

부자 Butanol Fraction 이 가토 심장근 Microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 활성도에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 약리학교실

신상구 · 임정규 · 박찬웅 · 김명석

=Abstract=

The effect of Aconiti tuber butanol fraction on the rabbit heart microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase activity

S.G. Shin, J.K. Lim, C.W. Park, M.S. Kim

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Aconiti tuber butanol fraction shows positive inotropic effect on the isolated atrium of rabbit heart. To investigate the mechanism, the effect on microsomal ATPase activity of rabbit heart is observed.

The microsomal fraction which contains the Na⁺-and K⁺-activated ATPase in the presence of Mg²⁺ is isolated from the left ventricle of rabbit heart. The microsomal ATPase activity is maximally stimulated at Na⁺ and K⁺ concentration of 100 mM and 10 mM respectively.

Microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase is inhibited by ouabain and Aconiti tuber butanol fraction. Ouabain and Aconiti tuber butanol fraction depress Na⁺-stimulation on microsomal ATPase activity, and the inhibitory effects are not completely reversed at Na⁺ concentration of 300 mM. Also, K⁺-stimulation on microsomal ATPase activity is inhibited by ouabain and Aconiti tuber butanol fraction and the inhibitions are not completely reversed at K⁺ concentration of 30 mM.

It is, therefore, suggested that the inhibitory effect of Aconiti tuber butanol fraction on the microsomal ATPase activity may contribute to leading to the positive inotropic effect.

서 론

기존 강심배당체는 cardenolide 와 bufadienolide 로 대별되는 steroid 배당체로써 이들의 강심작용에 대해서는 세포 및 세포하 구조에 있어서의 많은 연구로 그 기전이 밝혀지고 있으나 아직도 논란의 여지는 많다.

1957년 Skou²⁾가 신경 세포막에서 ATP 분해효소계의 존재를 보고한 이래, 기존강심배당체는 강심효과를 나타내는 농도에서 심근세포내 Na⁺-K⁺-activated ATPase 를 선택적으로 억제한다는 보고^{6,9,21)}들이 있으며, 또한 강심효과와 Na⁺-K⁺-activated ATPase 의 억제정

도 및 동물의 종에 따른 강심배당체에 대한 감수성과 ATPase 억제 정도는 일치한다는 보고들이 있다^{17,21)}. 따라서 이러한 강심배당체의 심장근 Na⁺-K⁺-activated ATPase 에 대한 선택적인 억제가 강심효과를 초래하는 과정은 명백히 규명되지는 못했으나 강심기전의 일 부이리라 추정되고 있다^{16,21,23)}.

한편 1958년 矢數³⁾는 부자(Aconiti tuber)에서 독성이 이미 잘 알려진 alkaloids 를 제거한 분획이 개구리 적출심장에서 강심효과를 보고한 바 있고, 1970년 김동¹⁾은 이를 제검토하고 이 강심분획은 n-butanol 층으로 이행된다고 하였다. 또한 최근 홍등⁵⁾은 가토 적출심 방에서 부자 butanol fraction 이 기존 강심배당체인

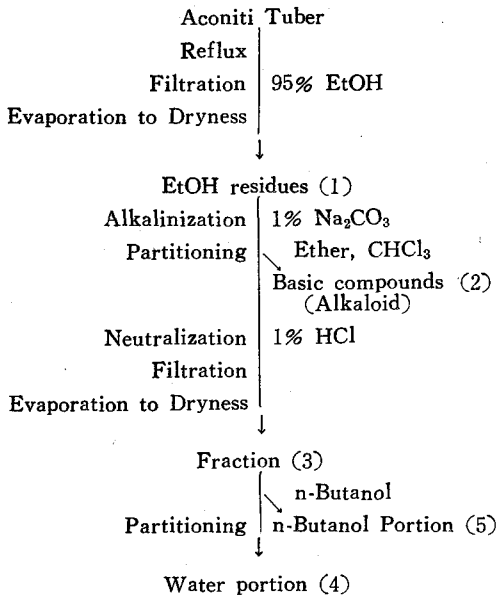


Fig. 1. Extraction of Aconiti tuber butanol fraction.

ouabain 보다 강심작용 출현시간의 신속함과 현저한 강심효과를 보고하였고, 竹本등⁴⁾은 부자 butanol 분획중의 강심성분은 기존 강심배당체와는 다른 골격의 배당체이리라 추정하였다.

본 연구에서는 부자 butanol fraction의 강심작용기전 추구의 일환으로 부자 butanol fraction 과 기존 강심약물인 ouabain 을 사용하여 가토 심장근 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법 및 재료

1. 부자 butanol fraction; 부자 butanol fraction [AF(5)]는 초오두(草烏頭 : Aconitum volubile Pallas var. pubescens Regel)를 Fig. 1에서와 같이 처리하여 n-butanol 로 이행되는 분획을 건조시켜 실험에 사용하였다.

2. 가토 좌심실근 microsomal ATPase 의 분리 : 체중 1.8~2.4 kg 내외의 가토의 두부에 타격을 가하여 급사시킨 후 신속히 심장을 적출하여 좌심실을 분리하고 잘게 썰후 9배(W/V)의 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA 용액에 넣어 Macro Waring blender 로 35~40 초 6회 homogenation 하여 10%(W/V) 균질액을 만들고 microsomal ATPase 의 분리는 Matsui 및 Schwartz¹⁰⁾의 방법에 준하였으며 0.1% deoxycholate 로 2회 처리하여 얻은 잔사에 2 M NaI 를 처리하여 잔사

에 남아 있는 mitochondria 의 양을 감소시킨 후^{11,12)} 얻은 잔사를 1 mM EDTA 용액에 부유시켜 -20°C 에 보관하였다.

이때 microsomal ATPase 의 단백질량의 측정은 biuret method 에 의거하였다.

3. Microsomal ATPase 의 활성도의 측정 : 각 반응액은 microsomal ATPase 150 μg 의 단백질량과 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA-tris 를 함유하는 50 mM Tris-HCl buffer (pH:7.4)로 NaCl 과 KCl 의 농도는 각 실험에 따라 지시하는 농도로 하였다(Mg²⁺-ATPase 의 활성도의 측정은 Na⁺, K⁺를 함유치 않는 반응액을 사용하였다). 이 반응액에 실험약물을 첨가한 후 37°C 의 항온 수욕조상에서 5분간 전처리 후 25 mM Tris-ATP 0.1 ml 를 가하여 반응액의 전량을 1 ml 되게한 후 반응을 시작시켜 20분간 37°C 항온 수욕조상에서 반응시킨 후 찬 10% trichloroacetic acid 1 ml 을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응 종료액을 3,000 r.p.m 으로 3분간 원심분리 하고 1 ml 를 취하여 반응시간 동안 유리된 무기인(Pi)을 Horwitz¹³⁾의 방법에 의해 측정하였다. Microsomal ATPase 의 활성도는 시간당 ATPase 단백질량 1 mg 이 유리시키는 무기인(Pi) μmoles 을 specific activity 로 하여 표시하였다.

실험 결과

1. 부자 Butanol fraction 및 Ouabain 이 Microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 활성도에 미치는 영향

Tris-HCl buffer 반응액내의 Na⁺ 및 K⁺의 농도는 100 mM, 10 mM 로 하고 부자 butanol fraction 과 대조약물인 ouabain 의 농도를 증가시켰을 때, 이에 따른 microsomal ATPase 의 활성도를 측정하였다.

대조약물인 ouabain 농도의 증가에 따른 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 의 활성도는 Fig. 2와 같으며, ouabain 10⁻⁶M 이상의 농도에서 통계적으로 유의미(p<0.01)한 ATPase 활성도의 억제를 나타내었고, ouabain 10⁻³M 의 농도에서는 ATPase 의 활성도가 ouabain 등 기존 강심배당체에 의해 억제되지 않는다고 알려진 Mg²⁺-dependent ATPase 의 활성도와 거의 비슷하였다.

부자 butanol fraction 은 Fig. 3에서와 같이 10⁻⁵gm/ml 이상의 농도에서 통계적으로 유의미(p<0.01)하게 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 의 활성도를 억제하였으며, 10⁻³gm/ml 의 농도부터는 급격한 환

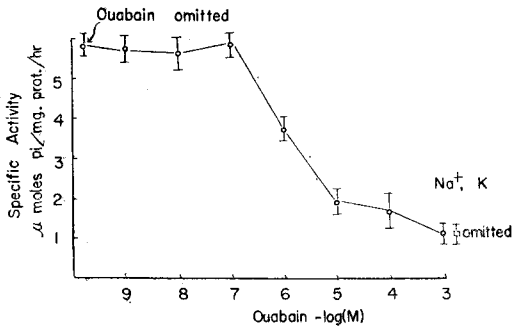


Fig. 2. The effect of ouabain on the rabbit heart microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase activity. The enzyme (150 μg protein) was added to the medium which contained ouabain just prior to the preincubation. Incubation medium; tris-buffer 50 mM (pH 7.4), EDTA-tris 1mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, tris-ATP 2.5 mM and total volume 1ml. Each point is the mean ± S.E. of 8 experiments.

성도의 억제를 나타내었고, 10⁻²gm/ml의 농도로 첨가된 반응에서의 Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성도는 Mg²⁺-dependent ATPase의 활성도와 거의 동일하였다.

Microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성도는 Table 1. 에서와 같이 ouabain 4.8×10⁻⁶M, 부자 butanol fraction 4.4×10⁻³gm/ml의 농도에서 반감되었다.

2. Na⁺, K⁺ 농도 증가에 따른 Microsomal ATPase

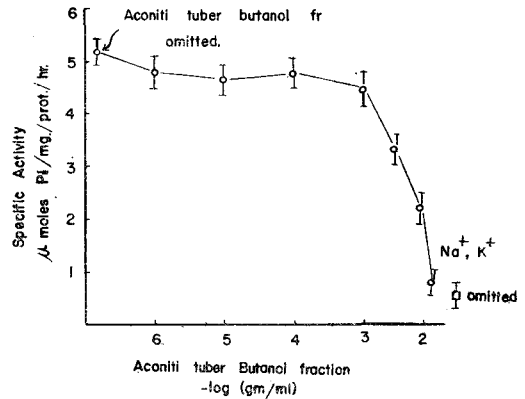


Fig. 3. The effect of Aconiti tuber Butanol fraction on the rabbit heart microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase activity. Incubation medium; tris-buffer 50 mM (pH 7.4), EDTA-tris 1 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM and tris-ATP 2.5 mM. Each point is the mean ± S.E. of 8 experiments.

활성도의 변화 및 이에 대한 부자 Butanol fraction 과 Ouabain의 영향

i) Na⁺농도의 증가 : Na⁺의 농도증가에 따른 Na⁺이 microsomal ATPase활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 전반응액의 K⁺의 농도는 10 mM로 하고 Na⁺의 농도를 0 mM에서 300 mM까지 변화시켜 microsomal ATPase의 활성도를 측정하고 동시에 약물첨가 하에서의 microsomal ATPase의 활성도를 측정하였다.

Fig. 4, 5에서와 같이 반응액내의 Na⁺ 농도증가에 따라 microsomal ATPase의 활성도의 증가는 현저하였

Table 1. The effect of ouabain and Aconiti tuber butanol fraction on the rabbit heart microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase activity

Ouabain (-logM)	ATPase activity*	% inhibition	Aconiti (-log gm/ml)	ATPase activity*	% inhibition
9	5.74±0.29	1.71	6	4.80±0.20	7.51
8	5.33±0.34	8.73	5	4.68±0.12	9.83
7	5.61±0.25	3.94	4	4.78±0.07	7.90
6	3.78±0.19	35.27	3	4.50±0.15	13.29
5	1.95±0.19	66.61	2.52	3.31±0.15	36.22
4	1.68±0.30	71.23	2.15	2.21±0.09	57.42
3	1.15±0.07	80.31	2	0.69±0.10	86.71
Half inhibition dose : 4.8×10 ⁻⁶ M			Half inhibition dose : 4.4×10 ⁻³ gm/ml		

*; Value is expressed as mean ± S.E. of μmoles Pi/mg. prot./hr.

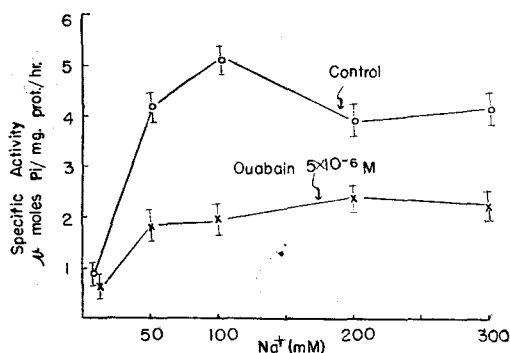


Fig. 4. The effect of ouabain on the rabbit heart microsomal ATPase activity with changing concentration of Na⁺. Incubation medium; tris-buffer 50mM(pH 7.4), EDTA-tris 1 mM, KCl 10mM, MgCl₂ 5mM, and tris-ATP 2.5mM. Each point is the mean±S.E. of 4 experiments.

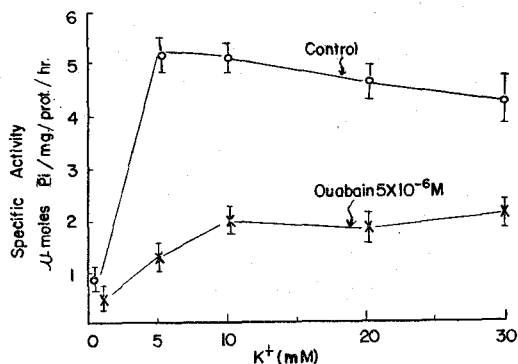


Fig. 6. The effect of ouabain on the rabbit heart microsomal ATPase activity with changing concentration of K⁺. Incubation medium; tris-buffer 50 mM(pH 7.4), EDTA-tris 1 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM and tris-ATP 2.5 mM. Each point is the mean±S.E. of 4 experiments.

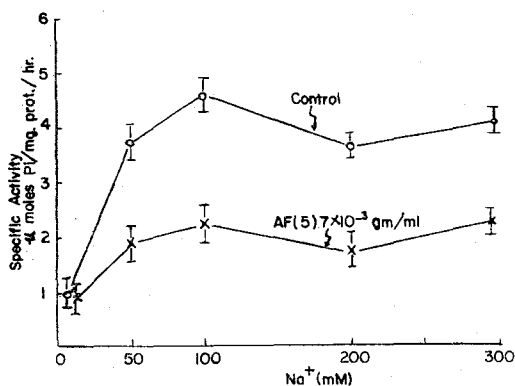


Fig. 5. The effect of Aconiti tuber butanol fraction on the rabbit heart microsomal ATPase activity with changing concentration of Na⁺. Incubation medium; tris-buffer 50mM(pH 7.4), EDTA-tris 1 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM and tris-ATP 2.5 mM. Each point is the mean±S.E. of 7 experiments.

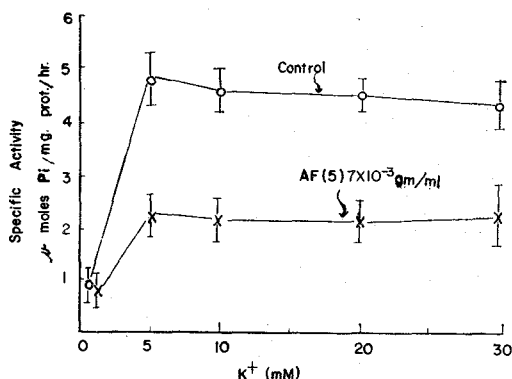


Fig. 7. The effect of Aconiti tuber butanol fraction on the rabbit heart microsomal ATPase activity with changing concentration of K⁺. Incubation medium; tris-buffer 50 mM(pH 7.4), EDTA-tris 1 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM and tris-ATP 2.5 mM. Each point is the mean±S.E. of 7 experiments.

고, Na⁺ 100 mM에서 가장 높은 활성도를 보였으며, microsomal ATPase에 대한 Na⁺-activation은 통계적으로 유의미(p<0.005)하였다. 대조실험과 동일한 반응액내에 ouabain(Fig. 4) 및 부자 butanol fraction(Fig.

5)의 농도를 5×10⁻⁶M, 7×10⁻³gm/ml로 첨가한 경우에는 microsomal ATPase에 대한 Na⁺의 활성화는 현저히 억제되었고 이는 통계적으로 유의미하였다. Na⁺의 농도를 증가시켰을 때 약물에 의한 microsomal

Table 2. The effects of Aconiti tuber butanol fraction, ouabain on the rabbit heart microsomal ATPase activity with changing concentration of Na⁺, K⁺

A) Ouabain		B) Aconi tituber butanol fraction			
Na ⁺ conc.	K ⁺ conc.	Control ATPase activity. mean±S.E.	A+Oub.(5×10 ⁻⁶ M) mean±S.E.	Control ATPase activity mean±S.E.	A+AF(5)(7×10 ⁻³ gm/ml)mean±S.E.
0	10	0.85±0.06	0.65±0.10	0.96±0.27	0.58±0.20
50	10	4.22±0.05	1.87±0.23	3.78±0.46	2.05±0.19
100	10	5.18±0.07	2.00±0.18	4.77±0.26	2.10±0.23
200	10	3.93±0.16	2.42±0.10	3.63±0.10	1.83±0.20
300	10	4.52±0.16	2.28±0.13	4.17±0.17	0.26±0.20
100	0	0.83±0.07	0.53±0.11	0.93±0.22	0.90±0.21
100	5	5.28±0.15	1.36±0.11	5.04±0.38	2.26±0.16
100	10	5.18±0.07	2.00±0.18	4.77±0.27	2.10±0.23
100	20	4.64±0.19	1.89±0.12	4.53±0.19	2.26±0.22
100	30	4.27±0.49	2.14±0.10	4.37±0.48	2.38±0.49

* Values are expressed as μmoles pi/mg · protein/hr.

Oub=Ouabain

AF(5)=Aconiti tuber butanol fraction

Each value is the mean±S.E. of 4 experiments for ouabain, 7 experiments for Aconiti tuber butanol fraction.

ATPase 활성도 억제는 감소하는 양상을 보였으나, 300 mM Na⁺ 농도에서도 활성도는 완전히 역전되지 못했다.

ii) K⁺농도의 증가: K⁺농도의 증가에 따른 microsomal ATPase의 활성도의 변화를 관찰코자 전반응액 내의 Na⁺의 농도는 100 mM로 하고 K⁺의 농도를 0 mM에서 30 mM까지 변화시켜 본 바 Fig. 6, 7에서와 같이 K⁺농도 증가에 따른 microsomal ATPase에 대한 K⁺-activation은 통계적으로 유의미하였다. 반응액 내의 약물의 농도를 부자 butanol fraction 7×10⁻³gm/ml (Fig. 7), ouabain 5×10⁻⁶M (Fig. 6)로 하였을 때 microsomal ATPase에 대한 K⁺의 활성화는 유의미하게 억제되었고 K⁺의 농도증가에 따라 억제는 감소하는 듯하나 K⁺의 농도를 30 mM로 증가시켜도 microsomal ATPase의 활성도는 역전되지 못했다.

고 찰

기존 강심배당체의 강심기전 규명에 있어서는 그 동안 세포 및 세포하 실험등으로 많은 진전을 보이고 있으나 최근 강심작용이 현저하며 기존 강심 배당체와는 구조를 달리하는 배당체라고 추정¹⁹되는 부자 butanol fraction의 강심작용에 대한 실험은 김등(1973)²⁰과 홍등(1975)²¹에 의해 행해졌을 뿐 이들의 강심기전에 대한 연구는 없었다.

심장근의 수축현상은 세포막 흥분후 심근세포내의 유

리 Ca²⁺ 농도 증가를 동반하며, sarcoplasmic reticulum이 세포내 Ca²⁺농도 조절에 주역할을 담당하며 Ca²⁺이 심근 excitation-contraction coupling의 과정에서 actin-myosin 상호작용을 유도하여 심근수축이 일어난다는 사실은 명백해진 듯하다¹⁷. 심장근에서는 골격근에 비해 sarcoplasmic reticulum이 풍부치 못하며, Ca²⁺의 세포내 분포가 골격근과는 다르다는 보고등으로 심근 excitation-contraction coupling 현상에 있어서 중요한 역할을 하는 세포내 Ca²⁺농도 조절에 있어서 sarcoplasmic reticulum 이외에 plasma membrane이 관여 하리라 시사되고 있다^{14,16}. 기존 강심배당체는 Bailey 등(1969)²²의 보고에 의하면 세포내 Ca²⁺ pool의 증가를 일으킨다 하며 많은 연구자들이 기존 강심배당체의 작용기전은 세포내 Ca²⁺의 결합이나 이동의 변화를 초래함으로써 이루어지리라 시사하고 있다^{16,17,23}. 또한 Lee¹²등은 digitalis 강심배당체는 Ca²⁺이 sarcoplasmic reticulum으로 능동이동이 일어나는 과정에 직접적인 영향을 주지 않는다 하여, 강심배당체가 세포내 Ca²⁺ pool에 영향을 미치는 원차적인 인자는 세포막에 존재할 가능성이 농후해지고 있다.

Skou(1957)²⁴가 신경세포막에서 Na⁺-K⁺-activated ATPase의 존재를 보고한 이후 기존 강심배당체들은 Na⁺-K⁺-ATPase의 활성도를 선택적으로 억제하며 이러한 억제현상은 활성 강심배당체에 한하며 강심배당체의 비활성 유도체에서는 나타나지 않는다는 많은 보고가 있었다^{2,6,8,9,14,18,25}. 또한 강심배당체의 심근 mi-

rosomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화도 억제 정도는 강심효과의 크기와 비례한다는 보고들이^{6,9,21)} 많으며 실험동물의 종에 따른 강심배당체에 대한 감수성의 정도도 ATPase 활성화의 억제 정도와 비례한다는 보고^{17,21)} 등으로 Repke(1964)²¹⁾는 심근 Na⁺-K⁺-activated ATPase가 강심배당체의 원차적인 수용체이리라는 가정을 내세웠다. 본 실험에서도 대조약물인 ouabain (Fig. 2)과 부자 butanol fraction(Fig. 3)은 가토 심장근 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화도를 억제하였으며, 부자 butanol fraction의 ATPase 활성화도 억제농도는 홍등(1975)⁹⁾의 가토 심방근에서 강심효과를 나타내는 농도와 부합하였으며 부자 butanol fraction의 강심효과와 Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화도 억제 정도는 비례함을 보였다.

Skou(1960)²³⁾, Lee 등(1964)¹⁸⁾은 microsomal ATPase는 Na⁺과 K⁺에 의해 활성화되며 기존 강심배당체는 microsomal ATPase에 대한 Na⁺-K⁺의 activation을 차단한다고 보고하고 있으며, Schwartz²⁸⁾는 Na⁺의 농도증가에 따른 ATPase의 활성화도 증가양상은 sigmoid 곡선으로 나타나며 이러한 현상은 K⁺이 Na⁺-activation 부위에서 Na⁺에 대해 경쟁적으로 작용하기 때문이며 기존 강심배당체가 Na⁺-K⁺-activation에 가성비가역적(pseudo-irreversible)으로 억제를 보이는 것은 이들 이온에 의한 microsomal ATPase의 활성화를 allosteric inhibition 하기 때문이라 설명하고 있다. 본 실험에서 microsomal ATPase의 활성화도는 Na⁺, K⁺에 의해 항진되었으며 ouabain(Fig. 4, 6) 및 부자 butanol fraction(Fig. 5, 7)은 microsomal ATPase에 대한 Na⁺-K⁺-activation을 억제하였으며 Na⁺, K⁺의 농도 증가로 억제는 경감되었으나 원래의 활성화도로 완전히 회복되지는 못했다.

Repke(1964)²¹⁾와 Langer 등(1970)¹⁵⁾은 강심배당체에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase 활성화도 억제는 세포내 Na⁺의 농도증가를 초래할 것이며, 세포내 증가된 Na⁺이 세포내 Ca²⁺ 결합부위에 경쟁적으로 작용하거나 세포내로의 Ca²⁺ 유입을 증가시킴으로써 세포내 유리 Ca²⁺ 농도를 증가시켜 강심효과를 나타내리라 추정하고 있으며, Baker(1969)⁹⁾는 squid axon 세포막에서 Na⁺과 Ca²⁺의 교환을 증명하여 심장근에서도 이러한 가능성을 제시하고 있으나 강심배당체에 의한 세포내 이온(Na⁺, K⁺) 분포의 변화에 있어 Repke 등의 추정과 일치되는 실험들도 있으나 상반되는 보고들도 많으며¹⁷⁾, Okita 등(1973)²⁰⁾은 Langendorff 방법에 의해 가토심장에 강심배당체 처치후 강심효과가 나타난 후 약물을 씻어내

면 강심효과는 사라지나 이때에 microsomal ATPase의 억제는 지속된다고 보고하고 있어, 논란의 여지는 있으나 위에 열거한 Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화억제와 강심작용의 상관성등에 비추어 Repke(1964)의 가설은 계속 추구되고 있으며 심장근 Na⁺-K⁺-activated ATPase 활성화억제가 강심기전에 관여하리라 추정되고 있다^{16,22)}.

본 실험에서 부자 butanol fraction의 가토 심장근 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 억제는 억제농도가 강심효과를 나타내는 농도와 일치한다는 점 및 microsomal ATPase에 대한 Na⁺-K⁺-activation의 차단효과는 대조약물인 ouabain과 비슷한 양상을 보여 기존 강심배당체의 작용기전의 일부라고 추정되는 심장근 Na⁺-K⁺-activated ATPase의 억제가 부자 butanol fraction의 강심 기전의 일부라 사료된다.

결 론

부자 butanol fraction이 가토 심장근 microsomal ATPase 활성화도에 미치는 영향의 추구 결과는 다음과 같다.

1) 대조약물인 ouabain은 10⁻⁶M 이상의 농도에서 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화도를 유의하게 억제하였고, 4.8×10⁻⁶M의 농도에서 50%의 억제를 보였다.

2) 부자 butanol fraction은 10⁻⁵gm/ml 이상의 농도에서 microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase의 활성화도를 유의하게 억제하여 4.4×10⁻⁸gm/ml의 농도에서 50%의 활성화도 억제를 나타내었다.

3) 가토 심장근 microsomal ATPase는 Na⁺에 의하여 활성화 되었으며, 부자 butanol fraction과 ouabain은 microsomal ATPase에 대한 Na⁺-activation을 억제하였고, 이러한 억제는 Na⁺의 농도 300 mM에서도 완전히 역전되지는 않았다.

4) K⁺은 가토 심장근 microsomal ATPase를 활성화 시켰으며, 부자 butanol fraction과 ouabain은 K⁺-activation 역시 억제하였고, K⁺ 농도 30 mM에서도 억제는 완전히 역전되지 않았다.

REFERENCES

- 1) 김광철 · 홍사악 · 박찬용 : 부자에서의 강심작용물질 검색에 관한 연구. 最新醫學, Vol. 12, No. 12:77-87, 1973.

- 2) 박찬웅 : *Diphenylhydantion* 및 *ouabain* 이 흰 쥐 적혈구 세포막 ATPase 에 미치는 영향, 大韓藥理學雜誌, Vol. 6, No. 1:1-7, 1970.
- 3) 失數四郎 : 日藥理, 54:880, 1958.
- 4) 竹本常松 : 和漢生藥 有効成分の 分離, 代謝 10: 484-490, 1973.
- 5) 홍사악 · 박찬웅 · 김명석 · 신상규 : 附子 *Butanol fraction* 의 強心作用에 關한 研究, 大韓藥理學雜誌, Vol. 11, No. 1:7-13, 1975.
- 6) Akar, T., Larsen, F.S. and Brody, T.M.: *Correlation of cardiac sodium potassium activated adenosinetriphosphatase from the hearts of several mammalian species.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 170:17-26, 1969.
- 7) Bailey, L.E., and Harvey, S.C.: *Effect of ouabain on cardiac ^{45}C kinetics measured by indicator dilution.*, *Am. J. Physiol.*, 216: 123-129, 1969.
- 8) Baker, P.F., Blainstein, M.F., Hodgkin, A.L. and Steinhardt, R.A.: *The influence of calcium on sodium efflux in squid axons.*, *J. Physiol. (London)*, 200:421-458, 1969.
- 9) Besch, H.R., Allen, J.C., Glick, G. and Schwartz, A.: *Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 171:1-12, 1970.
- 10) Caprio, A. and Farah, A.: *The effect of the ionic milieu on the response of rabbit cardiac muscle to ouabain.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 155:403-414, 1967.
- 11) Ebel, H., DeSanto, N.G. and Hierholzer, K.: *Plasma cell membranes of the Rat kidney.*, *Pflügers Arch.*, 324:1-25, 1971.
- 12) Grossman, A. and Furchgott, R.F.: *The effect of various drugs in calcium exchange in the isolated guinea-pig left ventricle.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 145:162-172, 1964.
- 13) Horwitt, B.N.: *Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride.*, *J. Biol. Chem.*, 193:537-541, 1952.
- 14) Kahn, J.B. and Acheson, G.H.: *Effects of cardiac glycosides and other lactones and of certain others compounds on cation transfer in human erythrocytes.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 115:305-318, 1955.
- 15) Langer, G.A. and Serena, S.D.: *Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium: Relation to control of active state.*, *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 1:65-90, 1970.
- 16) Lee, K.S., Shin, M.R., Kang, D.H. and Chen, K.K.: *Studies on the mechanism of cardiac glycoside action.*, *Biochemical Pharmacology*, 19:1055-1069, 1970.
- 17) Lee, K.S. and Wolfgang Klaus.: *The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.*, *Pharmacological Reviews*, 23:(3):193-261, 1971.
- 18) Lee, K.S. and Yu, D.H.: *A study of the sodium-and potassium-activated adenosinetriphosphatase activity of heart microsomal fraction.*, *Biochemical Pharmacology*, 12(11):1253-1264, 1964.
- 19) Matsui, H. and Schwartz, A.: *Purification and properties of highly active ouabain sensitive Na^+ , K^+ -dependent adenosinetriphosphatase from cardiac tissue.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 128:380-390, 1966.
- 20) Okita, G.T., Richardson, F. and Roth-Schechter, B.F.: *Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium-and potassium-activated adenosinetriphosphatase.*, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 185:1-11, 1973.
- 21) Repke, K., Portius, H.J.: *Analysis of structure activity relationship in cardioactive compounds on the molecular level.* *Scientiae Pharmaceuticae. Proceedings of the Twentyfifth Congress of Pharmaceutical Science. Prague. August.*, 24-27, 1965.
- 22) Schwartz, A.: *The sodium-and potassium-activated adenosinetriphosphatase system.* *Methods in Pharmacology.*, 1:361-388, 1971.
- 23) Schwartz, A., George, E.L. and Julius, C.A.: *The sodium potassium adenosinetriphosphatase: Pharmacological, Physiological and biochemical aspects.*, *Pharmacological Reviews.*, Vol.

27, No. 1 March, 1975.

- 24) Skou, J.C.: *The influence of some cations on adenosinetrphosphatase from peripheral nerves.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 23:394-401, 1957.
- 25) Skou, J.C.: *Further investigation on a Mg^{++} + Na^+ activated adenosinetrphosphatase possibly related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 42:6-23, 1960.
-