

3. Ambrosio S., Gerli P., Perego C. et al. Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways // *Europ. J. Pharmacol.*— 1987.— 133, N 2.— P. 239—241.
4. Brown J. R., Arbuthnott G. W. The electrophysiology of dopamine (D_2) receptors: a study of the actions of dopamine on corticostriatal transmission // *Neuroscience*.— 1983.— 10, N 2.— P. 349—355.
5. Guyenet P. G., Crane J. K. Non-dopaminergic nigrostriatal pathway // *Brain Res.*— 1981.— 213, N 1.— P. 291—305.
6. Hirata K., Yim C. Y., Mogenson G. J. Excitatory input from sensory motor cortex to neostriatum and its modifications by conditioning stimulation of the substantia nigra // *Ibid.*— 1984.— 321, N 1.— P. 1—8.
7. Jasper H. H., Ajmone-Marsan C. A. A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat.— Ottawa: The Nat. Res. Council of Canada, 1954.— 71 p.
8. Jinnai K., Matsuda Y. Neurons of the motor cortex projecting commonly on the caudate nucleus and the lower brain stem in the cat // *Neurosci. Lett.*— 1979.— 13, N 2.— P. 121—126.
9. Johnson S. W., Palmer M. R., Freedman R. Effects of dopamine on spontaneous and evoked activity of caudate neurons // *Neuropharmacology*.— 1983.— 22, N 7.— P. 843—851.
10. Kitai S. T., Kocsis J. D., Preston R. J. et al. Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase // *Brain Res.*— 1976.— 109, N 3.— P. 601—606.
11. Kornhuber J., Kornhuber M. E. Presynaptic dopaminergic modulation of cortical inputs to the striatum // *Life Sciences*.— 1986.— 39, N 8.— P. 669—674.
12. Nisenbaum E. S., Orr W. B., Berger T. W. Evidence for two functionally distinct subpopulations of neurons within the rat striatum // *J. Neuroscience*.— 1988.— 8, N 11.— P. 4138—4150.
13. Olney J. W., Price M. T., Samson L. et al. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity // *Neurosci. Lett.*— 1986.— 65, N 1.— P. 65—71.
14. Robertson H. A. Cerebral decortication reverses the effect of amphetamine on striatal D_2 dopamine binding site density // *Ibid.*— 72, N 3.— P. 325—329.
15. Schneider J. S., Yuwiler A., Markham C. H. Production of a parkinson-like syndrome in the cat with N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): behavior, histology, and biochemistry // *Exp. Neurol.*— 1986.— 91, N 2.— P. 293—307.
16. Schwartzman R. J., Alexander G. M., Ferraro T. N. et al. Cerebral metabolism of parkinsonian primates 21 days after MPTP // *Ibid.*— 1988.— 102, N 3.— P. 307—313.
17. Van der Kooy D., Coscina D. V., Hattori T. Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? // *Neuroscience*.— 1981.— 6, N 3.— P. 345—357.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил в редакцию 11.06.89

УДК 612.17

П. В. Белан, А. Н. Верхратский, Н. Ф. Прончук, А. В. Тепикин

Применение метода микрофлюорометрии для измерения свободного кальция в цитоплазме одиночных культивируемых кардиомиоцитов крысы

Изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток сердечной мышцы являются одним из ключевых факторов, обеспечивающих сопряжение возбуждения миокарда с внутриклеточными процессами, происходящими в нем. Существует ряд экспериментальных методов измерения концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{in}$) в клетках сердца (см. обзоры [6, 7, 28]). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Так, например, кальцийселективные внутриклеточные микроэлектроды [5, 15] не только непросты в изготовлении, но и не позволяют проводить достаточно длительных исследований на одной и той же клетке. Абсорбционные Ca^{2+} -чувствительные красители [22, 24] не проникают через клеточные мембраны, что определяет существенные трудности их попадания в цитоплазму. Наиболее оптимальным сегодня кажется использование последнего поколения Ca^{2+} -чувствительных флуоресцентных красителей [13, 16, 30], хотя им тоже присущ ряд ограничений, связанных в первую очередь с недостаточной скоростью их действия.

В наших экспериментах мы осуществляли измерения свободного Са в изолированных культивируемых клетках миокарда крыс. Ряд подобных работ уже появлялся в печати в течение последних двух лет [19—21], однако во всех этих работах осуществляли измерения концентрации свободного Са в суспензии клеток или клетках, прикрепленных к специальным нитям-носителям, мы же — в одиночных культивируемых кардиомиоцитах.

Методика

Культивирование клеток миокарда. У новорожденных крыс (возраст 2—5 сут) в стерильных условиях извлекали сердце и переносили его в номинально бескальциевый раствор следующего состава (ммоль/л): NaCl — 140; KCl — 5,4; HEPES — 10; глюкоза — 10 и pH — 7,4. В этом растворе сердце разрезали на небольшие кусочки размером 1×1×1 мм. Затем кусочки переносили в бескальциевый раствор, содержащий 0,12 г/л трипсин и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 5—7 мин. Эту процедуру повторяли со свежими растворами 5—7 раз. Каждый раз надосадочную жидкость сливали в центрифужные пробирки, содержащие среду DMEM (фирма «Sigma», США) и фетальную бычью сыворотку (фирма «Flow Laboratories», Великобритания) в соотношении 1:1. Полученную клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Затем клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10 % NU-Serum (фирма «Serva», ФРГ), высаживали на дно предварительно подготовленных камер, позволяющих осуществлять микрофлюорометрию и смену внеклеточных растворов, и культивировали в течение 1—6 сут.

Окрашивание клеток. Клетки окрашивали Fura-2/AM (фирма Calbiochem, Швейцария), используя традиционный метод окраски [16]. Для этого 5 мкл исходного раствора Fura-2/AM, разведенного в диметилсульфоксиде (концентрация 1 ммоль/л), добавляли непосредственно в культуральную камеру, содержащую 2 мл питательной среды. Окраску производили в течение 40—60 мин при 35 °С. Затем камеру переносили на предметный столик микроскопа и отмывали раствором Тироде в течение 30 мин. Конечная концентрация красителя в клетке составляла примерно 20—40 мкмоль/л.

Определение $[Ca^{2+}]_{in}$ в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов. Для определения $[Ca^{2+}]_{in}$ использовали традиционный двухволновой метод [4]. Возбуждение флуоресценции проводили световыми волнами длиной 362 и 387 нм, регистрацию осуществляли на волне 515 нм. Концентрация кальция связана с параметрами флуоресценции Fura-2 следующим образом:

$$[Ca^{2+}] = Kd'(P_{\max} - P) / (P - P_{\min}),$$

где $Kd' = KdF_{\max}(362) / F_{\min}(362) = 0,16$ мкмоль/л; $P = F_{387}/F_{362}$ — значение отношения сигналов флуоресценции для данной концентрации ионов кальция; $P_{\max} = 1,25$ соответствует свободной Fura-2; $P_{\min} = 0,13$ — Fura-2, насыщенной кальцием.

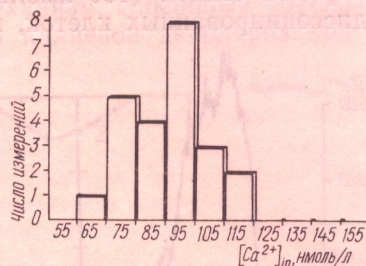
Подробно схема установки и методика калибровки Fura-2 описаны в предыдущих работах [1, 2]. Основной внеклеточный раствор, использовавшийся в работе, содержал (ммоль/л) следующие вещества: NaCl — 140; KCl — 5,4; CaCl₂ — 2,5; MgCl₂ — 1,1; HEPES — 10, а его pH составлял 7,4. Для замены ионов натрия использовали катионы Трис, для создания гиперкалиевых растворов 54,6 ммоль/л Na⁺ эквивалентно заменяли K⁺. В работе использовали следующие препараты: верапамил, кофеин (фирма «Sigma», США), тимол (фирма «Serva», ФРГ). Смену растворов осуществляли проточно. Скорость потока — 10 мл/мин. Ионные токи отводили с помощью метода «patchclamp» в конфигурации «whole-cell» [17]. Внутриклеточный раствор имел следующий состав (ммоль/л): Na (ОН) — 30; CsCl — 90; MgCl₂ — 4; ЭГТА — 10; HEPES — 20 и pH — 7,2.

Результаты

$[Ca^{2+}]_{in}$ в состоянии покоя. Внутриклеточная концентрация свободного кальция в культивируемых кардиомиоцитах крысы составляет примерно 100 нмоль/л (рис. 1). Это совпадает с оценками, данными другими авторами [20, 21]. Разброс значений концентрации ионов кальция в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов очень незначителен, что, вероятно, связано с кондиционирующим воздействием процесса культивирования — в свежеизолированных клетках этот разброс существенно [20].

Без внешних воздействий концентрация свободного кальция в цитоплазме культивируемых клеток остается на одном и том же уровне в течение 1—2 ч после начала эксперимента (еще одно отличие от свежedisсоциированных кардиомиоцитов, в которых $[Ca^{2+}]_{in}$ увеличивается на 88 % исходной за 1 ч после «загрузки» красителя [20]). Неизменность уровня $[Ca^{2+}]_{in}$ в состоянии покоя также свидетельствует о том, что краситель практически не вытекает из клеток. Иногда (примерно, 5 % тестированных клеток) наблюдали длительные медленные спонтанные колебания внутриклеточной концентрации свободного Ca (рис. 2) амплитудой около 100 нмоль/л и частотой порядка десяти-

Рис. 1. Гистограмма распределения $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах.



тых долей герц. Спонтанные колебания $[Ca^{2+}]_{in}$ в клетках сердца описаны неоднократно [3, 14]. Эти колебания могут приводить даже к генерации потенциалов действия в клетках рабочего миокарда за счет развития Ca^{2+}_{in} -зависимого входящего тока (I_{Ti}), что в свою очередь может определять возникновение эктопических очагов патологических

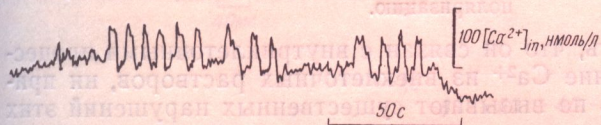


Рис. 2. Спонтанные колебания $[Ca^{2+}]_{in}$ в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов.

ритмов [9]. Однако частота описанных спонтанных колебаний $[Ca^{2+}]_{in}$ лежит в области единиц герц — т. е. они на полтора порядка чаще, чем обнаруженные в наших экспериментах. Пока говорить о природе медленных спонтанных колебаний $[Ca^{2+}]_{in}$ рано, однако даже с феноменологической точки зрения их существование представляется интересным.

Калиевая деполяризация и $[Ca^{2+}]_{in}$. Одним из общеупотребительных способов повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция является индукция трансмембранного входа этих ионов через потенциалуправляемые кальциевые каналы плазматической мембраны. Добиться активации этих каналов можно, используя как электрический стимул, так и электрохимический градиент ионов калия — ионов, определяющих трансмембранный потенциал покоя возбудимых клеток. Повышение внеклеточной концентрации K^+ приводит к немедленному увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (рис. 3) примерно на 400—600 нмоль/л. Удаление ионов кальция из внеклеточной среды или использование специфических блокаторов кальциевых каналов (см. рис. 3) подавляет увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ при калиевой деполяризации.

Влияние кофеина и тимола на $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах. Кофеин является широко известным агентом, вызывающим повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ в разных возбудимых клетках. В основе этого повышения лежит индукция выброса Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула [23, 25]. При суперфузии культивируемых кардиомиоцитов растворами, содержащими кофеин (5—10 ммоль/л), происходит быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ (рис. 4, а), которое сменяется возвращением $[Ca^{2+}]_{in}$ к исходному уровню. Более того, почти всегда наблюдается явление свержвосстановления $[Ca^{2+}]_{in}$ — т. е. концентрация цитоплазматического кальция после действия кофеина стабилизируется (на время от десятков секунд до минут) на уровне меньшем, чем исходный. Аналогичные изменения $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах вызывает применение тимола (рис. 4, б) — еще одного агента, вызывающего выход ионов кальция из внутриклеточных депо [18].

Обсуждение

Концентрация ионов кальция в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов в состоянии покоя составляет примерно 80—110 нмоль/л. Эти значения $[Ca^{2+}]_{in}$ покоя аналогичны полученным при исследовании свежеизолированных клеток сердца эмбрионов цыпленка (80—100 нмоль/л — [20]) и кардиомиоцитов желудочков сердца взрослых морских свинок (100 нмоль/л — [8, 29]). Правда, в отличие от свежedisсоциированных клеток, культивируемые кардиомиоциты сохраняют

такой низкий уровень $[Ca^{2+}]_{in}$ в течение многих часов после «загрузки» красителя. Вероятно, это связано с лучшим функциональным состоянием клеток, находящихся в условиях культуры.

Интересным является также факт обнаружения спонтанных колебаний $[Ca^{2+}]_{in}$ в сердечных клетках. Механизм подобных колебаний пока остается неясным, хотя можно с некоторой

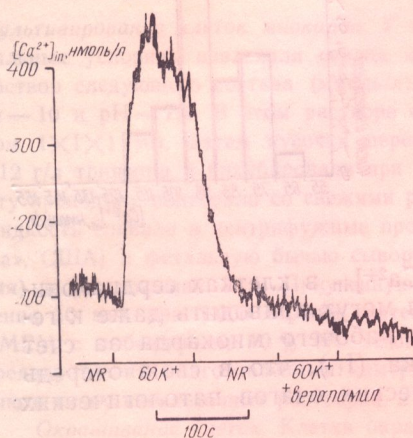


Рис. 3. Влияние верапамила (10 мкмоль/л) на увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ в ответ на калиевую деполяризацию.

долей уверенности полагать, что он связан с внутриклеточными процессами, поскольку ни удаление Ca^{2+} из внеклеточных растворов, ни применение Ca^{2+} -антагонистов не вызывают существенных нарушений этих

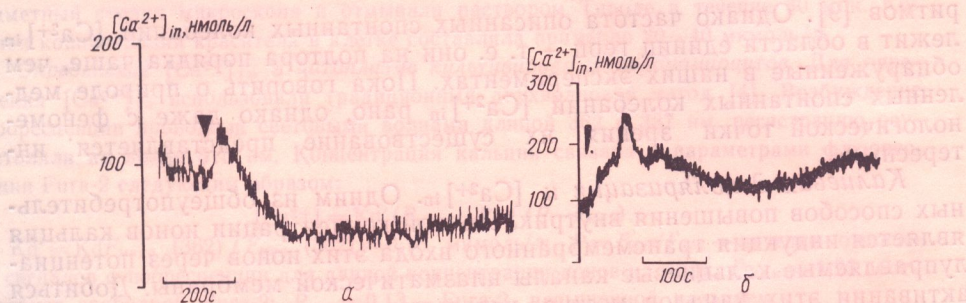


Рис. 4. Влияние кофеина (5 мМ/л — а) и тимол (1 мМ/л — б) на $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах крыс. Начало введения кофеин- и тимол-содержащих растворов отмечено стрелками.

колебаний. Вероятно, в основе подобного рода спонтанных колебаний $[Ca^{2+}]_{in}$ лежат периодические выбросы кальция из внутриклеточных депо. Возможно, эти колебания играют роль в функционировании сердечной клетки.

Деполяризация кардиомиоцитов при воздействии гиперкалиевых растворов вызывает повышение внутриклеточной концентрации свободного кальция. Возросший уровень $[Ca^{2+}]_{in}$ не снижается в течение всего периода выдерживания клеток в гиперкалиевых растворах. Угнетение повышения $[Ca^{2+}]_{in}$ при калиевой деполяризации кальциевыми антагонистами позволяет предположить, что в основе его лежит вход ионов кальция через Са-каналы плазматической мембраны. Однако скорость инактивации кальциевого тока, регистрируемого в культивируемых кардиомиоцитах крысы (рис. 5), довольно высока, и уже к 150—200-й миллисекунде амплитуда кальциевого тока спадает до 0.

Можно предполагать, что стационарное повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ под влиянием калиевой деполяризации обусловлено активностью фоновых кальциевых каналов (аналогичных, например, так называемому В-типу Ca^{2+} -каналов, обнаруженных в мембране клеток морской свинки и кры-

сы [12]), которую мы не в состоянии обнаружить в электрофизиологическом эксперименте. Существование стационарного компонента кальциевой проводимости в кардиомиоцитах крысы подтверждается также тем, что Ca^{2+} -агонисты существенно удлиняют плато потенциала действия [11]. Сложности идентификации стационарных кальциевых токов, возможно, обусловлены либо небольшой амплитудой этого компонента проводимости, либо ее более выраженной зависимостью от метаболизма. Впрочем, нельзя исключить еще один механизм, способный обусловить стационарное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при калиевой деполаризации:

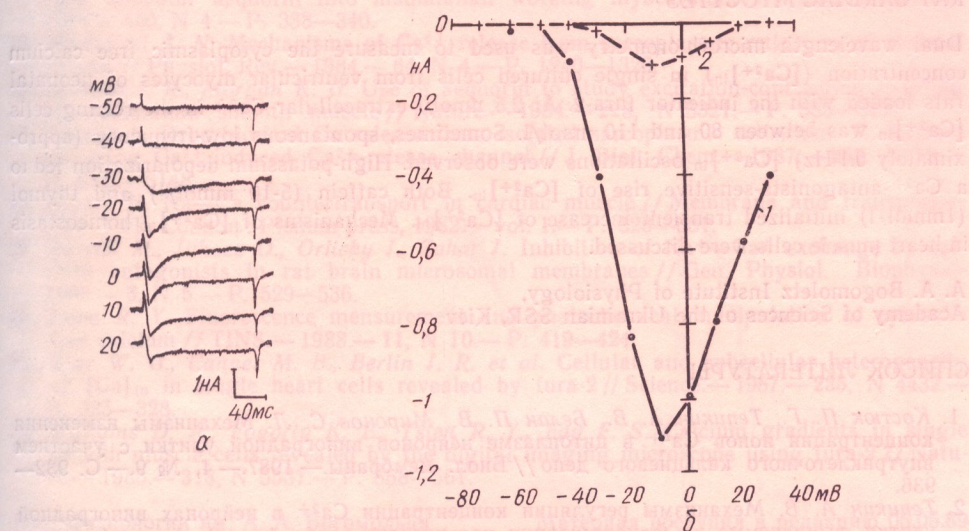


Рис. 5. Кальциевый ток (а) и его вольт-амперная характеристика (б), построенная по значениям пиковой амплитуды тока (1) и амплитуды тока на 150-й миллисекунде после начала тестирующей деполаризации (2). Поддерживаемый потенциал —60 мВ, значения тестирующих деполаризаций указаны слева от регистраций токов.

инвертирование натрий-кальциевого ионообменного механизма при деполаризации (учитывая, что потенциал реверсии $\text{Na} - \text{Ca}$ -«обменника» в клетках миокарда составляет примерно -50 мВ [26]). Чувствительность повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при калиевой деполаризации к кальциевым антагонистам делает сомнительным это предположение, хотя и не исключает его полностью: показано, например, что кальциевые антагонисты подавляют натрий-кальциевый «обменник» в микросомах, выделенных из мозга крыс [27].

Еще одним источником повышения внутриклеточной концентрации кальция являются внутриклеточные депо. Выброс Ca^{2+} из этих депо определяет, в частности, развитие в клетках миокарда электро-механического сопряжения [10]. Выход ионов кальция из депо саркоплазматического ретикулума кардиомиоцитов обеспечивается Ca^{2+} -селективными каналами мембраны ретикулума, способность которых к активации регулируется уровнем $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ и, возможно, мембранным потенциалом [11, 23]. К настоящему времени обнаружен ряд веществ (к которым, в частности, относятся кофеин и тимол), способных менять доступность кальциевого канала мембраны ретикулума к активации.

В наших экспериментах показано, что и кофеин, и тимол прямо активируют выброс кальция из внутриклеточных депо. Необходимо отметить, что амплитуда кофеин- и тимол-индуцированных выбросов Ca^{2+} в кардиомиоцитах в несколько раз ниже, чем, например, в нейронах моллюсков [2]. С одной стороны, это может быть обусловлено недоразвитием системы саркоплазматического депо в клетках новорожденных животных. С другой стороны, как известно, выброс Ca^{2+} одновременно активирует обратный захват кальция ретикулом, выраженный в кардиомиоцитах довольно сильно и проявляющийся в виде сверхвосстанов-

ления $[Ca^{2+}]_{in}$ после кофеинового и тимолового выбросов. Возможно, интенсивный обратный захват кальция ретикулумом определяет высокую скорость релаксации клеток сердца крысы, обладающих, как известно, очень короткой систолой.

P. V. Belan, A. N. Verkhatsky, N. F. Pronchuk, A. V. Tepikin

APPLICATION OF MICROFLUOROMETRY METHOD TO MEASURE FREE CALCIUM IN ISOLATED CULTURED RAT CARDIAC MYOCYTES

Dual wavelength microfluorometry was used to measure the cytoplasmic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{in}$) in single cultured cells from ventricular myocytes of neonatal rats loaded with the indicator fura-2. At 2.5 nmol/l extracellular Ca^{2+} in the resting cells $[Ca^{2+}]_{in}$ was between 80 and 110 nmol/l. Sometimes, spontaneous low-frequency (approximately 0.1 Hz) $[Ca^{2+}]_{in}$ oscillations were observed. High-potassium depolarization led to a Ca^{2+} -antagonists-sensitive rise of $[Ca^{2+}]_{in}$. Both caffeine (5-10 mmol/l) and thymol (1mmol/l) initialized transient increase of $[Ca^{2+}]_{in}$. Mechanisms of $[Ca^{2+}]_{in}$ homeostasis in heart muscle cells were discussed.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костюк П. Г., Тепикин А. В., Белан П. В., Миронов С. Л. Механизмы изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме нейронов виноградной улитки с участием внутриклеточного кальциевого депо // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 9.— С. 932—936.
2. Тепикин А. В. Механизмы регуляции концентрации Ca^{2+} в нейронах виноградной улитки, выявляемые по флуоресценции кальциевого зонда фура-2: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1988.— 24 с.
3. Allen D. G., Eisner D. A., Orchard C. H. Characterization of oscillations of intracellular calcium concentration in ferret ventricular muscle // J. Physiol. (London).— 1984.— 352.— P. 113—128.
4. Amers W., Neher E. The Ca^{2+} signal from fura-2 loading must cells depends strongly on the method of dye loading // FEBS Lett.— 1985.— 192, N 1.— P. 13—18.
5. Amman D. Ca^{2+} -selective microelectrodes // Cell Calcium.— 1985.— 6, N 1.— P. 39—55.
6. Blinks J. R. Intracellular $[Ca^{2+}]$ measurements // The heart and cardiovascular system / Ed. by H. A. Fozzard et al.— New York: Raven press, 1986.— P. 671—701.
7. Blinks J. R., Wier W. G., Hess P., Prendergast F. G. Measurement of $[Ca^{2+}]$ concentrations in living cells // Progr. Biophys. Mol. Biol.— 1982.— 40, N 1.— P. 1—114.
8. Barcenaz-Ruiz L., Wier W. G. Voltage-dependence of intracellular $[Ca^{2+}]_{in}$ transients in guinea-pig ventricular myocytes // Circulat. Res.— 1987.— 61, N 2.— P. 148—154.
9. Capogrossi M. C., Houser S. R., Bahinski A., Lakatta E. G. Synchronous occurrence of spontaneous localized calcium release from the sarcoplasmic reticulum generates action potentials in cardiac ventricular myocytes at normal resting membrane potential // Ibid.— 1987.— 58, N 2.— P. 239—250.
10. Chapman R. A. Control of cardiac contractility at the cellular level // Amer. J. Physiol.— 1983.— 245, N 3.— P. H535—H552.
11. Cohen N. M., Lederer W. J. Calcium current in isolated neonatal rat ventricular myocytes // J. Physiol. (London).— 1987. 391.— P. 169—191.
12. Coulombe A., Lefevre I. Divalent cations permeable channels at negative membrane potentials in rat cardiac myocytes // J. Physiol. (London).— 1988.— 406.— P. 232P.
13. DeFeo T. T., Briggs G. M., Morgan K. G. Ca^{2+} -signals obtained with multiple indicators in mammalian vascular muscle cells // Amer. J. Physiol.— 1987.— 253, N 6.— P. H1456—H1461.
14. Eisner D. A., Valdeomillos M. A study of intracellular calcium oscillation in sheep cardiac Purkinje fibers at the single cell level // J. Physio. (London).— 1986.— 372.— P. 539—556.
15. Fozzard H. A., Chapman R. A., Friedlander I. R. Measurements of intracellular calcium ion activity with neutral exchanger ion sensitive microelectrodes // Cell Calcium.— 1985.— 6, N 1.— P. 57—68.
16. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 13.— P. 3440—3450.
17. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // Pflügers Arch.— 1981.— 391, N 1.— P. 85—100.