

BOHDAN LEWARTOWSKI Zakład Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podylomowego, Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

SPRZĘŻENIE ELEKTROMECHANICZNE W MIOCYTACH SERCA

WSTĘP

Pod pojęciem sprzężenia elektromechanicznego rozumiemy procesy łączące pobudzenie sarkolemmy z aktywacją układów kurczliwych. Ostatnio pojęcie to bywa zawężane do mechanizmu aktywacji kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej przez procesy toczące się w pobudzonej błonie komórkowej.

Aktywacja układów kurczliwych, to jest skurcz, zostaje zapoczątkowana przez przyłączenie jonów Ca²⁺ do podjednostki C troponiny. Ma to miejsce wtedy, kiedy stężenie Ca²⁺ w sarkoplazmie wzrasta od spoczynkowego na poziomie około 2 x10⁻⁸ M do około 10⁻⁶ M. Badania nad sprzężeniem elektromechanicznym sprowadzają się w istocie do badania mechanizmu tego wzrostu stężenia Ca²⁺ w pobudzonej komórce. Od czasu pionierskich badań FA-BIATO (1985) powszechnie przyjęto, że bezpośrednim źródłem Ca2+ aktywującego skurcz jest siateczka sarkoplazmatyczna. Wobec tego głównym problemem w badaniach nad sprzężeniem elektromechanicznym byłby mechanizm wychwytu i wyzwalania Ca²⁺ z siateczki sarkoplazmatycznej w pobudzonej komórce. Poniżej przedstawię szereg wyników badań potwierdzających klasyczny już pogląd o zasadniczej roli siateczki sarkoplazmatycznej w sprzężeniu elektromechanicznym miocytów serca, jak również takich, które wskazują na możliwość występowania u niektórych gatunków lub w stanach patologicznych mechanizmów alternatywnych.

SIATECZKA SARKOPLAZMATYCZNA

Jest to błoniasty twór składający się z dwóch morfologicznie i czynnościowo różniących się części (ryc. 1). Część kanalikowa składa się z podłużnych kanalików ciasno oplatających sarkomery. W pobliżu prążków Z sarkomerów kanaliki przechodzą w pęcherzyki zwane również pęcherzykami lub cysternami końcowymi. W miocytach, w których występują kanaliki poprzeczne (T) sarkolemmy (np. miocyty robocze komór, błony pęcherzyków pozostają w kontakcie z błoną kanalików. Szerokość szczeliny pomiędzy błonami pęcherzyków i kanalików T wynosi około 10 Å. W miocytach, w których kanaliki poprzeczne nie występują (miocyty przedsionków, komórki Purkinjego komorowego układu przewodzącego), błony pęcherzyków pozostają w kontakcie z sarkolemmą. Struktury utworzone z pęcherzyków sarkolemmy (kanalika T) i szczeliny pomiędzy nimi noszą nazwę diad (analogicznie do triad w mięśniach szkieletowych). Tak ukształtowana siateczka sarkoplazmatyczna nosi nazwę "łączącej" (ang. junctional sarcoplasmic reticulum). U wielu gatunków część pęcherzyków znajduje się w pewnym oddaleniu od kanalików poprzecznych, na granicy pomiędzy prążkami A oraz I sarkomerów. Ta część siateczki nosi nazwę korbularnej (ang. corbular).

ADENOZYNOTRÓJFOSFATAZA WAPNIOWA (Ca²⁺-ATPaza) SIATECZKI SARKOPLAZMATYCZNEJ

ATPaza ta jest głównym białkiem kanalików siateczki sarkoplazmatycznej (PIKUŁA 1997). Wiąże ona jony Ca²⁺ na sarkolemmalnej powierzchni kanalików i transportuje je do ich wnętrza. Jej przeciętna aktywność jest tak duża, że wapń dyfundujący do komórki, na przykład przez aktywowane kanały wapniowe sarkolemmy, nie może dotrzeć do sarkomerów,

gdyż zostaje wychwytany przez siateczkę. Ca²⁺-ATPaza siateczki jest hamowana przez drugie białko błon jej kanalików, a mianowicie fosfolamban. Hamowanie to jest znoszone proporcjonalnie do stopnia ufosforylowania fosfolambanu. Fosforylacja ta może być dokonywana przez dwie kinazy: aktywowaną przez cykliczny AMP oraz aktywowaną przez związaną z Ca kalmodulinę. W istocie fosforylacja, a więc zniesienie hamowania ATPazy, zachodzi w sytuacji, w której rośnie stężenie Ca²⁺ w sarkoplazmie. Wzrost stężenia cAMP jest najczęściej skutkiem aktywacji receptorów β-adrenergicznych sarkolemmy, co wiąże się z nasileniem aktywacji jej kanałów wapniowych, a więc i napływu wapnia do pobudzonej komórki. Wiązanie Ca²⁺ z kalmoduliną jest spowodowane wzrostem stężenia Ca²⁺ w sarkoplazmie bez względu na jego mechanizm. Tak więc sytuacje prowadzące do zwiększenia stężenia sarkoplazmatycznego Ca $^{2+}$ prowadzą do aktywacji Ca 2 -ATPazy, a więc zwiększonego wychwytu Ca²⁺ przez siateczkę sarkoplazmatyczną. Udało się wyhodować transgeniczne myszy całkowicie pozbawione fosfolambanu. Skurcze ich serc lub miocytów izolowanych z ich serc przebiegają tak, jak u normalnych myszy pod wpływem silnego pobudzenia receptorów β, a pobudzenie tych receptorów nie ma żadnego wpływu na skurcz serc zwierząt transgenicznych. Ca2+-ATPaza siateczki tych myszy jest zawsze maksymalnie aktywna (Luo i współaut. 1996, WOLSKA i współaut. 1996).

KANAŁY WAPNIOWE PĘCHERZYKÓW SIATECZKI SARKOPLAZMATYCZNEJ

Wapń wychwytany przez kanaliki siateczki jest transportowany do jej pęcherzyków końcowych, w których zostaje zmagazynowany głównie w postaci związanej z białkiem kalsekwestryną. Błony pęcherzyków zwrócone ku kanalikom poprzecznym lub zewnętrznej sarkolemmie posiadają kanały, których pełna aktywacja powoduje gwałtowne uwolnienie Ca²⁺ do szczeliny diady. Z niej wapń dyfunduje do sarkoplazmy, co przyczynia się do szybkiego wzrostu stężenia wapnia i aktywacji skurczu (ryc. 1). Kanały wapniowe siateczki sarkoplazmatycznej są homotetramerami o masie cząsteczkowej podjednostek 565 kDa. Mają one kształt grzybka, którego nóżka penetruje błonę pęcherzyka końcowego, a gruba czworokątna główka wystaje do szczeliny diady. Widoczne w obrazach elektronowo-mikroskopowych kanały wystające do szczeliny diady zostały nazwane przez morfologów stopkami (ang. feet). W główce znajdują się 4 kanały (po jednym w podjednostce) łączące szczelinę diady z kanałem centralnym w nóżce. Średnica aktywowanych kanałów wapniowych siateczki jest tak duża, że mogą przez nie przechodzić nawet tak duże cząsteczki, jak glukoza. Zapewnia to bardzo szybką dyfuzję Ca²⁺ do szczeliny diady.

W swoich klasycznych badaniach, przeprowadzonych na izolowanych i pozbawionych mechanicznie błony komórkowej miocytach serca FABIATO (1985) stwierdził, że bodźcem do wyzwolenia Ca²⁺ z siateczki sarkoplazmatycznej jest wzrost stężenia wolnego Ca²⁺ w cytosolu. W nienaruszonej komórce jest on wynikiem aktywacji kanałów wapniowych pobudzonej sarkolemmy. Zjawisko to nazwano indukowanym przez wapń wyzwalaniem wapnia (CIRC, ang. calcium induced release of calcium).

Fragmenty błon siateczki zawierające kanały wapniowe lub izolowane rekombinowane kanały można wbudowywać do sztucznych błon fosfolipidowych oddzielających dwa środowiska. W układzie tym można zastosować do badania ich właściwości metodę "voltage clamping" pozwalającą na rejestrację prądu jonowego płynącego przez pojedyncze kanały. Badania prowadzone tą metodą wykazały, że kanały wapniowe siateczki sarkoplazmatycznej zachowują się podobnie do wszystkich innych kanałow jonowych, a więc ich aktywacja polega na oscylacji pomiędzy stanem zamknięcia i stanem całkowitego otwarcia. W czasie otwarcia przez kanał płynie prąd wapniowy o natężeniu zależnym od różnicy stężeń wapnia i potencjału elektrycznego po obu stronach błony. Potwierdzono również wyniki FABIATO (1985) sugerujące, że zasadniczym bodźcem aktywującym te kanały jest wzrost stężenia Ca²⁺. Badania te przyczyniły się również do sprecyzowania mechanizmu działania dwóch podstawowych narzędzi farmakologicznych, używanych do badania roli siateczki sarkoplazmatycznej w komórce, a mianowicie kofeiny i rianodyny (szczegółowo przedstawionego niżej) (BULL i współaut. 1989, FEHER i LIPFORD 1985).

STRUKTURA I FUNKCJA DIAD. KINETYKA I MECHANIZM ZMIAN STĘŻENIA Ca²⁺ W SARKOPLAZMIE

Wyniki FABIATO (1985) stały się silnym impulsem do dalszych badań nad budową molekularną i funkcją diad, jak również nad mechanizmem i kinetyką wyzwalania w nich Ca²⁺ i zmian jego stężenia w sarkoplazmie. Zaangażowano w nich ogromny zakres narzędzi i metod badawczych. Omówienie historii rozwoju tych badań zabrałoby ogromnie dużo miejsca, wobec czego przedstawię tylko pokrótce obecny stan wiedzy w tej dziedzinie.

ELEMENTY CZYNNOŚCIOWE BŁON OTACZAJĄCYCH SZCZELINĘ DIADY

Szczelina diady jest ograniczona od strony sarkomeru przez błonę pęcherzyka końcowego siateczki sarkoplazmatycznej (ryc. 1). Jej kanały wydzielające Ca2+ zostały opisane powyżej. Od drugiej strony szczelina jest ograniczona błoną kanalika poprzecznego T, będącego wpukleniem sarkolemmy (LANGER i PESKOFF 1996). W miocytach nie posiadających tych kanalików szczelina jest ograniczona przez zewnętrzną sarkolemmę. Badania prowadzone metodami immunofluorescencyjnymi z zastosowaniem znaczonych przeciwciał (np. złotem) wykazały duże zagęszczenie w sarkolemmie ograniczającej szczeliny diad dwóch typów białek o ogromnym znaczeniu dla sprzężenia elektromechanicznego: kanałów wapniowych typu L oraz wymieniaczy Na/Ca (FRANK i współaut. 1992).

nie do komórki depolaryzujący prąd sodowy (I_{Na}). Kanały sodowe występują również w sarkolemmie ograniczającej szczelinę diady. Aktywacja kanałów wapniowych powoduje napływ zewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ do szczeliny diady (prąd wapniowy – I_{Ca}). Ponieważ szczelina stanowi wąską, ograniczoną przestrzeń, aktywacja I_{Na} oraz I_{Ca} powoduje ogromny wzrost stężenia tych jonów pod błoną komórkową i wystąpienie dużych gradientów ich stężeń pomiędzy przestrzenią podbłonową a ogólną masą sarkoplazmy. Ich kinetyka i konsekwencje dla czynności komórki zostaną przedstawione niżej. Tutaj należy tylko dodać, że wzrost stężenia Ca^{2+} w szczelinie diady, będący skutkiem głównie aktywacji I_{Ca}, jest czynnikiem aktywującym kanały wapniowe siateczki sarkoplazmatycznej.

Wymieniacze Na/Ca są głównymi białkami transportującymi Ca²⁺ z miocytów serca (LE-DERER i współaut., 1996). Energii do tego transportu wbrew gradientowi stężeń wapnia dostarcza gradient stężeń Na⁺, (skierowany do komórki) generowany przez ATPazę sodowo-potasową (pompę sodowopotasową) sarkolemmy. Jony Na⁺ dyfundując przez kanał wymieniacza oddają mu swoją



Ryc. 1. Dwa skrajne typy obiegu Ca^{2+} aktywującego skurcz w miocytach serca.

Linie ciągłe — główny tor obiegu. Linie przerywane — mniej ważny ilościowo tor obiegu. A — obieg w dużym stopniu otwarty (człowiek, świnka morska); B — obieg w dużym stopniu zamknięty (szczur, chomik, mysz; S L — sarkolemma; S R — siateczka sarkoplazmatyczna.

Kanały wapniowe sarkolemmy typu L są atywowane przez przesunięcie potencjału elektrycznego błony komórkowej powyżej –20 mV. W warunkach fizjologicznych przesunięcie to jest skutkiem poprzedzającej aktywację kanałów wapniowych aktywacji zależnych od potencjału kanałów sodowych, przez które płyenergię, która zostaje użyta do zmiany jego konformacji i transportu Ca²⁺ do środowiska zewnątrzkomórkowego. Tak więc intensywność wymiany zależy od różnicy stężeń Na⁺po obu stronach błony komórkowej. Wymiana odbywa się w stosunku 3Na⁺\1Ca²⁺, a więc jest elektrogenna: przesunięciu 3 dodatnich

ładunków niesionych przez Na⁺ towarzyszy przesunięcie tylko 2 ładunków niesionych przez Ca²⁺. Tak więc aktywność wymieniaczy Na/Ca generuje prąd, który stosunkowo łatwo może być mierzony metodą "voltage calmping". Pozwala to na ilościową ocenę wymiany. Elektrogenność wymiany ma i inną bardzo ważna konsekwencję: intensywność i kierunek wymiany są zależne od potencjału błonowego. W warunkach spoczynkowych stężeń Na⁺ i Ca²⁺ wymiana = 0 przy potencjale = -40 mV (potencjale równowagi dla wymiany Na/Ca). Jeżeli potencjał błonowy jest ujemny w stosunku do potencjału równowagi, jak to ma miejsce pomiędzy pobudzeniami komórki, wymiana odbywa się w kierunku Na⁺ do komórki, Ca⁺⁺ - na zewnątrz. Jeżeli potencjał błonowy jest dodatni w stosunku do potencjału równowagi, kierunek wymiany ulega odwróceniu, to jest zewnątrzkomórkowy Ca²⁺ jest transportowany do komórki na wymianę z wewnątrzkomórkowym Na . Wartość potencjału równowagi zależy od stosunku stężeń obu zaangażowanych jonów wewnątrz i na zewnątrz komórki. Ponieważ stężenia zewnątrzkomórkowe są stosunkowo stałe, wartość potencjału równowagi zależy przede wszystkim od wewnątrzkomórkowych stężeń Na⁺ i Ca²⁺; wzrost stężenia Na⁺ przesuwa go w kierunku ujemnym, a wzrost stężenia Ca²⁺ przesuwa go w kierunku dodatnim. Tak więc chwilowy potencjal błonowy i chwilowy potencjał równowagi wymiany Na/Ca mogą się zmieniać niezależnie od siebie, a ich wzajemny stosunek określa chwilowy kierunek i intensywność wymiany Na/Ca.

Tak więc diada jest bardzo ważnym strategicznym elementem sprzężenia elektromechanicznego w miocytach serca. Do jej szczeliny może dyfundować Na $^{\!\!\!\!\!^+}$ przez aktywowane kanały sodowe oraz Ca $^{2+}$ pochodzący z trzech źródeł: 1. aktywowanych kanałów wapniowych sarkolemmy, 2. odwróconej na samym początku pobudzenia wymiany Na/Ca (potencjał błonowy staje się dodatni w stosunku do potencjału równowagi), 3. aktywowanych kanałów wapniowych pęcherzyków końcowych siateczki sarkoplazmatycznej. Jednocześnie Ca²⁺ może: 1. dyfundować ze szczeliny do sarkoplazmy, 2. być transportowany na zewnątrz komórki przez wymieniacz Na/Ca, który wkrótce przywraca swój "normalny" kierunek działania (o czym dokładniej niżej), 3. być wiązany przez ujemnie naładowane fosfolipidy wewnętrznej warstwy sarkolemmy silnie buforujące Ca²⁺ w szczelinie diady (LANGER i PE-SKOFF 1996, SHENG-YONG WANG i współaut.

1996). Tak więc końcowy efekt, to jest wielkość zmian stężenia Ca²⁺ i jego kinetyka jest zależny od wielu interferujących czynników. Poczyniono próby jego badania dwoma sposobami: obliczeń modelowych oraz bezpośredniego badania lokalnych stężeń wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ sondami fluorescencyjnymi oraz mikroskopią konfokalną o dużej rozdzielczości czasowej.

BADANIA MODELOWE

LANGER i PESKOFF (1996) skonstruowali matematyczny model zmian stężeń Ca^{2+} w szczelinie diady uwzględniający następujące elementy:

1. Ilość Ca^{2+} jaka dostaje się ostatecznie do sarkoplazmy w czasie pobudzenia miocytu. Jest to ilość Ca^{2+} potrzebna do aktywacji 75% maksymalnego skurczu. Te dane ilościowe pochodzą z bezpośrednich badań wykonanych innymi metodami.

2. Ilość Ca²⁺ dyfundującego do komórki przez aktywowane kanały wapniowe sarkolemmy. Ilość ta może być obliczona z całki całkowitego przezbłonowego I_{Ca} po czasie.

3. Całkowitą ilość Ca²⁺ uwalnianego w czasie pobudzenia komórki z siateczki sarkoplazmatycznej. Dane te pochodzą z badań wykonanych metodami bezpośrednimi przez innych autorów.

4. Ilość diad w komórce obliczoną na podstawie badań morfologicznych.

5. Objętość szczeliny diady.

6. Kinetykę dyfuzji Ca²⁺ ze szczeliny do sarkoplazmy.

7. Transport Ca^{2+} z komórki przez wymieniacz Na/Ca.

8. Buforowanie Ca²⁺ przez fosfolipidy sarkolemmy.

Na podstawie tych obliczeń autorzy proponują, że w ciągu pierwszych 20 ms od momentu pobudzenia komórki stężenie Ca²⁺ w szczelinie diady osiąga 600 µM, a następnie eksponencjalnie obniża się w ciągu 200 ms do 20 µM, aby po około 500 ms osiągnąć wartość spoczynkową. Tak więc maksymalne stężenie wapnia w szczelinie diady byłoby o trzy rzędy wielkości większe niż w cytosolu. Zapewnia to szybką dyfuzję do cytosolu i synchroniczną aktywację sarkomerów. Usunięcie z równań parametrów dotyczących wiązania Ca²⁺ przez fosfolipidy blony powoduje wzrost jego początkowego stężenia do 1 mM oraz spadek do 10 µM w czasie 3-4 ms. Tak więc obecność punktów wiązania w błonie szczeliny diady amortyzuje zmiany stężenia i wydłuża okres kiedy

jest ono znacząco wyższe niż w cytosolu. Według autorów ma to m.in. ogromne znaczenie dla transportu Ca²⁺ z cytosolu, który musi być usunięty w tej ilości, w jakiej dyfundował do pobudzonej komórki. Główną drogą transportu Ca²⁺ z komórki jest wymiana Na/Ca. Jednakże K_D wymieniaczy wynosi tylko około 6 μM, a więc jest kilka razy wyższe od stężenia Ca²⁺ w sarkoplazmie w szczytowym pobudzeniu. A jednak wymieniacze są bardzo aktywne. Według cytowanych autorów jest to wynikiem tego, że większość wymieniaczy jest zlokalizowana w sarkolemmie naprzeciw pęcherzyków końcowych siateczki, a więc są one eksponowane na stężenia $\mathrm{Ca}^{^{2+}}$ wielokrotnie wyższe niż w cytosolu. Fosfolipidy błony, zwalniając spadek stężenia Ca²⁺ w szczelinie diady, wydłużają czas kiedy znacznie przewyższa ono K_D wymieniaczy w stosunku do Ca²⁺. I rzeczywiście, wszystkie czynniki zmniejszające wydzielanie Ca²⁺ z siateczki sarkoplazmatycznej, jak również usuwające Ca²⁺ z miejsc wiązania w sarkolemmie, zwalniają lub blokują transport Ca²⁺ przez wymieniacze Na/Ca. Odwrotnie, zwiększenie przepływu Ca²⁺ przez siateczkę aktywuje wymianę Na/Ca (JANIAK i LEWARTOW-SKI 1996, POST i współaut. 1993)

METODY FLUORESCENCYJNE

Sondy wapniowe są to związki fluoryzujące pod wpływem promieniowania ultrafioletowego i zmieniające nasilenie tej fluorescencji pod wpływem wiązania Ca^{2+} (GRYNKIEWICZ i współaut. 1985). Tak więc komórka, do której wprowadzono taki związek (Indo 1, Fural, Fluo 2 i inne) naświetlana promieniami ultrafioletowymi fluoryzuje proporcjonalnie do stężenia wolnego Ca²⁺ w sarkoplazmie, aczkolwiek zależność fluorescencji od stężenia Ca²⁺ nie jest liniowa i wymaga kalibrowania. Badanie takiej komórki za pomocą zwykłego mikroskopu fluorescencyjnego i odpowiedniej aparatury przetwarzającej impulsy świetlne w elektryczne i poddającej je odpowiedniej obróbce pozwala na pomiar średniego stężenia Ca²⁺ w sarkoplazmie. Wiele trudności technicznych związanych z takim pomiarem pozostaje poza ramami tego opracowania. Pomiar ten łatwo jest łączyć z innymi metodami, takimi jak pomiar długości (skurczów komórki) i metody elektrofizjologiczne, jak rejestracja potencjałów błonowych lub prądów za pomocą "voltage clamping". Taki zestaw metod pozwala na śledzenie w całych komórkach poszczególnych ogniw sprzężenia elektro-mechanicznego: prądu wapniowego, wzrostu i spadku stężenia wolnego

Ca²⁺ w pobudzonej komórce i mechanicznegu skurczu komórki (ryc. 2). Rozwój mikroskopii konfokalnej i laserowych metod skaningowych umożliwił w ostatnich latach badanie zmian stężenia Ca²⁺ na wybranych małych obszarach komórek znajdujących się w ściśle sprecyzowanym stanie czynnościowym. Okazało się, że izolowane miocyty serc szczurów wykazują spontaniczne, lokalne, na obszarze o średnicy około 2 µM, wzrosty stężenia Ca2+, które mierzone metodami fluorescencyjnymi robią wrażenie pojawiających się i znikających "iskierek" (CHENG i współaut. 1996b). Dlatego też w anglojęzycznej nazwano literaturze je "sparks". "Iskierki" te znikają po wyłączeniu czynności siateczki sarkoplazmatycznej po zastosowaniu rianodyny lub tapsigarginy, a więc są spowodowane przez spontaniczną aktywację pojedynczych kanałów lub grup kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej. Jeśli częstotliwość ich się nasila mogą one inicjować fale Ca²⁺ wędrującą w komórce, która wyzwala falę mechanicznego skurczu. Podobne "iskierki" można zaobserwować, kiedy stymuluje się miocyty serca w warunkach częściowego zablokowania prądu wapniowego, na przykład D-600 (CHENG i współaut. 1996a). Ponieważ tylko niektóre diady zostają aktywowane, można wyróżnić zjawiska jednostkowe, które



Ryc. 2. Ogniwa sprzężenia elektromechanicznego w izolowanym miocycie lewej komory serca świnki morskiej.

Od góry ku dołowi: 1. prąd wapniowy rejestrowany z zastosowaniem metody "voltage clamping" w układzie całokomórkowym; 2. stężenie wolnego Ca²⁺ w sarkoplazmie rejestrowane za pomocą Indo 1 wprowadzonego do komórki; 3. skurcz komórki (100% i 90% długości rozkurczowej komórki). (Z doświadczeń Zakładu Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie). normalnie zlewają się w falę Ca²⁺. Średnica "iskierek" ma około 2 µm, czas ich trwania wynosi około 40 ms, a szczytowe stężenie Ca²⁺ w ich środku dochodzi do 1 µM. Jednakże, jeśli przyjmiemy za autorami cytowanych prac, że "iskierka" jest wynikiem wypływu Ca²⁺ z jednego lub kilku kanałów siateczki sarkoplazmatycznej, a więc praktycznie punktowo, to jej średnica obejmująca około 20% średnicy komórki jest niewątpliwie wynikiem zaawansowanej już dyfuzji Ca²⁺ do otaczającej diadę sarkoplazmy. Tak więc z bardzo dużym prawdopodobieństwem możemy przyjąć, że stężenie Ca²⁺ w punkcie jego wydzielania jest wielokrotnie wyższe. Zestawienie "iskierek" z rejestracją prądu wapniowego w układzie całokomórkowym (SANTANA i współaut. 1996) lub prądów pojedynczych kanałów wapniowych (RAMON i współaut. 1995) pozwoliło na bliższe sprecyzowanie mechanizmu aktywacji kanałów wapniowych siateczki. Przyczyniły się do tego również obliczenia stosunku ilościowego tych kanałów do kanałów wapniowych sarkolemmy, oparte na stosunku wiązania rianodyny (kanały siateczki) do wiązania dihydropirydyny (kanały sarkolemmy) w homogenatach mięśnia sercowego (CHENG i współaut. 1996b). Na podstawie wyników osiągniętych tymi metodami można z dużym prawodopodobieństwem zaproponować, że każdy aktywowany kanał wapniowy sarkolemmy "polewa" prądem wapniowym grupę kilku kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej, powodując ich aktywację. Przez pewien czas posuwano się nawet do twierdzenia, że te grupy są czynnościowo izolowane, to jest że wapń wydzielony do szczeliny diady przez jedną grupę nie aktywuje innych grup. Uwzględniając geometrię szczeliny twierdzenie takie wydaje się mało prawdopodobne i obecnie wszyscy się z niego wycofują.

Zasadniczym źródłem Ca²⁺ aktywującego kanały wapniowe siateczki sarkoplazmatycznej są niewątpliwie kanały wapniowe sarkolemmy. Jednakże okazało się, że zablokowanie prądu wapniowego, na przykład, nifedipiną nie całkowicie wyłącza aktywację kanałów siateczki w odpowiedzi na depolaryzację komórki. Jest ona całkowicie blokowana przez dodatkowe wyłączenie wymieniacza Na/Ca. Dlatego też niektórzy autorzy proponują, że odwrócona na samym początku pobudzenia komórki wymiana Na/Ca może być dodatkowym aktywatorem kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej. Mechanizm odwrócenia byłby następujący. Napływ Na⁺ do szczeliny diady

przez aktywowane kanały sodowe powoduje przesunięcie potencjału równowagi wymiany Na/Ca w kierunku ujemnym. Jednocześnie potencjał błonowy ulega odwróceniu z ujemnego na dodatni. Dzięki temu w ciągu początkowych milisekund pobudzenia komórki potencjał błonowy jest silnie dodatni w stosunku do potencjału równowagi wymiany, która ulega odwróceniu. Napływający tą drogą Ca²⁺ może współuczestniczyć w aktywacji kanałów wapniowych siateczki sarkoplazmatycznej. Silny wzrost stężenia Ca^{2+} powoduje w ciągu dalszych milisekund przesunięcie potencjału równowagi wymiany w kierunku dodatnim, co przywraca jej normalny kierunek. Uwzględniwszy wyniki wszystkich poświęconych temu zagadnieniu prac można powiedzieć, że głównym aktywatorem kanałów wapniowych siateczki jest niewątpliwie sarkolemmalny prąd wapniowy. Odwrócona wymiana Na/Ca może dostarczać maksymalnie około 30% wapnia aktywującego te kanały, zwłaszcza w warunkach sprzyjających odwróceniu, na przykład na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Na⁺ dzięki zatruciu glikozydami naparstnicy (SANTI i współaut. 1995).

Przedstawione powyżej badania potwierdziły przypuszczenie, że globalny wzrost stężenia Ca²⁺ w pobudzonej komórce jest wynikiem wielu zjawisk jednostkowych i że w poszczególnych przedziałach cyklu i w poszczególnych obszarach muszą w komórce powstawać ogromne gradienty stężeń Ca²⁺. I rzeczywiście, łącząc technikę obrazowania struktur sarkomeru z rejestracją lokalnych stężeń Ca2+ wykazano, że w pierwszych 15 ms cyklu bezpośrednio mierzone stężenie Ca²⁺ w pobliżu prążków Z, to jest w obszarze lokalizacji diad rośnie do 1 µM, podczs gdy w środku sarkomeru wynosi tylko 230 nM. Uwzględniając właściwości użytej sondy wapniowej i techniki mikroskopowej autorzy sądzą, że rzeczywiste stężenie Ca²⁺ w pobliżu prążka Z jest wielokrotnie wyższe. Gradient stężeń Ca²⁺ powoduje jego szybki przepływ od źródła, którym jest szczelina diady do punktów wiązania troponiny C (ISENBERG i współaut. 1996).

Rekapitulując można powiedzieć, że zgodnie z powszechnie przyjętym modelem sprzężenia elektromechanicznego serca bezpośrednim, głównym źródłem Ca²⁺, aktywującego skurcz jest siateczka sarkoplazmatyczna, która wyłapuje go z sarkoplazmy. Jest on z niej wydzielany na skutek aktywacji kanałów wapniowych siateczki przez prąd wapniowy płynący przez aktywowane kanały wapniowe sarkolemmy i ewentualnie przez napływ Ca²⁺ na drodze odwróconej wymiany Na/Ca. Zjawiska jednostkowe w obrębie pojedynczych diad generują ogromne gradienty stężeń Ca²⁺, dzięki którym Ca²⁺ dyfunduje wzdłuż całego sarkomeru aktywując jego skurcz. Rozkurcz jest wynikiem ponownego wyłapania Ca²⁺ z sarkoplazmy przez siateczkę sarkoplazmatyczną oraz jego transportu z komórki na drodze wymiany Na/Ca w takiej ilości, w jakiej napłynął on przez kanały wapniowe sarkolemmy.

Istnieje jednakże szereg faktów doświadczalnych oraz obserwacji klinicznych, które pozornie przynajmniej nie pasują do tego obrazu. Mam tu na myśli wyniki czynnościowego wyłączania siateczki sarkoplazmatycznej przez blokowanie jej Ca²⁺ ATPazy oraz jej kanałów wapniowych, jak również zjawiska rozgrywające się w mięśniu sercowym w schyłkowych stadiach niewydolności serca.

METODY BLOKOWANIA CZYNNOŚCI SIATECZKI SARKOPLAZMATYCZNEJ I TEGO SKUTKI

Tapsigargina i kwas cyklopiazonowy są wybiórczymi inhibitorami Ca²⁺ ATPazy siateczki sarkoplazmatycznej (KIRBY i współaut. 1992, THASTRUP i współaut. 1990, WRZOSEK i współaut. 1992) i do tej pory brak jest przekonywujących doniesień o innym działaniu w stosunku do miocytów serca. Po ich zastosowaniu pobór Ca²⁺ przez siateczkę sarkoplazmatyczną całkowicie ustaje, a ponieważ siateczka traci wapń za każdym pobudzeniem komórki, a także w stanie spoczynku, po kilku minutach zostaje całkowicie pozbawiona Ca²⁺. Między innymi przejawia się to brakiem reakcji na kofeinę. Tapsigargina i kwas cyklopiazonowy są więc znakomitymi narzędziami badawczymi.

Kofeina w stężeniu 10 mM i wyższych w ciągu milisekund dyfunduje do komórki i aktywuje kanały wapniowe siateczki. Ponieważ blokuje również jej Ca²⁺-ATPazę, siateczka zostaje natychmiast pozbawiona Ca²⁺. Komórka reaguje na kofeinę silnym wzrostem stężenia Ca²⁺ w sarkoplazmie i skurczem. Oba zjawiska szybko przemijają na skutek transportu Ca²⁺ z komórki przez wymianę Na/Ca. Kofeina zwiększa jednak aktywację kanałów Ca²⁺ sarkolemmy i fosforylację fosfolambanu na skutek zahamowania fosfodiesterazy, enzymu rozkładającego cykliczny AMP, a więc jej działanie jest mało wybiórcze.

Rianodyna wiąże się z częścią receptorową kanałów Ca²⁺ siateczki. W stężeniach 0,1–10 μM blokuje je w stanie częściowo otwartym (BULL i współaut. 1989, FEHER i LIPFORD 1985), dzięki czemu Ca²⁺ pompowany do siateczki przez AT-Pazę natychmiast wypływa do szczeliny diady i zostaje przetransportowany na zewnątrz komórki przez wymieniacz Na/Ca (JANIAK i LEWARTOWSKI 1996a, b, LEWARTOWSKI i WOLSKA 1993). Tak więc rianodyna w niskim stężeniu zwiększa przepływ Ca²⁺ przez siateczkę i na zewnątrz i uniemożliwia jego magazynowanie. Rianodyna w stężeniu 100 μ M blokuje kanały wapniowe siateczki (MEISSNER 1986).

Tapsigargina zmniejsza siłę skurczu pojedynczych miocytów świnki morskiej (Lewar-TOWSKI i współaut. 1994, LEWARTOWSKI i WOL-SKA 1993) i człowieka (DAVIA i współaut. 1997) o 0%-30%, miocytów królika o 50% (BAUDET i współaut. 1993) a miocytów szczura o 70% (JANIAK i LEWARTOWSKI 1996a). U wszystkich wymienionych gatunków tapsigargina około 2krotnie zwalnia szybkość narastania skurczu (zwiększa czas od początku do szczytu skurczu). Wpływ na szybkość rozkurczu u świnki i człowieka jest niewielki, nieco większy u królika, natomiast u szczura rozkurcz zostaje wielokrotnie wydłużony. Podobny wpływ ma tapsigargina na przebieg sygnału wapniowego w pobudzonej komórce (LEWARTOWSKI i współaut. 1994). Ze względu na podobieństwo fizjologii serca świnki morskiej i człowieka szczególnie interesujące są wyniki badań kardiomiocytów tego właśnie gatunku. Utrzymanie dużej siły skurczu w komórkach potraktowanych tapsigarginą nie jest spowodowane zwiększeniem napływu Ca^{**} do komórki. Prąd wapniowy badany w tych komórkach klasyczną metodą "voltage clamping" nie nasila się (LEWARTOWSKI i współaut. 1994). W pracy, w której użyto potencjału czynnościowego jako impulsu kontrolującego potencjał błonowy stwierdzono nasilenie I_{Ca} o około 30% (CESARE i współaut. 1997). Jednakże utrzymanie w komórkach badanych klasycznie siły skurczu na poziomie kontrolnym wskazuje, że nasilenie I_{Ca} nie jest koniecznym tego warunkiem. Również i wymiana Na/Ca nie ulega w tych komórkach zmianom, które mogłyby kompensować utrzymanie dużej siły skurczu mimo wyłączenia czynności siateczki sarkoplazmatycznej (JA-NIAK i LEWARTOWSKI 1996b). Tak więc wyniki te prowadzą do wniosku, że u świnki morskiej i człowieka napływ zewnątrzkomórkowego Ca jest wystarczający dla aktywacji skurczu i że siateczka sarkoplazmatyczna nie jest jego niezbędnym źródłem.

Pozornie wyniki doświadczeń z rianodyną w niskich stężeniach są sprzeczne z wynikami doświadczeń z tapsigarginą. Rianodyna obniża siłę skurczu miocytów świnki morskiej o 30%–70% wywierając podobny do tapsigarginy wpływ na jego kinetykę. Jednakże tapsigargina i kwas cyklopiazonowy, a także rianodyna w dużym stężeniu odwracają wpływ niskich stężeń rianodyny na siłę skurczu (JANIAK i LE-WARTOWSKI 1996a, LEWARTOWSKI i współaut. 1994). Dowodzi to, że ten efekt nie jest wynikiem zubożenia siateczki w Ca²⁺, jak to dotychczas sądzono, a wynikiem tego, że Ca²⁺, napływający z zewnątrz, jest wychwytywany przez ATPazę siateczki, natychmiast przez nią przepływa i jest usuwany na zewnątrz przez wymieniacz Na/Ca, zanim zdąży dotrzeć do układów kurczliwych.

Czy i jak można wobec tego pogodzić te wyniki z przyjętym powszechnie modelem sprzężenia elektromechanicznego w miocytach serca? Wydaje się, że sprzeczność ta jest pozorna. Należy tylko, zgodnie z faktami doświadczalnymi przyjąć, że wielkość napływu Ca²⁺ do komórki, a tym samym jego udział w aktywacji skurczu jest u różnych gatunków różny (ryc.1 A i B). U świnki morskiej i u człowieka jest on tak duży, że wystarczy do aktywacji skurczu. Jednakże wszystko wskazuje na to (brak miejsca nie pozwala mi na przytoczenie danych doświadczalnych), że w normalnych miocytach tych gatunków Ca²⁺, napływajacy w danym cyklu z zewnątrz, przede wszystkim przez kanały wapniowe sarkolemmy, jest wychwytywany przez siateczkę sarkoplazmatyczną (nie dopuszczany do układów kurczliwych), magazynowany do następnego cyklu i wtedy dopiero uwalniany, jak to opisano powyżej. Siateczka w tym cyklu znowu wychwytuje Ca²⁺ napływający z zewnątrz, a ten, który został przez nią uwolniony, zostaje przetransportowany na zewnątrz przez wymieniacz Na/Ca (ryc. 1A). Jest to główny mechanizm rozkurczu. Obieg Ca²⁺ w miocytach świnki morskiej i człowieka jest w dużym stopniu otwarty do przestrzeni pozakomórkowej. Tak więc zgodnie z przyjętym modelem, w normalnych miocytach świnki morskiej i człowieka siateczka byłaby jednak bezpośrednim źródłem aktywującego skurcz. Zablokowanie Ca Ca²⁺ATPazy siateczki tapsigarginą lub jej kanałów wapniowych poprzez duże stężenia rianodyny wyłącza ją z obiegu, co jednak nie zmniejsza siły skurczu, który jest teraz aktywowany przez zewnątrzkomórkowy Ca²⁺, bezpośrednio docierający do układów kurczliwych. Jaka byłaby wobec tego fizjologiczna rola siateczki u tych gatunków? Jak wynika z porównania skurczu przed i po zatruciu tapsigarginą niewątpliwie jest to kontrola jego kinetyki. Działanie wszystkich opisanych powyżej subtelnych mechanizmów związanych z funkcjonowaniem diad zapewnia szybką i równomierną aktywację sarkomerów, co decyduje o szybkim rozwoju skurczu. Po wyłączeniu siateczki, co powoduje zanik ogromnych gradientów stężeń, Ca²⁺ dyfundujący z zewnątrz dociera do sarkomerów wolniej i mniej równomiernie. Powoduje to zwolnienie kinetyki skurczu, aczkolwiek jego siła zostaje zachowana.

U szczura napływ Ca²⁺ do komórek mięśniowych wystarcza do aktywacji niewielkiej części siły skurczu. U tego i zbliżonych gatunków (chomik) obieg Ca²⁺ jest w dużym stopniu zamknięty, to jest Ca²⁺ uwolniony z siateczki jest przez nią ponownie wychwytywany, a tylko niewielka jego ilość (równa napływowi) jest transportowana na zewnątrz przez wymieniacz Na/Ca (ryc. 1B). U tych gatunków siateczka jest więc niezbędnym źródłem Ca²⁺ aktywującego skurcz, jak również głównym czynnikiem relaksacyjnym.

Takie ujęcie mechanizmu sprzężenia elektromechanicznego miocytów serca ma również poważne implikacje kliniczne. Jednym z głównych elementów biologii miocytów zmienionej w toku rozwoju niewydolności serca jest zanik ekspresji Ca^{**}-ATPazy siateczki sarkoplazmatycznej, a tym samym jej aktywności (HASEN-FUSS i współaut. 1994). Stan miocytów w schyłkowej niewydolności serca jest porównywalny do stanu miocytów w doświadczeniach z tapsigarginą. Przejawia się to między innymi tym, że kinetyka skurczu miocytów izolowanych z serc eksplantowanych z powodu niewydolności jest taka, jak miocytów potraktowanych tapsigarginą i związek ten nie ma na nie żadnego wpływu (DAVIA i współaut. 1997). Jednakże całkowita siła skurczu takich miocytów nie jest mniejsza od normalnych, a mała siła skurczu całego serca jest wynikiem przede wszystkim zmniejszenia liczby miocytów i przemodelowania przestrzeni pozamiocytarnej (przede wszystkim tkanki łącznej) (DA-VIA i współaut. 1997, GWATHMEY i współaut. 1995). Niewątpliwie fakt, że w miocytach serca ludzkiego skurcz może być aktywowany przez Ca²⁺ zewnątrzkomórkowy umożliwia jakiś czas życie, mimo zaniku aktywności ATPazy siateczki sarkoplazmatycznej.

EXCITATION-CONTRACTION COUPLING IN CARDIAC MYOCYTES

Summary

It is experimentally well established that under physiological conditions sarcoplasmic reticulum (SR) is the main direct source of contractile Ca^{2+} . The Ca^{2+} release channels of the SR are activated by Ca^{2+} influx into the diadic clefts through the activated sarcolemmal Ca^{2+} channels. The rapid release of Ca^{2+} from SR generates sharp gradients of $[Ca^{2+}]$ between the diadic clefts and bulk sarcoplasm and along the sarcomers. Due to these gradients Ca^{2+} diffuses rapidly from its source (SR) to its sinks (troponin C) this resulting in uniform and rapid activation of the contractile system. The elementary events in the single diads may be observed under special conditions as the Ca^{2+} sparks". Although the SR is a direct source of contractile Ca^{2+} in the cardiac myocytes, in some species, like guinea-pig or humans, extracellular Ca^{2+} influx is sufficient to activate strong contraction. In these species SR provides an important link of the largely opened Ca^{2+} flux, controling the kinetics of myocardial contraction. In these species knocking out of the SR function results mostly in slowing of contraction and relaxation (poisoning with thapsigargin, failing human heart), however, the force of contraction is little affected. In other species, like rat, extracellular Ca^{2+} influx is small and the SR is a link in the mostly closed Ca^{2+} flux. In these species impairment of the SR function results in dramatic reduction in contractile force and in slowing of the contraction kinetics.

LITERATURA

- BULL R. J., MARENGO J., SUAREZ-ISLA J., DONOSO P., SUTKO J. L., HIDALGO C., 1989. Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum by nanomolar concentrations of ryanodine. Biophys J. 56, 749–756.
- BAUDET S., SHAOULIAN R., BERS D. M., 1993. Effects of thapsiargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content of rabbit ventricular muscle. Circ. Res. 73, 813–819.
- CESARE M., TERRACCINO N., MACLEOD K. T., 1997. *Measurements of Ca*²⁺ *entry and sarcoplasmic reticulum Ca*²⁺ *content during the cardiac cycle in guinea-pig and rat ventricular myocytes.* Biophys. J., 72, 1319–1326.
- CHENG H., LEDERER M. R., LEDERER W. J., CANNELL M.B., 1996a. Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. Am. J. Physiol. 270, C148–C159.
- CHENG H., LEDERER M. R., XIAO R. P., GÓMEZ A. M., ZHOU Y. Y., ZIMAN B., SPURGEON H., LAKATTA, E. G., LEDERER W. J., 1996b. Excitation-contraction coupling in heart: new insights fom Ca²⁺ sparks. Cell Calcium, 20, 129–140.
- DAVIA K., DAVIES C. K., HARDING S. E., 1997. Effects of inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. Cardiovasc. Res. 33, 88–97.
- FABIATO A. 1985. Simulated calcium current can both cause calcium loading and trigger calcium rlease from the sarcoplsmatic reticulum of a skinned cardiac Purkinje cell. J. Gen. Physiol. 85, 291–320.
- FEHER J. J., LIPFORD G. B., 1985. Mechanism of action of ryanodine on cardiac sarcoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Acta 813, 77–86.
- FRANK J. S., MOTTINO G., REID D., MOLDAY R. S., PHILIPSON K. D., 1992. Distributing of the Na⁺ -Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal study. J. Cell. Biol. 117, 337–345.
- GRYNKIEWICZ G.. POENIE M., TSIEN R. Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440–3450.
- GWATHMEY J. K., LIAO R., HELM P. A., THAIYANANTHAN G., HAJJAR R., 1995. Is contractility depressed in the failing human heart? Cardiovasc. Drugs and Therap. 9, 581–587.

- HASENFUSS G., REINECKE H., STUDER R., MEYER M., PIESKE B., HOLTZ J., HOLUBARSCH C., POSSIVAL H., JUST H., DREXLER H., 1994. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ AT-Pase in failing and nonfailing human myocardium. Circ. Res. 75, 434–442.
- ISENBERG G., ETTER E. F., WENDT-GALLITELLI M. F., SCHEF-FER A., CARRINGTON W. A., TUFT R. A., FAY F. S., 1966. Intrasarcomere [Ca²⁺] gradients in ventricular myocytes revealed by high speed digital imaging microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5413–5418.
- JANIAK R., LEWARTOWSKI B., 1996a. Functional coupling betweehn sarcoplasmic reticulum and Na/Ca exchange in single myocytes of guinea-pig and rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 28, 253–264.
- JANIAK R., LEWARTOWSKI B. 1996b. The source of contractile calcium in guinea-pig cardiac myocytes treated with thapsigargin. J. Physiol. Pharmacol. 47, 411–423.
- KIRBY M. S., SAGARA Y., GOW S., INUI G., LEDERER W. G., ROGERS T. B., 1992. Thapsigargin inhibits cantraction and Ca²⁺ transnient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. J. Biol. Chem. 267, 12545–12551.
- LANGER G. A., PESKOFF A., 1996. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. Biophys. J. 70, 1169–1182.
- LEDERER W. J., KOFUJI P., DOERING A., NIGGLI E., LIPP P., KIEVAL R. S., CHENG H., CANNELL M., VALDIVIA C., SCHULZE D. H., 1996. Na/Ca exchanger: Molecular and cellular characteristics. [W]: Molecular Physiology and Pharmacology of Cardiac Ion Channels and Transporters (red:) M. MORAD, S. EBASHI, W. TRAUTWE-IN, Y. KURACHI. Kluwer Academic Press.
- LEWARTOWSKI B., RÓŻYCKA M., JANIAK R., 1994. Effects of thapsigargin in normal and pretreated with ryanodine guinea-pig cardiomyocytes. Am. J. Physiol. 266, H1829–H1839.
- LEWARTOWSKI B., WOLSKA B., 1993. The effects of thapsigargin on SR Ca²⁺ content and contractions in single myocytes of guinea-pig heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 25, 23–29.
- LUO W. S., WOLSKA B. M., GRUPP J. L., HARSER J. M., HA-GHIGHI K., FERGUSON D. G., SLACK D. G., GRUPP G.,

DOETSCHMAN T., SOLARO R. J., KRANIAS E. G., 1996. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. Circ. Res. 78, 839–847.

- MEISSNER G., 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 261, 6300–6306.
- PIKULA S. 1997. ATPaza z błon sarkoplazmatycznego retikulum, transportująca jony wapnia. Kosmos, 46, 105–114.
- Post J. A., KUWATA J. H, LANGER G. A., 1993. Discete Na-Ca exchange compartment in cultured neaonatal rat cells. Characteristics, localisation and possible physiological function. Cell Calcium, 14, 61–71.
- RAMON J., LÓPEZ-LÓPEZ, SHACKLOCK P. S., C. W. BALKE C. W., WIER W. G., 1995. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. Science, 268, 1042–1045.
- SANTANA L. F., CHENG H., GÓMEZ A. M., CANNELL M. B., LE-DERER W. J., 1996. Relation between the sarcolemmal Ca²⁺ current and Ca²⁺ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. Circ. Res. 78, 166–171.

- SANTI C. M., CONNOR J. A., HERNANDEZ-CRUZ A., 1995. A significant fraction of calcium transients in intact guinea pig ventricular myocytes is mediated by Na⁺ - Ca²⁺ exchange. Cell. Signalling, 7, 803–820.
- SHENG-YONG WANG PESKOFF A., LANGER G. A., 1996. Inner sarcolemmal leaflet Ca²⁺ biding: Its role in cardiac Na/Ca exchange. Biophys. J. 70, 2266–2274.
- THASTRUP J. P., CULLEN J., DROBAK B., HANLEY M. R., DA-VSON A. P., 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 87, 2466–2470.
- WOLSKA B. M., STOJANOVIC M. O., KRANIAS E. G., SOLARO R. J., 1996. Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular Ca²⁺. Am. J. Physiol. 270, C391–C397.
- WRZOSEK A., SCHNEIDER H., GRUENINGER S., CHIESI M., (1992). Effect of thapsigargin on cardiac muscle cells. Cell Calcium, 13, 281–292.