

18. *Hisayama T., Takayanagi J.* Some properties and mechanisms of thymol-induced release of calcium from calcium-store in guinea-pig taenia caecum // *J. J. Pharmacol.*—1986.—40, N 1.—P. 69—82.
19. *Jacob R., Lieberman M.* Compartmentation of fura-2 in cultured embryonic chick heart cells // *J. Physiol. (London)*.—1986.—382.—P. 107P.
20. *Jacob R., Murphy E., Lieberman M.* Free calcium in isolated chick embryo heart cells measured using quin2 and fura2 // *Amer. J. Physiol.*—1987.—253, N 2.—P. C337—C342.
21. *Korth M., Starma V. K., Sheu S. S.* Stimulation of muscarinic receptors raises free intracellular Ca concentration in rat ventricular myocytes // *Circulat. Res.*—1988.—62, N 6.—P. 1080—1087.
22. *Morgan J. P., DeFeo T. T., Morgan K. G.* A chemical procedure for loading the calcium indicator aequorin into mammalian working myocardium // *Pflugers Arch.*—1984.—400, N 4.—P. 338—340.
23. *Mortonosi A. N.* Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle // *Physiol. Rev.*—1984.—64, N 4.—P. 1240—1320.
24. *Neering J. R., Morgan K. G.* Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle // *Nature*.—1984.—228, N 5321.—P. 585—587.
25. *Palade P.* Drug-induced Ca release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Release involving Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release channel // *J. Biol. Chem.*—1987.—262, N 13.—P. 6142—6148.
26. *Reuter H.* Na—Ca countertransport in cardiac muscle // *Membrane and transport*.—New York; London: Plenum press, 1982.—vol. 1.—P. 623—681.
27. *Rusakov M., Juhazs O., Orlicky J., Zahar J.* Inhibition of Na^{+} — Ca^{+} exchange by calcium antagonists in rat brain microsomal membranes // *Gen. Physiol. Biophys.*—1986.—5, N 5.—P. 529—536.
28. *Tsien R. Y.* Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium // *TINS*.—1988.—11, N 10.—P. 419—424.
29. *Wier W. G., Cannel M. B., Berlin J. R. et al.* Cellular and subcellular heterogeneity of $[\text{Ca}]_{\text{in}}$ in single heart cells revealed by fura-2 // *Science*.—1987.—235, N 4432.—P. 325—328.
30. *Williams D. A., Fogarty K. E., Tsien R. Y., Fay F. S.* Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using fura-2 // *Nature*.—1985.—318, N 5537.—P. 558—561.

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

Материал поступил в редакцию 05.05.89

УДК 612.17

А. Н. Верхратский, Н. Ф. Прончук, А. В. Тепшкин

Влияние снижения внеклеточной концентрации ионов натрия на внутриклеточную концентрацию ионов кальция в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов крыс

В конце 50-ых годов впервые было обнаружено, что удаление ионов натрия из внеклеточной среды приводит к развитию преходящей контрактуры препаратов желудочка лягушки [11]. Многочисленные исследования, проведенные в последующие годы, с достаточной убедительностью показали, что в основе этой (так называемой гипо- или безнатриевой) контрактуры лежит рост внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) [5, 6, 9]. Это увеличение было прямо показано в экспериментах на многоклеточных препаратах миокарда с помощью Ca^{2+} -селективных внутриклеточных микроэлектродов [10] и с помощью Ca^{2+} -чувствительного красителя экворина [3].

Однако использование в качестве объекта исследования многоклеточных препаратов миокарда является источником неоднозначности получения и интерпретации результатов, что связано в основном с наличием диффузионных барьеров, гетерогенностью функциональных свойств препарата и др. (см. [4]). В нашей работе мы исследовали изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ на изолированных культивируемых клетках сердца новорожденных крыс.

Методика

Методы выделения и культивирования кардиомиоцитов, а также техника микрофлюорометрического определения внутриклеточной концентрации ионов кальция описаны в предыдущих работах [1, 2]. Исходный внеклеточный раствор содержал (в ммоль/л): NaCl — 140; KCl — 5,4; CaCl₂ — 2,5; MgCl₂ — 1,1; HEPES — 0,1; pH при этом составлял 7,4. Для замены ионов натрия использовали катионы Трис.

Результаты и их обсуждение

Эффект удаления ионов натрия из внеклеточных растворов. При замене ионов натрия во внеклеточных растворах непроницаемыми катионами Трис происходит значительный рост внутриклеточной концентрации ионов кальция (рис. 1). Отмывка исходным натрийсодержащим раствором Тироде возвращает $[Ca^{2+}]_{in}$ к исходным значениям. Повторные

замены натрийсодержащего внеклеточного раствора безнатриевым приводят к повторному росту $[Ca^{2+}]_{in}$. Подобные возрастания внутриклеточной концентрации ионов кальция могут повторяться много раз, но при этом концентрация нарастает меньше.

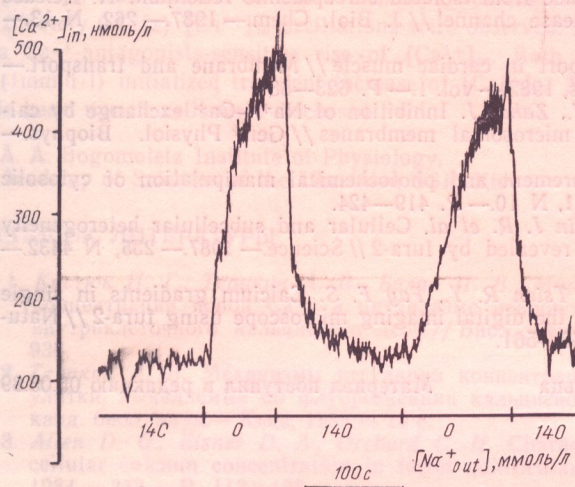
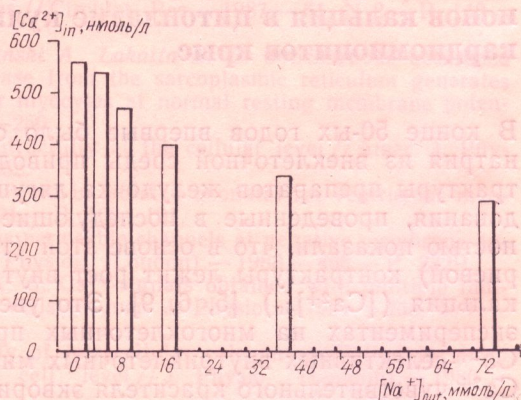


Рис. 1. Влияние устранения ионов натрия из внеклеточных растворов на концентрацию ионов кальция в цитоплазме культивируемых кардиомиоцитов.

Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция при выдерживании клеток сердечной мышцы в безнатриевых растворах, согласно современным представлениям, является следствием инвертирования работы натрий-кальциевого ионообменного механизма: смена направления электрохимического градиента для ионов натрия приводит к тому, что ионы кальция начинают входить в клетку, а ионы натрия, наоборот, — выходить во внеклеточную среду [6, 10]. Доказательством правильности этого предположения служат результаты следующих экспериментов.

Рис. 2. Зависимость роста $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах от внеклеточной концентрации ионов натрия.



Эффект градуального снижения $[Na^{+}]_{out}$ на $[Ca^{2+}]_{in}$. На рис. 2 показан результат эксперимента по градуальному снижению концентрации ионов натрия во внеклеточной среде на $[Ca^{2+}]_{in}$. Чем большее количество ионов натрия заменяли непроницаемым катионом, тем более выраженным было возрастание цитоплазматической концентрации ионов кальция.

Влияние $[Ca^{2+}]_{out}$ на увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$. На рис. 3 показаны изменения ответа клетки на суперфузию безнатриевым раствором при разных концентрациях ионов кальция во внеклеточных растворах. В результате этого эксперимента обнаружена четкая зависимость повышения $[Ca^{2+}]_{in}$ от исходного уровня кальция в наружной среде. По-видимому, это с достаточной убедительностью доказывает тот факт, что повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция при выдерживании клеток в безнатриевых растворах связано с трансмембранным входом ионов кальция. При этом изменения концентрации ионов кальция во внеклеточных растворах в диапазоне от 0,5 до 10 ммоль/л не сказываются на базальном уровне $[Ca^{2+}]_{in}$. Удаление ионов кальция из внеклеточных раство-

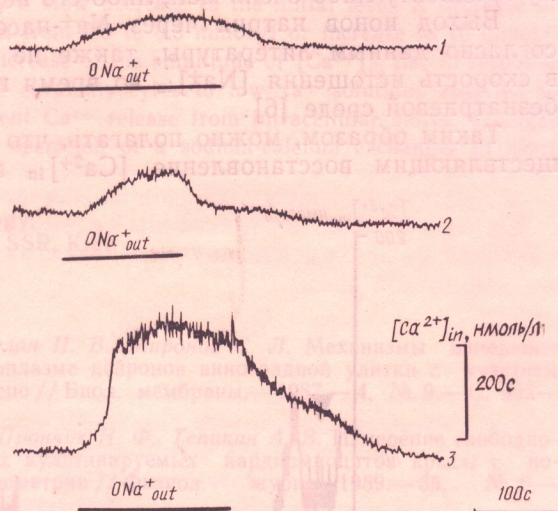


Рис. 3. Зависимость роста $[Ca^{2+}]_{in}$ в культивируемых кардиомиоцитах при перфузии безнатриевыми растворами от внеклеточной концентрации ионов кальция:

1 — 0,5 моль/л; 2 — 2,5 моль/л; 3 — 10 ммоль/л.

ров устраняет рост $[Ca^{2+}]_{in}$ в ответ на снижение концентрации ионов натрия в наружных растворах.

Восстановление $[Ca^{2+}]_{in}$ во время суперфузии безнатриевыми растворами. Если продолжать суперфузию кардиомиоцитов безнатриевым раствором в течение продолжительного периода, то внутриклеточная концентрация ионов кальция, возросшая сразу после удаления Na^+ из

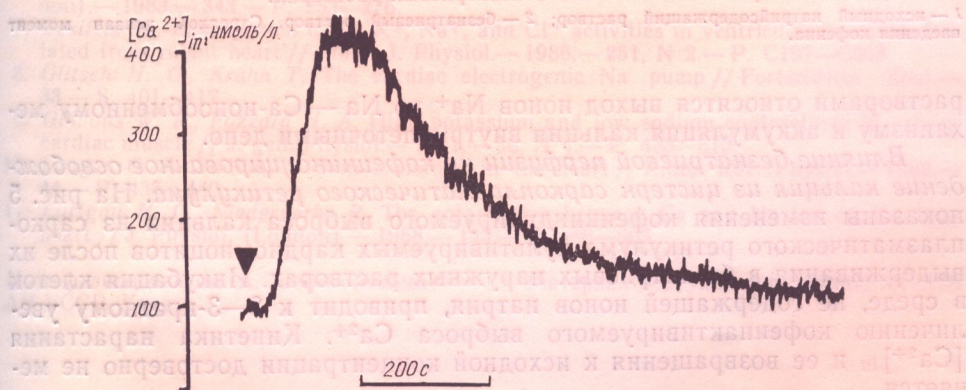


Рис. 4. Восстановление $[Ca^{2+}]_{in}$ при длительном выдерживании кардиомиоцитов в безнатриевом растворе. Стрелкой указан момент начала перфузии безнатриевым раствором.

внеклеточной среды постепенно возвращается к исходному уровню (рис. 4, а); скорость восстановления сильно варьирует для разных клеток. Подобное восстановление $[Ca^{2+}]_{in}$, по-видимому, определяется, с одной стороны, уменьшением внутриклеточной концентрации ионов натрия, а с другой — захватом кальция внутриклеточными депо.

Истощение цитоплазматической концентрации ионов натрия, в свою очередь, определяется утечкой ионов через мембрану, активным выбросом ионов Na^+ за счет работы натриевого насоса плазмалеммы [8] и выходом натрия по механизму $Na-Ca$ -обмена.

Достаточно большой выход Na^+ по электрохимическому градиенту кажется маловероятным. Поскольку внеклеточная концентрация натрия при перфузии безнатриевыми растворами составляет примерно 1 ммоль/л (учитывая загрязнение всех компонентов растворов), а внутриклеточная — около 10 ммоль/л [7] равновесный потенциал для ионов натрия (E_{Na^+}) находится в районе -60 мВ. Иначе говоря, E_{Na^+} соответствует потенциалу покоя культивируемых кардиомиоцитов (-55 — -45 мВ). Это позволяет полагать, что выход ионов натрия по электрохимическому градиенту либо очень мал, либо его нет.

Выход ионов натрия через Na^+ -насос плазматической мембраны, согласно данным литературы, также не вносит существенного вклада в скорость истощения $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ во время нахождения кардиомиоцитов в безнатриевой среде [6].

Таким образом, можно полагать, что к основным механизмам, осуществляющим восстановление $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при перфузии безнатриевыми

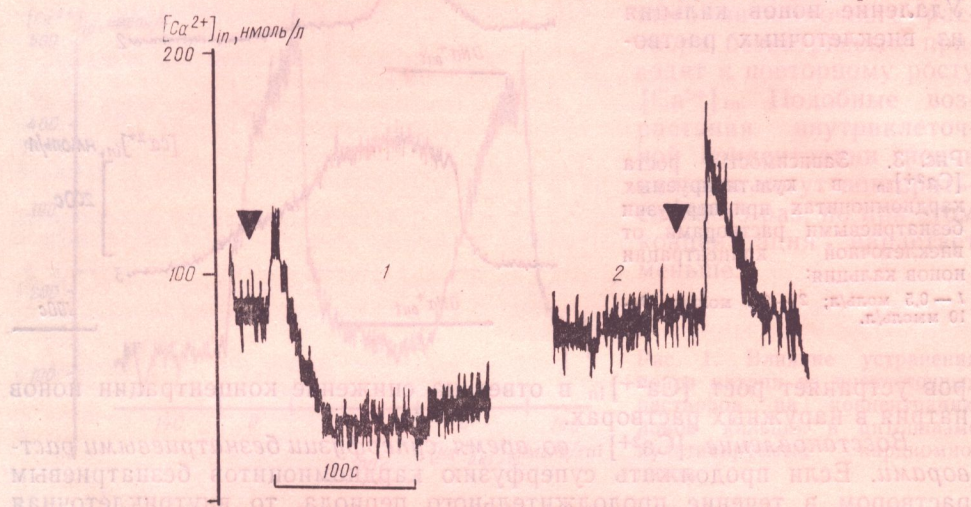


Рис. 5. Изменение амплитуды кофеинзависимого (5 ммоль/л) освобождения Ca^{2+} после 10-минутного выдерживания клеток в безнатриевых растворах:

1 — исходный натрийсодержащий раствор; 2 — безнатриевый раствор. Стрелкой указан момент введения кофеина.

растворами относятся выход ионов Na^+ по $\text{Na} - \text{Ca}$ -ионообменному механизму и аккумуляция кальция внутриклеточными депо.

Влияние безнатриевой перфузии на кофеининдуцированное освобождение кальция из цистерн саркоплазматического ретикулума. На рис. 5 показаны изменения кофеининдуцируемого выброса кальция из саркоплазматического ретикулума культивируемых кардиомиоцитов после их выдерживания в безнатриевых наружных растворах. Инкубация клеток в среде, не содержащей ионов натрия, приводит к 2—3-кратному увеличению кофеинактивируемого выброса Ca^{2+} . Кинетика нарастания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ и ее возвращения к исходной концентрации достоверно не меняется.

Проведенные исследования показали, что устранение или уменьшение концентрации ионов натрия во внеклеточных растворах вызывают существенное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Это увеличение зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция и натрия. Ступенчатое снижение концентрации ионов натрия во внеклеточной среде вызывает градуальное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Концентрация натрия, при которой наблюдается половинный прирост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, составляет примерно 50 ммоль/л. Уменьшение или увеличение внеклеточной концентрации ионов Са вызывает однонаправленные сдвиги гипонатрийиндуцированного роста $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Это свидетельствует в пользу того, что в основе наблюдаемых сдвигов $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ лежит перенос ионов кальция через клеточную мембрану.

THE EFFECT OF SODIUM ION EXTRACELLULAR CONCENTRATION ON INTRACELLULAR CALCIUM ION CONCENTRATION IN SINGLE NEONATAL RAT CULTURED VENTRICULAR MYOCYTES

Cytosolic free calcium ($[Ca^{2+}]_{in}$) was measured using fura-2 in isolated cultured ventricular myocytes of neonatal rat. Exposure of the cardiomyocyte to a solution in which all Na^+ have been replaced by impermeable cations results in a 400-600 nmol/l increase of $[Ca^{2+}]_{in}$. This increase is followed by a slow decrease to the initial level. A decrease of the extracellular calcium concentration from 2.5 to 0.5 mmol/l or increase to 10 mmol/l produced, respectively, decrease and increase of the amplitude of $[Ca^{2+}]_{in}$ rise in response to low- Na^+ superfusion. Exposure of cardiomyocytes to low- Na^+ solutions also led to a 2-3 fold increase of caffeine-dependent Ca^{2+} release from intracellular stores. Changes in $[Ca^{2+}]_{in}$ can be attributed to the operation of a sodium-calcium exchanger in heart cells.

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. Белан П. В., Верхратский А. Н., Прончук Н. Ф., Тепикин А. В. Измерение свободного Ca^{2+} в цитоплазме одиночных культивируемых кардиомиоцитов крысы с помощью методов микрофлуорометрии // Физиол. журн.—1989.—35, № 6.—С.
3. Allen D. G., Eisner D. A., Lab M. J., Orchard C. H. The effect of low sodium solutions on intracellular calcium concentration and tension in ferret ventricular muscle // J. Physiol. (London).—1983.—345.—P. 391—407.
4. Attwell D., Eisner D. A., Cohen I. Voltage clamp and tracer flux data effects of restricted extracellular space // Q. Rev. Biophys.—1979.—12, N 1.—P. 213—261.
5. Chapman R. A. A study of the contraction induced in frog atrial trabeculae by a reduction of the bathing sodium concentration // J. Physiol. (London).—1979.—327.—P. 295—313.
6. Chapman R. A., Coray A., McGuigan J. A. S. Sodium/calcium exchange in mammalian ventricular muscle: A study with sodium-sensitive microelectrodes // J. Physiol. (London).—1983.—343.—P. 253—276.
7. Desilets M., Baumgarten C. M. K^+ , Na^+ , and Cl^- activities in ventricular myocytes isolated from rabbit heart // Amer. J. Physiol.—1986.—251, N 2.—P. C197—C208.
8. Glitsch H. G., Krahn T. The cardiac electrogenic Na pump // Fortschritte Zool.—33.—S. 401—417.
9. Gibbons W. R., Fozzard H. A. High potassium and low sodium contractures in sheep cardiac muscle // J. gen. Physiol.—1971.—58, N 4.—P. 483—510.
10. Langer G. A. Sodium-calcium exchange in the heart // Annu. Rev. Physiol.—1982.—44.—P. 435—449.
11. Luitgau H. C., Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ion on the frog heart // J. Physiol. (London).—1958.—143.—P. 486—505.

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

Материал поступил в редакцию 05.05.89