세포외액보다 세포내액에서 높게 유지된다. 이와같은 세포내, 외의 이온농도의 경사도는 확산과정(passive transport)과 적혈구막에 존재하는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump의 동적인 평형에 의하여 유지되고 있다. 따라서 본 실험에서는 세포막의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 억제하는 것으로 알려진 GM이 세포막을 경계로 Na<sup>+</sup> 이온과 K<sup>+</sup> 이온의 이동에 어떻게 작용하는지를 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 혈액은 사람의 신선한 혈액을 사용하였으며 항생제는 gentamicin sulfate 주사액(동화약품)을 사용하였다. <sup>22</sup>NaCl, <sup>86</sup>RbCl와 <sup>3</sup>H-ouabain은 Amersham 제품(Amersham International plc, UK)을 사용하였다.

### 2. 실험방법

1) 적혈구막소편의 분리 : 적혈구막소편(red blood cell membrane fragments, RBCMF)은 Rosenberg 및 Guidotti(1968)의 방법으로 제작하였다. 즉 채혈한지 14일 이내의 사람의 혈액 450 ml에 냉각된 41의 용혈용액(0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.4)을 가하여 이 부유액을 저어주면서 0°C에서 30분간 incubation하여 용혈시킨 다음 이를 원심분리기(Sorvall Refrigerated Centrifuge, Model RC2-B, Rotor GSA)로

4°C에서 10,000 xg로 5분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거하고 적혈구막을 얻은 다음 이를 세척용액(0.1 mM EDTA; 1.7 mM Tris-HCl; 15.5 mM NaCl, pH 7.4)으로 세척하고 적혈구막이 회계될 때까지 세척 및 원심분리과정을 반복하였다. 마지막 세척시에는 적혈구막에 세척용액을 가하여 20,000 xg에서 1분간 원심분리하여 순수한 적혈구막을 얻었다. 적혈구막의 단백질농도는 Lowry등(1951)의 방법으로 측정하였다.

**2) 적혈구막소편에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도의 측정 :** Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase)의 활성도는 incubation 용액에 RBCMF를 단백질 농도가 0.5 mg%되게 첨가하여 37°C에서 3분간 preincubation 한 후, 반응액에 2 mM adenosine triphosphate (ATP)를 첨가하여 이로부터 30분간 incubation 한 다음, 11% perchloric acid 1 ml를 가하여 원심분리하여 단백질을 제거하고 상층액에 유리된 무기인산(Pi)의 양을 Fiske 및 Subbarow(1925)의 방법으로 측정하고, 각 ATPase의 활성도는  $\mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$ 로 나타내었다.

Incubation 용액의 조성은 총 ATPase의 활성도(Mg<sup>++</sup>-ATPase+Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase) 측정시에는 40 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.25 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>와 20 mM KCl(pH 7.4) 였으며 Mg<sup>++</sup> ATPase의 활성도 측정시의 incubation 용액은 총 ATPase의 활성도 측정시의 incubation 용액의 조성중 KCl 대신 20 mM choline chloride로 대체하고, 0.1 mM의 ouabain을 첨가하였다.

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도의 값은 총 ATPase 활성도의 값에서 Mg<sup>++</sup> ATPase 활성도의 값을 감하여 산출하였다. 한편 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도가 GM에 의하여 영향을 받는지를 관찰하기 위하여 incubation 용액내에 이들 항생제를 농도별로 첨가하여 효소활성도를 측정하고 대조군의 값과 비교하였다.

**3) 적혈구막에서 <sup>86</sup>Rb 유입의 측정 :** 적혈구세포에서 <sup>86</sup>Rb 유입의 측정은 Beauge 및 Ortiz(1970)의 방법에 준하여 측정하였다. 사람의 신선한 혈액을 채취하여 10%(v/v) 등장성 sodium citrate가 함유된 시험관에 옮겨 이를 4°C에서 1,500 xg로 10

분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거하고 적혈구를 모아 이를 다시 미리 냉각된 K<sup>+</sup>-free Na<sup>+</sup> Ringer 용액(mM: NaCl, 150; CaCl<sub>2</sub>, 1; MgCl<sub>2</sub>, 1; ortho-phosphoric acid, 2; pH 7.4)에 첨가하여 이 부유액을 37°C에서 10분간 preincubation 한 후 <sup>86</sup>Rb을 20  $\mu\text{Ci/ml}$ 되게 가하고 <sup>86</sup>Rb을 첨가한 시간으로부터 15, 30, 45 및 60분에 적혈구세포 부유액 1 ml씩 취하여 이를 4°C에서 10,000 xg로 5분간 원심분리하여 적혈구세포를 모아 이를 냉각된 K<sup>+</sup>-free Na<sup>+</sup> Ringer 용액으로 3번 세척하였다. 세척한 <sup>86</sup>Rb이 함유된 적혈구에 10 ml의 2차 증류수(deionized distilled water)를 가하여 적혈구세포를 용혈시키고 용혈액 1 ml를 polystyrene tube에 옮겨 gamma counter (Packard auto gamma 500)로 <sup>86</sup>Rb의 방사능을 측정하였다. 이때 incubation 용액에 ouabain (10<sup>-4</sup>M), GM 및 ouabain+GM을 첨가시 적혈구 세포내로의 능동적인 <sup>86</sup>Rb 유입에 미치는 영향을 관찰하여 대조군의 값과 비교하였다.

**4) 적혈구막에서 <sup>22</sup>Na 유출 :** 적혈구에서 <sup>22</sup>Na 유출은 Blum 및 Hoffman(1971)의 방법으로 측정하였다. 즉 사람의 신선한 혈액을 채취하여 heparin (10 IU/ml)이 함유된 시험관에 옮겨 이를 4°C에서 1,500 xg로 10분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거하고 이를 생리식염수로 3회 세척하였다. 세척된 적혈구는 hematocrit이 10%되게 <sup>22</sup>Na(20  $\mu\text{Ci/ml}$ )가 포함된 incubation 용액(mM: NaCl, 140; KCl, 10; Tris, 17; glucose, 5; pH 7.4)에 가하여 37°C에서 3시간 incubation 한 후 이 반응액을 4°C에서 15,000 xg로 5분간 원심분리하고 <sup>22</sup>Na로 labelled 된 적혈구(<sup>22</sup>Na-RBC)를 얻어 이를 glucose가 포함되지 않은 incubation 용액 20 ml에 <sup>22</sup>Na-RBC 0.3 ml를 가하여 zero time sample을 취하고 이때부터 1시간동안 37°C 수조에 incubation하면서 매 15분 간격으로 적혈구세포 부유액 3 ml씩을 취하여 이를 4°C에서 15,000 xg로 5분간 원심분리한 후 상층액 1 ml를 취하여 세포내에서 세포외로 유출된 <sup>22</sup>Na의 방사능을 gamma counter로 측정하였다.

또 적혈구세포 부유액의 전체 방사능은 11% perchloric acid 1 ml를 적혈구세포부유액 1 ml에

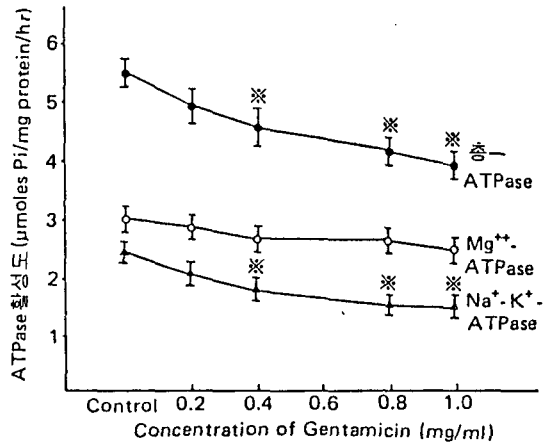
가하여 잘 혼합한 다음 이를 4°C에서 10,000 xg로 2 분간 원심분리하여 단백질을 제거하고 그 상층액 1 ml에 있는 <sup>22</sup>Na의 방사능을 gamma counter로 측정하여 계산하였다.

**5) 적혈구막에서 <sup>3</sup>H-ouabain 결합의 측정 :** 적혈구에서 <sup>3</sup>H-ouabain 결합은 Gardner 및 Kuxo (1973)의 방법으로 측정하였다. 즉 사람의 신선한 혈액을 채취하여 4°C에서 1,500 xg로 10분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거하고, 적혈구만을 모아, 이를 등장성 choline chloride로 5번, 원심분리와 세척과정을 반복하여 적혈구를 얻었다. 세척된 적혈구를 <sup>3</sup>H-ouabain(1.33 μCi/ml)이 함유된 incubation 용액(mM: NaCl, 150; Tris, 10; glucose, 11; pH 7.4)에 hematocrit이 10%되게 첨가하여 이를 37°C에서 3시간동안 incubation하였다. Incubation을 3시간 한 후 세포부유액 0.5 ml를 취하여 polystyrene tube에 옮겨 4°C에서 10,000 xg로 5분간 원심분리하고, 상층액을 버리고, 적혈구만을 모아 이를 등장성 choline chloride 용액으로 5번 세척하여 packed RBC를 가하여 잘 혼합한 후 이를 다시 4°C에서 10,000 xg로 5분간 원심분리하여 상층액 200 μl에 10 ml의 scintillation cocktail을 가하여 <sup>3</sup>H-ouabain의 방사능을 liquid scintillation spectrometer (Packard Tricarb 300)로 측정하였다.

## 실 험 성 적

### 1. GM이 적혈구막소편의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도에 미치는 영향

GM이 RBCMF의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도에 미치는 영향은 제1도에 나타내었다. 이 그림에서 보는바와 같이 대조군의 총 ATPase 활성도는 0.552±0.026 μmoles Pi/mg protein/hr인데 비해, GM을 0.2, 0.4, 0.8 및 1 mg/ml되게 첨가하므로써 총 ATPase 활성도는 각기 0.486±0.037, 0.457±0.003, 0.419±0.002 및 0.392±0.025 μmoles Pi/mg protein/hr로 감소되었다. 그러나 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성도는 대조군의 값이 0.301±0.028 μmoles Pi/mg protein/hr이며 GM을 0.2, 0.4, 0.8 및 1 mg/ml 되게 첨가시의 값은 각각 0.286±0.019, 0.260±



**Fig. 1.** Effects of gentamicin on the human erythrocyte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

Each data point represents mean ± SE from 10 experiments.

\*represents p < 0.05 compared to the control.

0.013, 0.260±0.013, 0.263±0.012 및 0.247±0.017 μmoles Pi/mg protein/hr로서 약간 감소되는 경향을 보였으나 유의있는 감소는 아니었다. 따라서 총 ATPase 활성도에서 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성도를 감하여 산출한 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도는 대조군의 값이 0.251±0.015 μmoles Pi/mg protein/hr로 GM의 농도에 비례하여 유의있게 (p < 0.05) 감소됨을 알 수 있었다.

제 2도는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도에 대한 동력학적 분석결과를 나타낸 것인데 대조군(C), GM (0.4 mg/ml) 첨가군에서 모두 효소작용은 Michaelis-Menten Kinetics (Siegel, 1975)를 따랐다. 즉  $V = V_{max}(S)/[K_m + (S)]$ , 여기서 V는 initial velocity, V<sub>max</sub>는 maximal velocity, K<sub>m</sub>은 동력학적 상수로서 V<sub>max</sub>/2 때의 ATP농도, (S)는 ATP농도를 나타낸다. 제2도의 B그림 (Hofstee plot)에서 y축의 절편은 V<sub>max</sub>를 나타내고, 그림의 경사도는 K<sub>m</sub>치를 나타낸다. 이 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 gentamicin 첨가군에서 대조군에 비하여 V<sub>max</sub>가 감소한 반면 K<sub>m</sub>치는 별 변화가 없었다.

이러한 사실은 본 실험에서 GM 첨가 후 적혈구막 단위면적당 Na<sup>+</sup> pump의 수가 감소되었을 가능성을 제시하는 결과라고 생각된다.

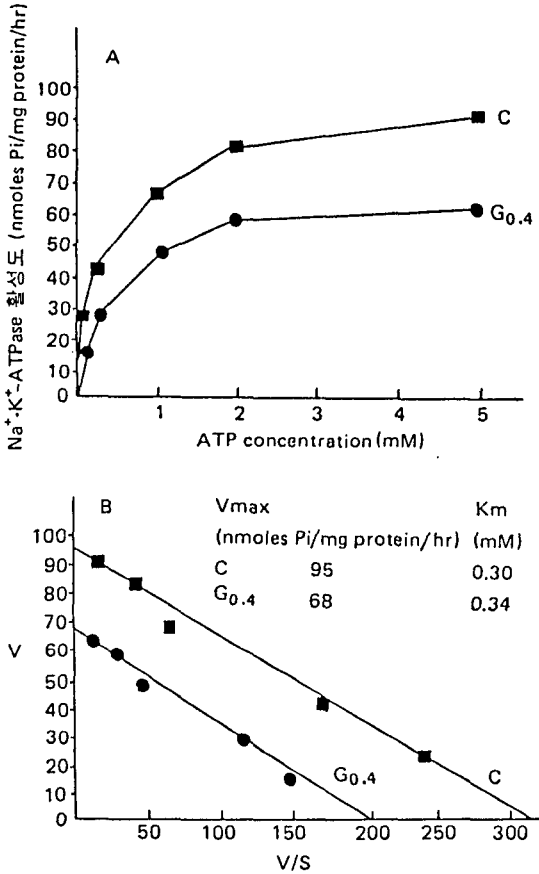


Fig. 2. Effects of ATP on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity.

A, the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity with ( ) and without ( ). GM(0.4 mg/ml) was measured versus ATP concentration.

B, Hofstee plot of data from A. V and V/S represent initial velocity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and initial velocity /ATP concentration respectively.

## 2. GM이 적혈구막을 통한 <sup>22</sup>Na 유출에 미치는 영향

GM이 적혈구막을 통한 <sup>22</sup>Na 유출에 미치는 영향은 제3도에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와같이 <sup>22</sup>Na 유출은 incubation 시간이 경과함에 따라 점차 증가되었다. 그러나 incubation medium 내에 GM을 0.2, 0.4 및 0.8 mg/ml 되게 첨가시 능동적인 <sup>22</sup>Na 유출은 대조군의 값에 비해

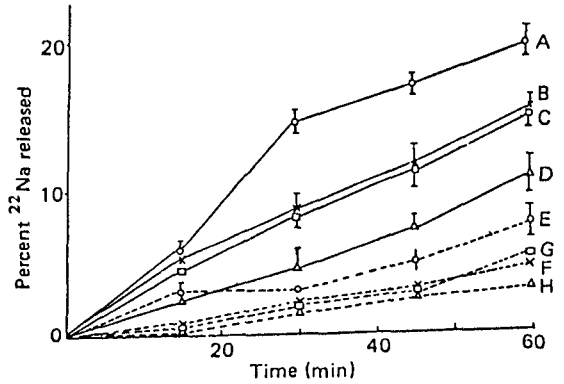


Fig. 3. Effects of GM on the active <sup>22</sup>Na efflux.

A(o-o): control  
 B(x-x): GM 0.2 mg/ml  
 C(□-□): GM 0.4 mg/ml  
 D(Δ-Δ): GM 0.8 mg/ml  
 E(o.....o): ouabain (10<sup>-4</sup> M)  
 F(X.....X): GM<sub>0.2</sub>+ouabain  
 G(□.....□): GM<sub>0.4</sub>+ouabain  
 H(Δ.....Δ): GM<sub>0.8</sub>+ouabain  
 [Na<sup>+</sup>]<sub>0</sub>=40 mM, [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub>=10mM  
 A: Pump+leak (total <sup>22</sup>Na efflux)  
 E: Leak (total <sup>22</sup>Na efflux)  
 Each data point represents mean ± SE

의의있게 감소됨을 알 수 있었다. 또한 incubation medium내에 ouabain을 첨가함으로써 적혈구막을 통한 <sup>22</sup>Na 유출은 GM 첨가시보다 더욱 감소되었으며, GM과 ouabain을 동시에 첨가시에는 GM이나 ouabain 단독 첨가시에 비해 <sup>22</sup>Na 유출의 억제 효과가 더 크게 나타났다. 제3도의 A는 pump+leak의 총 <sup>22</sup>Na 유출을 나타내고, E는 leak <sup>22</sup>Na 유출을 나타낸다. 따라서 A와 E의 <sup>22</sup>Na 유출의 차이는 pump flux를 나타내는 것으로서 GM은 ouabain과 같이 적혈구막에서 pump flux를 차단시킬 뿐 아니라 passive flux 까지도 차단시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

제4도는 제3도의 <sup>22</sup>Na 유출을 incubation 시간 경과에 따른 <sup>22</sup>Na의 적혈구내 잔류량을 나타낸 것으로서 이는  $\ln[1-(R_t/R_\infty)] = -k_{Na} \cdot t$ 의 공식으로 표시할 수 있다. 단 R<sub>t</sub>는 주어진 incubation 시간 t에 medium 내의 방사능을, R<sub>∞</sub>는 평형상태에 도달했을때 세포부유액의 전체방사능을, t는 incu-

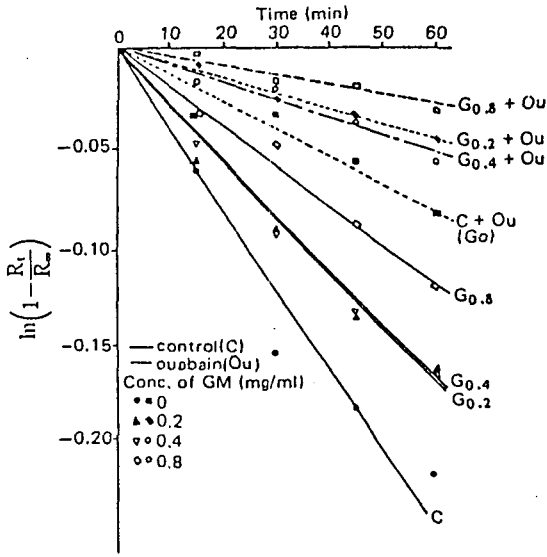


Fig. 4. Incubaion-time dependence of the residual amounts of  $^{22}\text{Na}$  in red blood cell.  $^{22}\text{Na}$  efflux, obtained from Fig. 3, was represented with relation between  $\ln(1-R_t/R_\infty)$  and incubation time

bation 시간을 그리고  $k_{Na}$ 는  $^{22}\text{Na}$  유출의 rate constant를 나타낸다.  $k_{Na}$ 는  $\ln[1-(R_t/R_\infty)]$ 와 incubation 시간과의 상관관계를 나타낸 직선의 경사도로부터 산출할 수 있다.

이 그림에서 보면 대조군의  $k_{Na}$ 는 0.29인데 반해 incubation medium 내에 GM을 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 첨가시  $k_{Na}$ 는 각기 0.17, 0.17 및 0.12로서 대조군의 값에 비하여 의의있게 감소되었고, incubation medium 내에  $10^{-4}\text{M}$ 의 ouabain을 첨가시  $k_{Na}$ 는 0.08로서 GM 첨가시보다 더 감소 되었으며, ouabain을  $10^{-4}\text{M}$ 되게 첨가하고 동시에 GM을 0.2, 0.4 및 0.8 mg/ml되게 첨가시  $k_{Na}$ 는 각기 0.045, 0.052 및 0.029로서 ouabain 단독첨가시의  $k_{Na}$  보다 더 감소되었다. 이러한 사실로 미루어 보아 GM은  $^{22}\text{Na}$ 의 능동적인 유출 즉 pump flux의 차단 뿐 아니라  $^{22}\text{Na}$ 의 leak flux의 감소에도 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

### 3. GM이 적혈구막을 통한 능동적인 $^{86}\text{Rb}$ 유입에 미치는 영향

Gentamicin이 적혈구막을 통한 능동적인  $^{86}\text{Rb}$

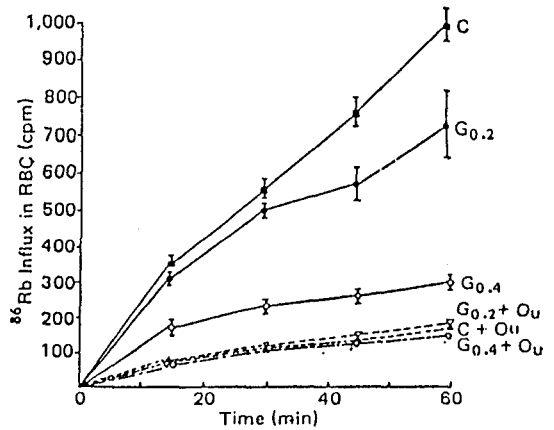


Fig. 5. Effects of GM on the  $^{86}\text{Rb}$  influx across human erythrocyte membrane.

The active  $^{86}\text{Rb}$  influx was measured through incubation time with GM, ouabain and GM± ouabain in incubation medium. Each data point represents mean ± S.E.

\* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

C: control, O: ouabain ( $10^{-4}$ )

$G_{0.2,0.4}$ : gentamicin 0.2 and 0.4 mg/ml.

유입에 미치는 실험성적은 제5도 및 제6도에 나타낸 바와 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 적혈구막을 통한  $^{86}\text{Rb}$  유입은 incubation 시간이 경과함에 따라 증가되었다. 그러나 incubation 용액에 GM을 0.2 및 0.4 mg/ml 되게 첨가할 때 능동적인  $^{86}\text{Rb}$  유입은 약물의 농도에 비례하여 감소되었다. Incubation 60분대의 값을 기준으로 항생제가 능동적인  $^{86}\text{Rb}$  유입에 미치는 영향을 대조군의 값에 대한 백분율로 나타낸 것이 제6도인데, 이 그림에서 보는 바와같이 incubation 용액에 GM을 0.2 및 0.4 mg/ml되게 첨가함에 따라 총  $^{86}\text{Rb}$  유입 (pump+exchange or leak flux)은 각각 대조군값의 72.6 및 29.5%로 의의있는 감소를 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 incubation medium에 ouabain ( $10^{-4}\text{M}$ )과 ouabain+GM (0.2 및 0.4 mg/ml)을 첨가하였을때  $^{86}\text{Rb}$  유입(leak flux)은 대조군의 16, 18 및 14%로서 ouabain과 GM에 의해 pump flux가 거의 완전히 차단되는 것을 알 수 있었다.

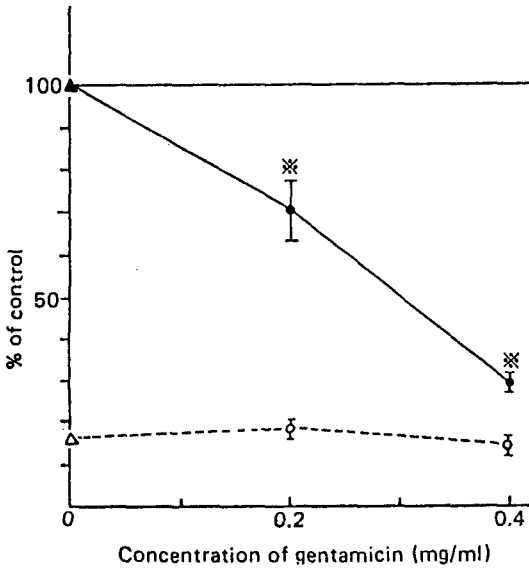


Fig. 6. Effects of GM on the <sup>86</sup>Rb influx across red blood cell membrane.

The active <sup>86</sup>Rb influx was measured at 60 minutes of incubation time with GM( ), ouabain ( ) and ouabain+GM (O··O). Each data point represents the percentage to the control ( ).

\* represents p<0.05 compared to the control.

#### 4. GM이 적혈구막의 <sup>3</sup>H-ouabain 결합에 미치는 영향

적혈구막을 통한 능동적인 <sup>22</sup>Na유출과 <sup>86</sup>Rb 유입이 GM에 의해 억제되고, transport ATPase인 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 활성도가 GM에 의해 억제 되었으므로 GM이 적혈구막에서 <sup>3</sup>H-ouabain 결합에 어떻게 영향을 미치는지를 관찰하였다.

제7도에 도시된 바와같이 GM (0.4 mg/ml)은 적혈구막에서 <sup>3</sup>H-ouabain 결합을 대조군에 비해 증가시킴을 알 수 있었다.

#### 고 찰

Aminoglycoside 항생제의 일종인 GM은 임상적으로 그람음성균 감염치료에 탁월한 효과가 있어 널리 사용되고 있으나 이 항생제를 장기간 사용시에 부작용으로 신장과 내이에 독성을 유발하게 되

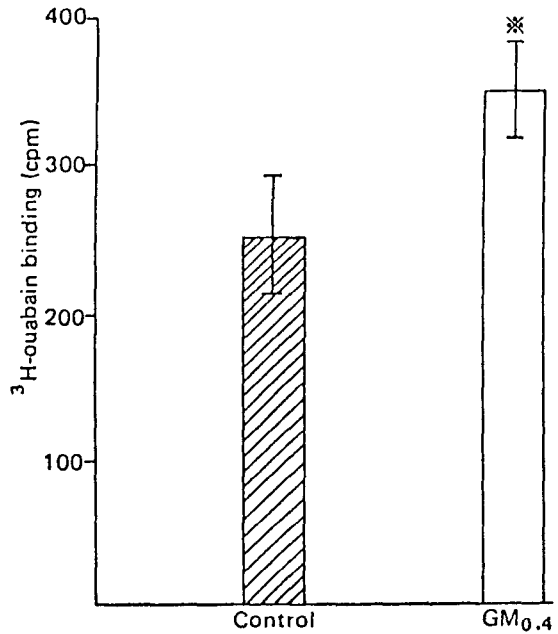


Fig. 7. Effects of GM on the <sup>3</sup>H-ouabain binding to red blood cell membrane.

In the presence of GM (0.4 mg/ml), <sup>3</sup>H-ouabain binding to red blood cell membrane was measured. Each data point represents mean ± S.E.

\* represents p<0.05 compared to the control.

는데 이와 같은 독성발생은 생체막에 존재하는 막효소의 일종인 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도의 억제가 그 원인의 하나가 될 수 있다는 것이 여러 연구자들에 의해 보고되었다. 즉 Kaku등(1973)은 guinea pig cochlea의 spiral ligament와 stria vascularis에서 총 ATPase 활성도와 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도(Iinuma등, 1967)가 aminoglycoside 항생제 투여로 억제되었음을 관찰하였으며, Lipsky와 Lietman(1980)은 개의 신장에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도가 neomycin에 의해 억제되었는데, 그 억제 정도는 투여된 neomycin의 용량에 비례한다고 하였다. 또한 1982년 Chahwala 및 Harpur는 여러 가지 aminoglycoside 즉 gentamicin, neomycin, kanamycin, rybostamicin, streptomycin 및 dihydrostreptomycin들이 모두 guinea pig 신장의 수질과 피질에서 분리한 microsome 분획에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도를 억제시키고, 사람 적혈구막의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도도 일부

GM에 의해 억제된다고 하였다. 본 연구에서도 GM은 적혈구막에서  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도를 억제하여 상기 연구자들이 관찰한 성적과 일치하였다.

Aminoglycoside 항생제에 의한  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도가 억제되는 기전에 대하여는 아직 잘 규명되고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 GM에 의한 막효소의 억제 기전이 무엇인지를 규명하기 위한 일환으로써  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도를 동력학적으로 분석한 결과(제2도), 대조군과 GM 첨가군에서 모두 효소작용은 Michaelis-Menten kinetics(Siegel, 1975)를 따랐으며, 특히  $K_m$ 치는 별 변화가 없었으나,  $V_{max}$ 치가 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 GM이 운반체와 결합하는 데는 경쟁을 하지 않지만 운반체의 turnover rate 또는 적혈구 세포의 괴사 또는 적혈구 세포막의 변형으로 막 단위 면적당  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 절대수가 감소되었음을 시사하는 결과라고 생각된다.

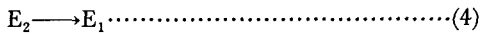
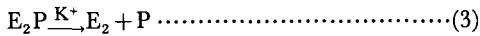
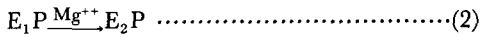
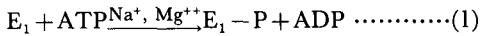
Aminoglycosides가 막의 변형을 초래한다는 실험 성적은 여러 연구자들에 의해 보고되었다. 즉 GM을 위시한 aminoglycoside 항생제들을 사용시, 이 항생제 사용상의 가장 중요한 문제는 신독성인데, 신장에서 aminoglycoside가 독성작용을 나타내는 주요 부위(primary site)가 근위세뇨관의 세포막임이 제시되었으며(Just et al, 1977), 다른 약물이나 toxin들과 마찬가지로, 신장의 brush border membrane에는 aminoglycoside 항생제가 결합할 수 있는 specific membrane binding site가 존재하여(Pert & Snyder, 1973; Gill, 1977; Just & Habermann, 1977; Lipsky et al, 1980) polybasic, cationic aminoglycosides와 세포막의 active group인 acidic, anionic phospholipids간의 charge interaction으로 막의 변형이 나타날 수 있다는 것이 제시되었다. 또 Roelfsen 및 Schatzmann(1977)과 Richards 등(1977)은 적혈구세포에 phospholipase를 첨가하여 세포막 성분중 인지질을 선택적으로 제거하면 막효소의 활성도가 감소되나 여기에 다시 인지질을 첨가하여 reconstitution 시키면 막효소의 기능이 정상으로 돌아오는 것으로 보아 막효소가 정상기능을 유지하는데 인지질이 꼭 필요하다고 하였

다. 그러므로 본 실험에서 GM이 적혈구막  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도를 억제시킨 기전은 아마도 이 항생제가 막의 polar lipid에 결합할 수 있다는 실험성적과 막지질에 GM이 결합하므로써 막의 물리화학적인 성상이 변화될 수 있다는 사실로 미루어 볼 때(Aubert-Tulkens et al, 1979; Hostetler & Hall, 1982) 아마도 GM이 막의 지질에 직접 작용하여 막지방층의 변형을 일으킴으로써  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도가 감소될 수 있을 것으로 추측할 수 있다.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 는 적혈구막에 존재하며 적혈구에서  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 의 능동적 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Skou, 1957; Glynn, 1962, 1985; Robinson & Flashner, 1979; Cantley, 1981), 이  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 의 능동적 이동은 서로 밀접하게 연관되어 있어  $\text{K}^+$ 의 유입이 일어나지 않으면  $\text{Na}^+$ 의 유출이 이루어지지 않는다. 그러므로 GM에 의한  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도의 억제는 적혈구막을 통한 능동적인  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$  이동에도 영향을 미칠 것으로 생각된다. 실제로 본 연구에서도 GM에 의해 능동적인  $^{86}\text{Rb}$  유입과  $^{22}\text{Na}$  유출이 항생제의 농도에 비례하여 의의있게 억제되었으며, 그 억제정도는  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 기능을 차단하는 ouabain 첨가시의 값(leak flux)과 유사하여 GM이 pump flux를 억제시켰음을 알 수 있었다. Ouabain과 항생제를 동시에 첨가시  $^{86}\text{Rb}$  유입의 억제는 GM 단독 첨가시와 유사하게 억제되었다. 그러나  $^{86}\text{Rb}$  유입은 GM 단독 첨가시보다 GM+ouabain 첨가시 그 억제효과가 더 증가되었다. 이 사실로 미루어보아 GM은  $^{22}\text{Na}$ 의 능동적인 유출뿐만 아니라 leak flux의 감소에도 영향을 미침을 알 수 있었다. 이미 기술한 바와같이 GM에 의한  $\text{K}^+$ 와  $\text{Na}^+$ 의 능동적인 이동의 감소가 적혈구막의 효소인  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 turnover rate의 감소로 나타날 수 있다고 생각할 수 있다. 즉 적혈구막에 부착되어 있는  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 reaction sequence(작용순서)는 다음과 같은 4단계의 반응을 거치면서 이루어지고,  $\text{Na}^+$ 은 세포내에서 세포외로,  $\text{K}^+$ 은 세포외에서 세포내로 이동된다(Post et al, 1969).



제1단계는 ATP의  $\gamma$ -인산기가 Na<sup>+</sup>과 Mg<sup>++</sup>의 존재하에 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase와 결합하여 효소가 인산화되는 과정(Na<sup>+</sup>-dependent phosphokinase reaction)이고, 제2단계는 인산화된 효소(E<sub>1</sub>-P)가 구조적 변화를 일으켜 K<sup>+</sup>과 친화력이 큰 상태인 E<sub>2</sub>-P로 변화는 과정(allosteric conversion)이며, 제3단계는 E<sub>2</sub>-P에 K<sup>+</sup>이 결합하면 효소로부터 인산기가 분리되는 과정(K<sup>+</sup>-dependent phosphokinase reaction)이고, 제4단계는 E<sub>2</sub>형의 효소가 다시 Na<sup>+</sup>과 친화력이 큰 E<sub>1</sub>으로 변화는 과정(allosteric conversion)이다.



이 4단계중 E<sub>2</sub>형의 효소가 ouabain과 친화력이 있으므로 ouabain 존재시는 K<sup>+</sup>-dependent dephosphorylation 과정이 억제된다.

Cardiac glycoside는 적혈구의 외부막에 결합하므로써(Hoffman, 1966) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 기능을 특이하게 억제하며(Dunham 및 Hoffman, 1970) 적혈구세포막을 통한 능동적인 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 이동을 억제하는 것으로 알려져 있다(Schatzmann, 1953).

또 ouabain은 적혈구세포막의 glycoside 결합부위(또는 수용체)뿐만 아니라 cation site에도 특이하게 결합하게 되는데, 이 두 부위는 서로 가까이 부착되어 있다는 것이 증명되었다(Kyte, 1972; Erdman & Schoner, 1973; Gardner & Frantz, 1974). 그러므로 본 연구에서 GM 첨가로 <sup>86</sup>Rb 유입이 억제된 것은 아마도 이 항생제가 적혈구의 막 표면에 있는 K<sup>+</sup>의 결합 부위에 대한 K<sup>+</sup>의 결합을 억제하여 적혈구막을 통한 능동적인 K<sup>+</sup>의 이동이 억제되었을 것으로 생각할 수 있다. 개에서 시행한 in vivo 실험에 의하면 요중으로 K<sup>+</sup>의 배설이 GM의 투여로 증가되었다는 보고(K<sup>+</sup> washout, Brinker 등, 1981)와, 쥐에서 시행한 in vitro 실험에서도 GM은 신세뇨관에서 <sup>86</sup>Rb uptake를 억제하였다는 보고가 있다(Chahwala & Harpur, 1982). 그러므로 본 실험에서 관찰된 GM에 의

해 <sup>86</sup>Rb 유입이 억제된 현상은 GM이 K<sup>+</sup> transport site에서 K<sup>+</sup>의 결합을 감소시킨 결과라고 추측할 수 있다. 이와 같이 K<sup>+</sup> 결합부위에서 K<sup>+</sup>에 대한 결합이 감소되면 K<sup>+</sup>-dependent dephosphorylation 과정이 억제되고(Alberts et al, 1968; Sen et al, 1969; Siegek et al, 1969; Hansen, 1971), 따라서 Na<sup>+</sup>과 친화력이 큰 E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub> 상태로 돌아가는 과정이 억제됨에 따라 전반적인 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 turnover rate가 감소됨으로써 <sup>22</sup>Na 유출도 감소될 수 있을 것으로 추측할 수 있다.

이와같이 GM에 의해 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 활성도가 억제되고, K<sup>+</sup>의 유입이 감소되는 것으로 보아 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 기능을 억제하는 ouabain의 결합에도 GM이 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측할 수 있다. Ouabain과 같은 cardiac glycoside는 E<sub>2</sub> 형의 효소 또는 E<sub>2</sub>-P 형과 친화력이 있다는 것은 이미 기술하였는데 Glynn(1962)은 세포외액내 K<sup>+</sup>의 농도를 증가시키에 따라 cardiac glycoside에 의한 K<sup>+</sup> 유입의 억제현상이 감소됨을 관찰하고, 이는 cardiac glycoside 분자와 K<sup>+</sup> 이온이 K<sup>+</sup> transport site에 대해 서로 경쟁적으로 작용하기 때문이라고 하였으며 또 적혈구막을 통한 K<sup>+</sup>의 유입과 <sup>3</sup>H-ouabain 결합은 서로 반비례관계가 있어 <sup>3</sup>H-ouabain 결합이 증가되면 K<sup>+</sup>의 세포내로의 이동이 감소된다고 하였다(Gardner & Conlon, 1972; Gardner & Kuxo, 1973; Joiner & Lauf, 1978).

본 실험에서도 GM 첨가로 인해 K<sup>+</sup>의 유입은 감소되고, 적혈구막에서 ouabain 결합이 GM 첨가로 증가되었다. 따라서 GM 첨가로 인해 K<sup>+</sup> transport site에 대한 K<sup>+</sup>의 결합도 감소되고, 이에 따라 cardiac glycoside는 cardiac glycoside 결합부위 뿐만 아니라 K<sup>+</sup> transport site에도 결합하므로써 <sup>3</sup>H-ouabain 결합이 증가되었을 것으로 추측할 수 있다.

그러나 본 실험결과만으로도 GM의 적혈구막효소의 억제작용, <sup>86</sup>Rb 유입, <sup>22</sup>Na 유출 및 ouabain 결합의 기전을 설명할 수는 없으며, 세포내 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>, 세포외의 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup> 등의 농도를 변화시켰을 때 효소의 turnover rate와 ouabain 결합이 GM에 의해 어떻게 영향을 받는지는 앞으로 더

추구되어야 할 과제라고 생각된다.

### 결 론

Gentamicin은 aminoglycoside 항생제의 일종으로 그람음성균 치료에 사용되는 약물이나 단점은 신장과 내이에 독성을 유발하는 것이다. 이러한 독성의 발생은 세포막 효소인  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도의 억제가 그 원인중의 하나임이 제시되었다.

따라서 본 실험에서는 세포막의  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도를 억제하는 것으로 알려진 GM이 세포막을 경계로  $\text{Na}^+$ 와  $\text{K}^+$ 의 이동 및 적혈구막  $^3\text{H-ouabain}$  결합에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) GM은 적혈구막소편의 막효소인  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도를 억제시켰으며 그 억제효과는 GM의 농도에 비례하였다.

2) 적혈구막을 통한 능동적인  $^{22}\text{Na}$  유출은 GM에 의해 억제되었으며 ouabain과 GM을 동시에 첨가시 각각의 약물을 단독으로 첨가시보다 억제효과가 더 크게 나타났다.

3) GM은 능동적인  $^{86}\text{Rb}$  유입을 억제시켰으며, ouabain과 GM을 동시에 첨가하였을 때 그 억제효과는 GM 단독 첨가시와 유사하였다.

4) GM은 적혈구막에서  $^3\text{H-ouabain}$  결합을 증가시켰다.

이상의 성적으로 미루어 볼 때 GM에 의한 능동적인  $^{22}\text{Na}$  유출과  $^{86}\text{Rb}$  유입의 억제는 막효소인  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  활성도의 감소와 적혈구막에서  $^3\text{H-ouabain}$  결합의 증가에 기인한다고 생각된다.

### REFERENCES

Albers RW, Koval GJ & Siegel GJ (1968). Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-postassium-activated adenosine triphosphatase. *Mol Pharmacol* 4, 324-326

Aubert-Tulkens G, Van Hoof F & Tulkens P (1979). Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in

cultured rat fibroblasts. *Lab Invest* 40, 481-491

Beauge LA & Ortiz O (1970). Rubidium, sodium and ouabain interaction on the influx of rubidium in rat red blood cells. *J Physiol* 210, 519-532

Bennet WM, Hartentt MN, Gilbert D, Houghton DC & Poster GA (1976). Effect of sodium intake on gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 151, 736-738

Blum RM & Hoffman JS (1971). The membrane locus of  $\text{Ca}^{*}$ -stimulated  $\text{K}^+$  transport in energy depleted human red blood cells. *J Memb Biol* 6, 315-328

Brinker KR, Bulger RE & Dobyen DC (1981). Effect of potassium depletion on gentamicin nephrotoxicity. *J Lab Invest* 98, 292-301

Cantley LC (1981). Structure and mechanism of the  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ . *Current Topics in Bioenergetics* 1, 201-237

Chahwala SB & Harpur ES (1982). An investigation of the effects of aminoglycoside antibiotics on  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  as a possible mechanism of toxicity. *Res Comm Chem Path Pharmacol* 35, 63-78

Dunham PB & Hoffman JF (1970). Partial purification of the ouabain binding component and of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  from human red cell membranes. *Proc Nat Acad Sci USA* 66, 936-943

Erdman E & Schoner W (1973). Ouabain-receptor interaction in  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  preparations. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim Biophys Acta* 330, 302-315

Fiske CH & Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66, 375-400

Gardner JD & Conlon YP (1972). The effect of sodium and potassium on ouabain binding by human erythrocytes. *J Gen Physiol* 60, 609-629

Gardner JD & Frantz C (1974). Effects of cations on ouabain binding by intact human erythrocytes. *J Memb Biol* 16, 43-64

Gardner JD & Kuxo DR (1973). Ouabain binding and cation transport in human erythrocytes. *J Clin Invest* 52, 1845-1851

Gary NE, Buzzeo L, Sjolaki J & Eisinger RP (1976). Gentamicin-associated acute renal failure. *Arch Intern Med* 126, 1101-1104

Gill DM (1977). Mechanism of action of cholera toxin.

- Adv Cyclic Nucleotide Res* 8, 85-118
- Glynn IM (1962). Activation of adenosine triphosphatase activity in a red cell membrane by external potassium and internal sodium. *J Physiol* 160, 189-199
- Glynn IM (1985). The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-transporting adenosine triphosphatase. In: *The Enzymes of Biological Membranes*, 2nd ed. vol 3. Membrane Transport, ed Martonosi AN pp35-114, New York, Plenum Press
- Hansen O (1971). The relationship between G-strophantidin-binding capacity and ATPase activity in plasma membrane fragments from ox brain. *Biochim Biophys Acta* 233, 122-132
- Hoffman JF (1966). The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am J Med* 41, 666-680
- Hostetler KY & Hall LB (1982). Aminoglycoside antibiotics inhibit lysosomal phospholipase A and E from rat liver in vitro. *Biochim Biophys Acta* 710, 506-509
- Humes HD & Weinberg JM (1980). Ionophore A23187 induced reductions in toad urinary bladder epithelial cell oxidative phosphorylation and viability. *Pflugers Arch* 388, 217-220
- Iinuma T, Mizukoshi O & Daly JF (1967). Possible effects of various ototoxic drugs upon the ATP-hydrolyzing and spiral ligament of the guinea pig. *Laryngoscope St Louis* 77, 159-170
- Johansson P, Josefsson JO & Nassberger L (1982). Induction of pinocytosis by aminoglycosides antibiotics. *Br J Pharmacol* 77, 431-442
- Joiner CH & Lauf PK (1978). The correlation between ouabain binding and potassium pump inhibition in human and sheep erythrocytes. *J Physiol* 283, 155-175
- Just M, Erdman G & Habermann E (1977). The renal handling of polybasic drugs. I. Gentamicin and aproinin in intact animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 300, 57-66
- Just M & Habermann E (1977). The renal handling of polybasic drugs. In vitro studies with brush border and lysosomal preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 300, 67-76
- Kaku Y, Farmer JC & Hudson WR (1973). Ototoxic drug effects on cochlear histochemistry. *Arch Stobar* 98, 282-286
- Kaloyanides GJ & Pastoriza-Munoz E (1980). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 18, 571-575
- Kyte J (1972). Properties of the two polypeptides of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 247, 7642-7649
- Lopsky JJ, Cheng L, Sacktor B & Lietman PS (1980). Gentamicin uptake by renal tubule brush border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 215, 390-393
- Lipsky JJ & Lietman PS (1980). Neomycin inhibition of adenosine triphosphatase. Evidence for a neomycin-phospholipid interaction. *Antimicrob Agents Chemother* 18, 532-535
- Lowry OH, Rosebrough ND, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Pert CB & Snyder SH (1973). Demonstration on nervous tissues. *Science* 179, 1011-1014
- Post RL, Kume S, Tobin T, Orcutt B & Sen AK (1969). Flexibility of an active center in sodium plus potassium adenosin triphosphatase. *J Gen Physiol* 54, 3065-3265
- Richards DE, Vidal JC, Garrahan PJ & REga AF (1977). ATPase and phosphatase activities from human red cell membranes: I. The effects of phospholipases on Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymatic activities. *J Memb Biol* 35, 125-130
- Robinson JD & Flashner MS (1979). The (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochim Biophys Acta* 549, 145-176
- Roelfsen B & Schatzmann HJ (1977). The lipid requirement of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase in the human erythrocyte membrane as studied by various highly purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 464, 17-36
- Rosenberg SA & Guidotti G (1968). The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization and partial characterization. *J Biol Chem* 243, 1985-1992
- Schanne FAX, Kane AB & Young EE & Farber SL (1979). Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway, *Science* 206, 700-702
- Schatzmann HJ (1953). Hezrglyeoside als Hemmstoffe fur den aktiven kalium und natrium transport durch die erythorcytenmembran. *Helv Physiol Pharmac Acta* 11, 346-354

- Sen AK, Tobin KT & Post RL (1969). A cycle of ouabain inhibition of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 244, 6596-6604
- Siegel GJ, Koval GJ & Albers RW (1969). Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. VI. Characterization of the phosphoprotein formed from orthophosphate in the presence of ouabain. *J Biol Chem* 244, 3264-3269
- Siegel IH (1975). Enzyme kinetics. Wiley Interscience.
- Skou JC (1957). The influence of some cations on the adenosine triphosphate from peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 23, 394-407
- Trump BF, Strum JM & Bulger RF (1973). Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. *Virchows Arch B Cell Pathol* 16, 1-34