

심근 미토콘드리아의 소듐에 의한 칼슘유리가 액토마이오신 ATPase활성도에 미치는 영향*

Influence of Sodium-induced Calcium Release from Cardiac Mitochondria on the Actomyosin ATPase Activity

서울대학교 의과대학 약리학교실

김 명 석 · 김 용 식

서 론

심장근 수축시 근세포막흥분-수축연결과정(Excitation-Contraction Coupling, E-C coupling)에 있어서 아직도 명확히 밝혀지지 못한 점은 세포막 탈분극에 따른 활동전압 발생에 이어 세포내부에 증가되는 유리 칼슘이 어디에서부터, 어떠한 기전에 의하여 유래되는 것인가 하는 점이다. 현재로서는 이러한 수축시 세포내에 증가되는 유리칼슘이온의 출처 및 그 동원기전에 있어서, 활동전압의 완만내향전류로서 들어오는 칼슘과 더불어 세포막에서 소듐-칼슘교환기전에 의하여 세포외액으로부터 유입되어 들어오는 칼슘(Niedergerke, 1963; Langer, 1964; Reuter, 1968, 1974; Glitsch et al., 1970; Jundt et al., 1975), 그리고 세포내 칼슘조절기구로서 그 중요성이 제일 많이 인정되고 있는 근장그물(sarcoplasmic reticulum)에서 칼슘에 의한 칼슘유리기전에 의하여 동원되는 칼슘(Fabiato and Fabiato, 1972, 1975; Endo, 1977)이 중요하다는 주장들이 주목을 끌고있다. 한편 이와 더불어 최근에 Carafoli (1974 a, b, 1975), 김(1978, 1981)은 심근세포내 또 다른 칼슘조절기구인 미토콘드리아에서 소듐에 의한 칼슘유리가 있음을 시험관내에서 관찰하고 이러한 현상은 심근수축시 활동전압의 급속내향 전류로 소듐이 세포내로 들어오며, 또 한편 디지탈리스배당체가 강 심작용을 나타낼 때 Na^+ -pump의 억제에 따라 심근세포내에 소듐이 증가한다는 결과 관련을 지어 정상 심근수축, 또는 디지탈리스배당체에 의한 심근수축 증강작용에 있어서 칼슘을 동원하는 기전의 하나가 될 수도 있을 것이라고 추정하였다.

본연구에서는 상기한 보고들에서와 같이 미토콘드리아에서 소듐에 의하여 유리되는 칼슘이 실제로 심근수축시에 직접적으로 이용되는 칼슘일 수가 있을 것인가를 구명하고자 하였으며 그 연구의 일환으로 시험관내에서 미토콘드리아로부터 소듐에 의한 칼슘유리가 있을 수 있는 조건이 심근의 생체내 수축정도를 반영해주는 지표가 될 수 있는 심근 수축단백 액토마이오신의 ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다.

실 험 방 법

1. 심장근 미토콘드리아(mitochondria)의 추출

돼지 심장근에서 Sulakhe and Dhalla (1971)의 방법에 준하여 추출하였다. 도살장에서 신선하게 얻은 돼지 심장에서 지방 조직과 심내외막을 제거하고 심실근만을 취하여 미리 냉각시킨 추출용액(0.25M sucrose, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.0)이 들어 있는 용기에서 잘게 썬 다음 9배 용량의 상기 추출용액에 넣어 Polytron 조직분쇄기(Kinematica PCU-2-110, Switzerland)로 균질화하였다. 균질화한 심근조직을 1,000×g에서 20분동안 냉동원심분리하여 핵, 결핵조직편들을 제거하고 상등액만을 취하여 네김의 cheese cloth를 통하여 여과후 이 여액을 10,000×g에서 20분동안 냉동원심분리하여 미토콘드리아 잔사를 취하였다. 얻어진 미토콘드리아는 다시 9배 용량의 동일 추출용액에 부유하여 같은 방법으로 10,000×g에서 원심분리하여 세척하였으며 이러한 세척은 2회를 반복하되 최종 세척시에는 EDTA를 제외한 추출용액에서 하였다. 마지막으로 얻어진 미토콘드리아는 0.25M sucrose, 5mM Tris-HCl, pH 7.0 용액에 단백질농도가 10mg/ml가 되게 부유시켜 실험에 사용하였다. 상기 조작은 4°C에서 행하였으며, 단백질농도는 Lowry (1951) 방법으로 측정하였다.

* 본 연구는 1980년도 서울의대 동창회 학술재단 연구비와 1982년도 서울대학교 병원 임상연구비 보조로 이루어졌음.

610
Feb
v. 23
c. 3

2. 심근 액토마이오신(actomyosin)의 추출

Pentobarbital sodium 30mg/kg 정맥주사로 마취한 개에서 신선하게 채취한 심장근으로 부터 Ebashi(1961)의 방법으로 natural 액토마이오신을 추출하였다. 추출한 액토마이오신은 최종 KCl농도를 0.6M로 하고 동량의 glycerol과 혼합하여 -20°C에서 저장 보관하였다. 매 실험 때마다 저장 액토마이오신 1 volume을 미리 냉각시킨 세척용액(50mM KCl, 1mM EDTA, 5mM Tris-HCl, pH 7.0) 9 volume에 부유시켜 12,000×g에서 20분동안 냉동원심분리하여 세척하였고, 이러한 세척을 2회 반복한 후 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 7.0 용액에 단백질농도가 7.5mg/ml가 되게 부유시켜 실험에 사용하였다.

3. ATPase 활성도 측정

50mM KCl, 10 μ M CaCl₂, 20mM Tris-HCl pH 7.0에 0~2mM EGTA를 첨가하여 유리 칼슘농도를 10⁻⁹M~5.5×10⁻⁶M로 조절한 기본 반응액에 1mg/ml의 액토마이오신 또는 미토콘드리아를 넣고 37°C 진탕수욕조에서 3분동안 전처치한 후 2mM MgATP를 첨가하므로써 반응을 시작시켰다. MgATP첨가 1분후 반응액과 동량의 미리 냉각시킨 20% TCA 용액을 넣어 반응을 끝내고 즉시 원심분리하여 상층액중의 무기인을 Horwitz(1952)법으로 측정하여 액토마이오신 또는 미토콘드리아의 ATPase활성도를 각각 계산하였다.

한편 미토콘드리아가 칼슘을 흡수하고, 소듐이 칼슘을 유리하게 한 조건에서 액토마이오신을 같이 첨가하여 총 ATPase활성도를 또한 측정하였다. 앞에서와 같은 기본반응액에 1mg/ml 미토콘드리아를 넣고 37°C에서 3분동안 전처치한후 10mM Tris-succinate를 첨가하여 미토콘드리아의 호흡의존성인 칼슘흡수를 시작하였으며 이어서 미토콘드리아의 칼슘 흡수반응이 평형상태에 도달되었을 것으로 보이는 3분후에 2nmole/mg. prot.의 ruthenium red를 넣어 칼슘 흡수를 중지시키고, 30초후 0~10mM의 소듐을 첨가하여 미토콘드리아로 부터의 칼슘유리를 유도하였다. 소듐에 의한 칼슘유리를 유도한 3분후에 액토마이오신 1mg/ml를 첨가하고 1분후 2mM MgATP를 넣어 1분 동안 반응시켰으며 이어 냉각된 20% TCA용액을 넣어 반응을 끝마친후 상기한 Horwitz법으로 유리 무기인을 측정하여(미토콘드리아+액토마이오신)의 총 ATPase활성도를 계산하였다.

한편 이상의 ATPase활성도 측정 실험에 있어서 첨가되는 소듐에 의한 반응액의 이온강도 차이때문에 올 수 있는 ATPase 활성도의 변동은 소듐과 같은 농도의 포타슘을 첨가하여 별도로 측정한 ATPase활성도를 대

조로하여 보정하였다.

4. 칼슘농도측정

반응액중 유리칼슘농도의 변동을 방사성 동위원소 Ca⁴⁵를 사용하여 측정하였다. 상기한 ATPase활성도 측정반응조건에서 10 μ M CaCl₂대신에 CaCl₂+Ca⁴⁵를 넣어 반응을 시킨후 반응액 0.5ml를 milipore filter (HAWP 18mm, pore size 0.45 μ)를 통하여 여과하고, 그 여액 100 μ l를 10ml의 Bray's용액이 들어있는 vial에 넣어 liquid scintillation spectrometer (Nuclear Enterprise, Scotland)로 방사능에 측정하여 유리칼슘농도를 계산하였다.

실험 결과

ATPase활성도의 칼슘의존성

i. 액토마이오신 ATPase: 총칼슘이 10 μ M함유된 반응액에 칼슘 chelator EGTA를 0~2mM 첨가하여 유리칼슘농도를 10⁻⁹~5.5×10⁻⁶M로 조절하였을 때 ATPase 활성도는 유리칼슘농도의 증가에 따라 점차 증가되었으나 특히 2×10⁻⁸~3×10⁻⁶M 범위내의 칼슘농도에서는 액토마이오신 ATPase의 활성도가 반응액내 칼슘에 아주 민감한 의존성을 나타내었다. 즉 Table 1. 및 Fig. 1.에서와 같이 칼슘농도가 10⁻⁹M에서 2.2×10⁻⁶M까지 낮은 농도에서 증가할때는 액토마이오신 ATPase 활성도가 2.4nmole Pi/mg. prot./min.에서 29.1nmole Pi/mg. prot./min로 비교적 낮은 증가를 보이나, 칼슘농도가 7.6×10⁻⁷ 및 3.2×10⁻⁶로 되었을 때는 ATPase활성도가 각각 99.4 및 117.8nmole Pi/mg. prot./min로 아주 현저히 증가되었으며 그 이후에는 칼슘농도가 증가하더라도 더 이상의 뚜렷한 ATPase 활성의 증가는 볼 수 없었다.

Table 1. Activity of calcium-activated natural actomyosin ATPase from dog heart (nmole Pi/mg.prot./min.) (Mean±S.E.)

Free Ca ⁴⁵ (M), Calculated	Activity
10 ⁻⁹	2.4± 1.3
4×10 ⁻⁹	16.6± 9.7
1.1×10 ⁻⁸	26.7±10.9
2.2×10 ⁻⁸	29.1± 8.9
5.1×10 ⁻⁸	50.0±10.1
7.6×10 ⁻⁷	99.4±10.4
3.2×10 ⁻⁶	117.8±29.8
5.5×10 ⁻⁶	119.2±28.4

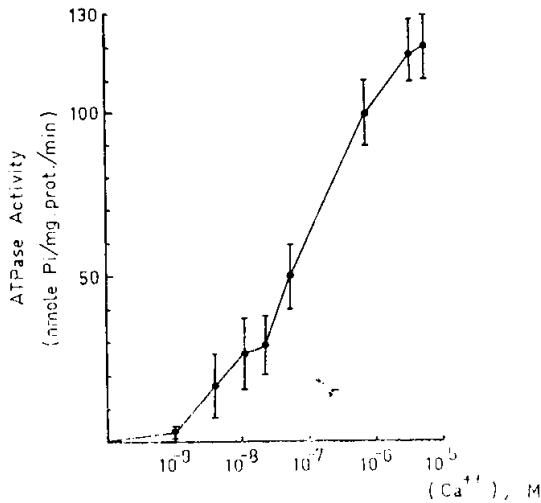


Fig. 1. Calcium dependency of cardiac actomyosin ATPase.

미토콘드리아 ATPase: 한편 미토콘드리아 ATPase는 앞의 결과에서와 같은 액토마이오신 ATPase 활성도의 칼슘의존성과는 달리 같은 범위의 유리칼슘농도의 변화에도 활성도의 변화를 보이지 않았으며 본실험의 경우 전칼슘농도에서 65~70nmole Pi/mg. prot./min로 ATPase활성의 칼슘의존성을 보이지 않았다.

2. ATPase활성도에 대한 소듐의 영향

액토마이오신 ATPase와 미토콘드리아 ATPase 각각에 대한 영향: ATPase활성도의 칼슘의존성을 관찰한 실험결과를 참작하여 액토마이오신 ATPase활성도를 민감하게 변동시키는 범위내에 있는 칼슘농도인 $7.6 \times 10^{-7}M$ 로 반응액내의 유리칼슘농도를 고정하여 실험하였다. 즉 $7.6 \times 10^{-7}M$ 의 유리 칼슘을 함유한 기본 반응액에 10mM이내의 소듐을 첨가하였을 경우 소듐을 넣지 않았을 때와 비교하여 액토마이오신이나 미토콘드리아 각각의 ATPase활성도는 변화를 보이지 않았다 Table 2에서와 같이 액토마이오신 ATPase의 경우 2,5 및 10mM의 소듐첨가시 활성도는 80.4~83.7nmole Pi/mg. prot./min.로서 소듐이 들어있지 않을 때의 활성도인 81.1 nmole Pi/mg. prot./min와 차이를 나타내지

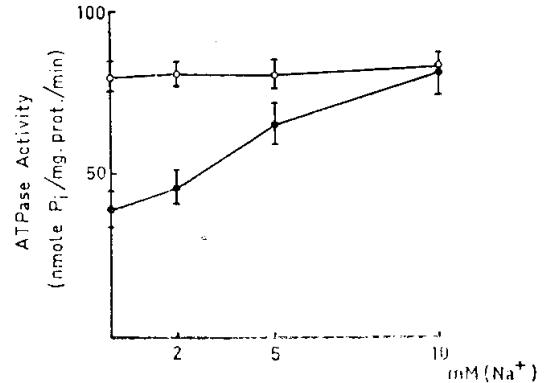


Fig. 2. Influence of sodium on the ATPase activity of cardiac actomyosin. [—○—]: Actomyosin only, [---□---]: (Mitochondria+Actomyosin) - (Mitochondria).

않았으며, 미토콘드리아 ATPase활성도 역시 동일 농도의 소듐 첨가 전후에 67.6~71.6 nmole Pi/mg. prot./min로 소듐에 의한 변화를 보이지 않았다.

(**미토콘드리아+액토마이오신**) ATPase에 대한 영향: 실험방법에서와 같이 미토콘드리아가 호흡의존성으로 칼슘을 흡수하고, 유리할 수 있는 조건에서 액토마이오신이 같이 존재할 경우(미토콘드리아+액토마이오신)의 총 ATPase 활성도에 대한 소듐의 영향을 관찰하였던 바 Table 2에서처럼 반응액중에 소듐이 첨가되지 않았을 때 ATPase의 총활성도는 106.9 nmole Pi/mg. prot./min로서 각각 측정된 액토마이오신과 미토콘드리아의 ATPase활성도를 합한 값보다 훨씬 낮았다. 그러나 소듐이 첨가되었을 경우 활성도는 점차 증가되어 10mM Na^+ 에서는 총활성도가 154.7nmole Pi/mg. prot./min로 되어 각각의 액토마이오신과 미토콘드리아 ATPase의 활성도를 합한 것과 동등한 값을 나타내므로써 (미토콘드리아+액토마이오신) ATPase는 소듐에 의하여 활성화 되는 것과 같은 결과를 보였다.

한편 이와같은 실험조건중 단지 액토마이오신은 동일량의 완충용액으로 대체하고 똑 같은 과정으로 반응시켜 미토콘드리아 ATPase만의 활성도를 측정하고,

Table 2. Sodium dependency of ATPase activities of cardiac actomyosin and mitochondria (nmole Pi/mg. prot./min.) (Mean±S.E.)

Na^+	Actomyosin(AM)	Mitochondria(Mito)	AM+Mito	(AM+Mito)-(Mito)
0	81.1±5.1	67.6±6.0	106.9±4.7	38.7±5.4
2	80.9±3.8	68.9±5.1	114.8±5.4	45.7±4.8
5	80.4±4.7	69.4±6.4	135.3±6.8	65.5±6.6
10	83.7±4.0	71.6±5.7	154.7±7.2	81.8±7.9

Table 3. Calcium release from mitochondria by sodium and potassium

	K ⁺	Na ⁺
2mM	*59.1±1.4	*79.5±7.0
5mM	60.1±3.1	87.1±1.4
10mM	68.8±3.3	91.9±1.7

*: The remaining Ca²⁺ is expressed as a percentage of Ca²⁺ added in the reaction medium.

그 값을 (미토콘드리아+액토마이오신) ATPase의 총 활성도에서 제하여 미토콘드리아 존재시 액토마이오신의 ATPase활성도로 하였을 경우 소듐첨가 전에는 38.7 nmole Pi/mg. prot/min로서 미토콘드리아가 존재하지 않은 조건의 액토마이오신 ATPase보다 훨씬 낮은 활성도를 보였으나 소듐 첨가에 의하여 역시 활성도가 증가하여 10mM Na⁺에서는 미토콘드리아가 없는 액토마이오신만의 ATPase와 동등한 활성도를 나타내었다 (Table 2, Fig. 2).

3. 소듐에 의한 칼슘유리

미토콘드리아와 액토마이오신이 같이 존재하는 조건에서 소듐에 의한 ATPase 활성의 변화를 측정함과 동시에 반응액 중의 칼슘농도를 또한 측정한 결과 Table 3에서와 같이 소듐이 첨가됨에 따라 반응액중에 잔존하는 칼슘은 증가되었으며 10mM Na⁺의 경우 기본반응액 중에 함유되었던 칼슘의 90%이상이 반응종료후의 반응액에 잔존하였다. 이러한 결과는 미토콘드리아가 흡수하고 있던 칼슘이 소듐에 의하여 유리된 결과라고 여겨진다.

고 찰

미토콘드리아에서의 소듐에 의한 칼슘유리현상이 정상 심근수축 또는 디지털리스배당체의 강심작용시 세포내에 증가하는 교환가능한 유리칼슘을 동원하는 기전의 하나가 될 수도 있을 것이라는 보고들은 (Carafoli, 1974 a, b, 1975; Kim, 1978; Kim et al., 1981) 정상 심근 수축의 경우 E-C coupling과정중 세포막 탈분극에 의하여 발생하는 활동전압의 급속내향전류로서 세포내에 소듐이 유입되며, 또 디지털리스 강심배당체는 세포막의 Na-pump를 억제하므로써 심근 세포내 소듐 농도를 증가시킬 것이라는 점등에서 흥미로운 주장일 수가 있지만 이러한 보고들에서와 같은 현상이 실제로 생체내에서도 일어날 수 있을 것인지, 다시 말해서 정상 심근 또는 약리학적인 면에서 심근 세포내의 소듐

증가가 미토콘드리아로부터 칼슘을 유리한다 하더라도 그 칼슘을 심근 수축기구가 실제로 이용할 수 있을 것인가 하는 점에 대하여는 아직까지는 뒷받침할만한 실험적인 증거들이 없기 때문에 무엇이든 단언할 수는 없다. 그러나 비록 시험관내 관찰이기는 하지만 본실험에서 액토마이오신이 미토콘드리아와 같이 존재할 때 소듐이 ATPase를 활성화시킨 결과는 상기한 추정들의 가능성을 어느 정도는 인정할 수도 있지 않을까 보여진다. 즉 미토콘드리아 ATPase 및 액토마이오신 ATPase 각각의 활성도는 소듐에 의하여 하등의 영향을 받지않음에도 불구하고 미토콘드리아가 생체에서와 같은 호흡의 존성으로 칼슘을 흡수하고, 유리할 수 있는 조건에서 액토마이오신이 같이 존재할 경우에는 소듐에 의하여 ATPase가 활성화되는 결과를 보였는 바, 이러한 현상은 첨가된 소듐이 미토콘드리아로부터 칼슘을 유리하고, 그 칼슘이 다시 2차적으로 칼슘에 민감한 액토마이오신 ATPase를 활성화시킨 것이라고 해석할 수 있겠으며, 이러한 결론은 ATPase활성도와 동시에 반응액내의 유리칼슘농도를 측정하였을 때 소듐첨가에 의하여 반응액중에 잔존하는 유리칼슘이 높았던 것과도 부합되는 결과라고 여겨진다.

이와같은 실험결과는 소듐에 의하여 미토콘드리아로부터 유리되는 칼슘이 심근 수축기구에 이용되는 칼슘의 일부가 될 수 있으리라는 하나의 간접적인 증거는 될 수 있겠으나, 그러나 Carafoli (1974a, b, 1975, 1978), Affolter 등 (1976)이 주장하듯이 미토콘드리아에서의 소듐에 의한 칼슘유리가 정상심근 수축의 E-C coupling시 활동전압의 전파에 이어 세포내에 증가되는 칼슘을 동원하는 주기전이라고 말하기는 역시 곤란하다. 지금까지 알려지기로는 정상심근의 수축-이완에 있어서 매박동시 세포내에 유입되는 소듐은 60 μM/kg, heart/beat로서 (Langer, 1977) 이만한 양의 소듐은 본실험에서와 같은 칼슘을 유리하고 액토마이오신 ATPase를 활성화하는 mM범위의 소듐과는 큰 차이를 보이기 때문이다.

그러나 한편 본실험 결과를 정상심근의 매 박동시 수축보다 디지털리스배당체의 강심작용면에서 보았을 때는 보다 흥미로운 것으로 여겨진다. 디지털리스배당체는 근세포막에서 Na-pump의 역할을 하는 Na⁺-K⁺-ATPase를 특이하게 억제하므로써 세포내 소듐농도를 증가시키며, 이러한 소듐의 증가가 기전은 확실치 않으나 2차적으로 세포내 칼슘을 증가시켜서 심근수축 증강효과를 나타낼 것으로 여기는 것이 많은 사람들의 주장이지만 (Lee and Klaus, 1971; Schwartz et al., 1975; Langer, 1977; Akera et al., 1978), 연구자에

따라서는 니지탈리스배당체의 유효강심농도에서는 Na-pump의 억제가 현저하지 못하며 세포내 소듐농도의 변화없이도 심근수축이 증가한다고 보고 하고 있어서 (Bentfield, 1979; Okita, 1977) Na-pump의 억제 및 세포내 소듐증가가 니지탈리스배당체의 강심작용에 1차적으로 있어야되는 현상인가에 대해서는 논란이 많았다. 그러나 최근 Na-selective glass microelectrode를 사용하여 심장근 Purkinje fiber에서 세포내 소듐을 측정할 결과에 의하면 정상에서 6~7mM인 세포내 소듐이온환성(a^iNa)이 $10^{-7}M$ 의 니지탈리스배당체(dihydro-ouabain)를 처리하였을 때 10~11mM까지 증가하며 그와 동시에 수축력도 증가하였고 배당체의 농도를 $10^{-6}M$ 로 높임에 따라 용량의존적으로 a^iNa 또한 19mM로 증가되었다고 보고하고 있어서 (Lee et al., 1975, 1980; Ellis, 1977; Deitmer and Ellis, 1978) 세포내 소듐이온의 증가가 니지탈리스배당체의 강심작용을 위하여는 필수적인 현상인 것이라는 종래의 많은 연구자들의 주장을 지지하고 있다.

이러한 관점에서 보았을 때 본 실험에 있어서도 미토콘드리아 존재시 유효강심 농도의 니지탈리스배당체에 의하여 세포내에 증가되는 범위에 있는 2~10mM의 소듐에 의하여 액토마이오신 ATPase가 활성화되고 반응액내 유리칼슘농도가 증가된 결과는 생체내에서 니지탈리스배당체의 강심효과도 세포내에 증가되는 소듐이 미토콘드리아로부터 칼슘을 유리하므로써 세포내 칼슘농도를 높이고 따라서 심근수축력이 증강될 수 있지 않을까 생각하였다.

요 약

미토콘드리아에서 소듐에 의하여 유리되는 칼슘이 심근수축시에 직접적으로 이용되는 칼슘인 수가 있을 것인가를 구명하는 연구의 일환으로 소듐이 미토콘드리아에서부터 칼슘을 유리할 수 있는 시험관내 조건이 심근 수축정도를 반영해주는 지표가 되는 수축단백 액토마이오신의 ATPase활성도에 미치는 영향을 관찰하였다.

액토마이오신 ATPase 자체는 소듐에 의하여 그 활성도가 변화할 받지 않았으나 미토콘드리아가 생체에서와 같이 호흡의존성으로 칼슘을 흡수 유리할 수 있는 조건에서 액토마이오신이 함께 존재할 경우에는 2~10mM의 소듐 첨가에 의하여 ATPase활성도가 증가되고 동시에 반응액중의 유리칼슘농도도 증가하였다 이러한 현상은 소듐이 미토콘드리아로부터 칼슘을 유리하고, 그 칼슘이 다시 칼슘에 민감한 액토마이오신

ATPase를 활성화시킨 결과라고 해석되었으므로 따라서 소듐에 의한 미토콘드리아로부터의 칼슘유리는 니지탈리스강심배당체 투여와 같이 심근세포내 소듐을 증가시킬 수 있는 상황에서는 심근수축기구가 이용하는 칼슘을 동원하는 기전의 하나가 될 수 있을 것으로 사료하였다.

—ABSTRACT—

Influence of Sodium-induced Calcium Release from Cardiac Mitochondria on the Actomyosin ATPase Activity

Myung Suk Kim and Yong Sik Kim

Department of Pharmacology, College of Medicine
Seoul National University

The calcium sensitive ATPase activity of actomyosin extracted from dog heart was measured in a reaction condition, under which the release of calcium from cardiac mitochondria could be induced by sodium. In spite of sodium insensitivity, the ATPase activity of actomyosin, when incubated with mitochondria, increased with the addition of 2~10mM sodium. Such an increase in the activity of actomyosin ATPase was interpreted as the result of calcium release from the mitochondria by sodium. And it was also considered from the result that the sodium induced calcium release from mitochondria might be related with the positive inotropic effect of digitalis cardiac glycoside, which could produce the elevation of intracellular sodium secondary to the inhibition of the membrane sodium-pump.

REFERENCES

- Affolter, H., Chiesi, M., Dabrowska, R. and Carafoli, E.: *Calcium regulation in heart cells. The interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum with troponin-bound calcium.* *J. Biochem.*, 67:389-396, 1976.
- Akera, T. and Brody, T.M.: *The role of Na⁺, K⁺-ATPase in the inotropic action of digitalis.* *Pharmacol. Rev.*, 29:187-220, 1978.
- Bentfield, M., Lullmann, H., Peters, T. and Proppe, D.: *Interdependence of ion transport and the action*

- of ouabain in heart muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 61: 19-27, 1977.
- Carafoli, E.: Mitochondrial uptake of calcium ion and the regulation of cell function. *Biochem. Soc. Symp.*, 39:89-109, 1974.
- Carafoli, E.: Mitochondria, Ca^{2+} transport and the regulation of heart contraction and metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:83-89, 1975.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetto, R. and Kratzing, C.: The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6:361-371, 1974.
- Deitmer, J.W. and Ellis, D.: The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibers during inhibition and re-activation of the Na-K pump. *J. Physiol.*, 284:241-259, 1978.
- Ebashi, S.: Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem. (Tokyo)*, 50:236-244, 1961.
- Ellis, D.: The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibers. *J. Physiol.*, 237:211-240, 1977.
- Endo, M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, 57:71-108, 1977.
- Fabiato, A. and Fabiato, F.: Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Cir. Res.*, 31:293-307, 1972.
- Fabiato, A. and Fabiato, F.: Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.*, 249:469-495, 1975.
- Glitsch, H.G., Reuter, H. and Scholz, H.: The effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J. Physiol.*, 209:25-43, 1970.
- Horwitt, B.N.: Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J. Biol. Chem.*, 199:537-541, 1952.
- Jundt, H., Poriz, H., Reuter, H. and Stucki, J.W.: The effect of substances releasing intracellular calcium ions on sodium dependent calcium efflux from guinea-pig auricles. *J. Physiol.*, 246:229-253, 1975.
- Kim, M.S.: The calcium release from cardiac mitochondria by sodium and potassium. *Korean J. Pharmacol.*, 14:1-11, 1978.
- Kim, Y.S., and Kim, M.S.: The influence of sodium on the calcium release from cardiac mitochondria. *Korean J. Pharmacol.*, 17:1-8, 1981.
- Langer, G.A.: Kinetics of calcium distribution in ventricular muscle of the dog. *Cir. Res.*, 15:393-405, 1964.
- Langer, G. A.: Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. *Fed. Proc.*, 36:2231-2234, 1977.
- Lee, C.O. and Fozzard, H.A.: Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle. *J. Gen. Physiol.*, 65:695-708, 1975.
- Lee, C.O., Kang, D.H., Sokol, J.H. and Lee, K.S.: Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac Purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain. *Biophys. J.*, 29:315-330, 1980.
- Lee, K.S. and Klaus, W.: The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol. Rev.*, 23:193-261, 1971.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Niedergerke, R.: Movements of Ca in frog heart ventricles at rest and during contractures. *J. Physiol.*, 167:515-550, 1963.
- Okita, G.T.: Dissociation of Na, K-ATPase inhibition from digitalis inotropy. *Fed. Proc.*, 36:2225-2230, 1977.
- Reuter, H. and Seitz, N.: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol.*, 195:451-470, 1968.
- Reuter, H.: Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium: Mechanisms and physiological significance. *Cir. Res.*, 34:599-605, 1974.
- Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase; pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27:3-134, 1975.
- Sulakhe, P.V. and Dhalla, N.S.: Excitation-contraction coupling in heart. VII. Calcium accumulation of subcellular particles in congestive heart failure. *J. Clin. Invest.*, 50:1019-1027, 1974.