

Propranolol 이 심근 sarcoplasmic reticulum 및 mitochondria 의 Ca⁺⁺ 조절작용에 미치는 효과에 관한 연구

〈지도 서 경 필** 교수〉

최 수 승*

— Abstract —

Effect of Propranolol on the Ca⁺⁺-regulation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria

Soo Seung Choi, M.D.*

(Directed by Professor Kyung Phill Suh, M.D., Ph. D.)**

Propranolol is one of clinically useful antiarrhythmic agents and electrophysiologically classified as group II. And the negative inotropic effect which is not related to adrenolytic effect has been demonstrated with high concentration of propranolol. On the other hand, it has been well known that the calcium plays a central role in excitation-contraction coupling process of myocardium and also in electrophysiological changes of cell membrane.

Author studies the effect of propranolol on calcium uptake and release in sarcoplasmic reticulum and mitochondria prepared from porcine myocardium to investigate the mechanism of action of propranolol on myocardium. The results are summerized as follow:

- 1) The maximum Ca⁺⁺-uptake of sarcoplasmic reticulum is inhibited by propranolol in a dose dependent manner.
- 2) The release of calcium from sarcoplasmic reticulum is not affected by propranolol but with higher than 1×10^{-6} M of propranolol, rate of calcium release from sarcoplasmic reticulum is decreased.
- 3) Propranolol inhibits the maximum uptake and uptake rate of calcium in mitochondria non-competitively. ($K_i = 6.21 \times 10^{-6}$ M.)
- 4) The rate of Na⁺ induced calcium release from mitochondria shows a function of $[Na^+]^2$ and is inhibited by propranolol with the concentration significantly lower than that affect the calcium uptake in sarcoplasmic reticulum and in mitochondria ($K_i = 2.91 \times 10^{-6}$ M). These results suggest that propranolol affects the intracellular calcium homeostasis which may considered to be one of the mechanism of action of propranolol on myocardium.

* 연세대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Yonsei University

** 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

** Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Seoul National University
1986년 6월 7일 접수

부정맥 및 고혈압 치료제로서 임상적으로 흔히 사용되고 있는 propranolol은 전기생리학적 분류 class II에 속하는 β -아드레날린 수용체 차단성 항부정맥제로서, 현재까지 알려진 그 항부정맥효과와 작용기전은 주로 β -아드레날린 수용체 차단효과와 또한 심근세포막의 흥분억제효과에 의한 것으로 추정하고 있다^{15,32)}.

β -아드레날린 수용체 차단제 중 비교적 심근에만 선택적으로 작용하는 acebutolol, practolol 등과의 비교 실험에서, propranolol은 고농도에서 β -아드레날린 수용체 차단효과와는 무관한 심근 수축력 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며^{11,24)}, 이러한 심근억제효과는 심근세포내 Ca^{++} 조절기구에 미치는 효과에 기인할 것으로 추정하고 있다.

근 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에는 세포막, sarcoplasmic reticulum, mitochondria 등이 관여하는 것으로 인정되고 있으며, 이중 sarcoplasmic reticulum이 심근 수축과 이완시 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 주 역할을 할 것으로 추정하고 있으나^{12,13)}, 심근 세포에는 sarcoplasmic reticulum의 양이 적으며 체계적으로 배열되어 있지 않고²⁵⁾, 최근 Carafoli³³⁾에 의해 심근에 풍부한 mitochondria에서의 Na^+/Ca^{++} 교환작용이 알려져 심근에서는 심근 흥분-수축 이완 과정에서 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 mitochondria도 큰 역할을 할 것으로 추정되고 있다.

또한 심장의 여러 형태의 부정맥 발생과정에서 Ca^{++} 내향전류가 관여되며¹⁾, 세포내 Ca^{++} 농도의 증가는 세포막의 다른 이온의 전도도에 영향을 주어 부정맥 발생이 쉬운(pro-arrhythmic) 상태가 된다고 추정하고 있어^{15,18)} 세포내 유리 Ca^{++} 농도의 변화는 근 수축 이완 과정뿐 아니라 근 세포의 전기 생리학적 변화도 유발할 것으로 믿어진다.

따라서 본 연구에서는 심근 세포내 유리 Ca^{++} 농도조절기구에 알려진 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria의 Ca^{++} 조절작용에 미치는 propranolol의 효과를 관찰함으로써 심근세포내 Ca^{++} 농도 변화의 관점에서 propranolol의 항부정맥효과 및 심근억제 작용의 기전을 검토하고자 하였다.

1. 심근 sarcoplasmic reticulum 및 mitochondria의 추출

i) Sarcoplasmic reticulum의 추출: 실험동물로는 돼지를 사용하였으며 Harigaya와 Schwarz¹⁶⁾의 방법에 의하여 심실근에서 추출하였다. 심실근에서 지방 조직과 결합조직을 제거한 후, 냉각시킨 4배용량의 균질용액(10mM Tris-malate, pH 7.0)에 넣고 가위로 잘게 썰은 다음 waring blender를 사용하여 45초 동안 균질화 하였다.

이 균질액을 3,800 g에서 20 분동안 냉동원심분리한 후 상등액을 4겹의 꺼즈를 통하여 여과하여 핵, 결합조직편을 제거한 후 15,000 g에서 20 분간 다시 냉동 원심분리하여 mitochondria를 제거하였다. 상등액을 취하여 105,500 g에서 45 분간 냉동 원심분리하여 얻은 잔사를 다시 10 mM Tris-malate pH 7.0, 0.6MKCl 용액에 부유시켜 144,700 g로 45 분간 원심분리하여 sarcoplasmic reticulum을 얻었다. 이 sarcoplasmic reticulum은 100 mM KCl, 10 mM Tris-malate pH 7.0 용액에 단백질농도가 10 mg/ml 정도 되도록 부유시켜 실험에 사용하였다.

ii) Mitochondria의 추출: 돼지 심실근에서 Sulakhe와 Dhalla³⁰⁾의 방법에 준하여 추출하였다. 적출 심실근을 냉각시킨 10 배 용량의 균질용액(250mM Sucrose, 10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA)에 넣고 잘게 썰은 다음 Polytron 조직분쇄기(Brinkman, Model PT-20)로 rheostat 5에서 15초동안 균질화 한 후 1,000 g에서 20 분간 냉동 원심분리한 후 상등액을 10,000 g에서 20 분간 냉동 원심분리하여 얻은 잔사를 4 배 용량의 균질용액에 부유시켜 10,000 g에서 15 분간 다시 냉동 원심분리하여 세척하였으며, 이후 이러한 세척을 2회 반복하였고 이때 세척용액은 EDTA를 포함치 않은 균질 용액을 사용하였다. 최종 얻은 mitochondria는 250mM Sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4 용액에 단백질 농도가 15~20 mg/ml 되게 부유시켜 실험에 사용하였다.

모든 sarcoplasmic reticulum 및 mitochondria의 추출조작은 0~4°C에서 시행하였으며 단백질 농도는 Lowry²²⁾의 방법으로 측정하였다.

2. Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수 및 유리의 측정

Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수 및 유리는 Ca^{++} -지시제인 Arsenazo III와 dual-beam spectrophotometer (Amico-Chance Dual beam Spectrophotometer, American Instrument Co. U. S. A.)를 이용한 Chiu 등⁵⁾의 방법으로 측정하였다. 유리 Ca^{++} 농도변화는 675 nm와 685 nm의 파장에서 측정된 흡광도의 차이로부터 산출하였다.

Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수 및 유리의 측정은 100mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 5mM NaN_3 , 20mM Tris-malate pH 7.0, 100 μ M Arsenazo III와 0.7~0.86mg/ml의 sarcoplasmic reticulum을 함유한 3ml의 반응액이 들어 있는 cuvette를 30°C에서 10분동안 전처리한 후 최종 Ca^{++} 농도 20 μ M, Tris-ATP 0.1mM을 순차적으로 첨가하여 파장 675 nm와 685 nm에서의 흡광도의 차이를 경시적으로 기록하여 반응액내에서의 sarcoplasmic reticulum이 Ca^{++} 을 흡수 또는 유리함으로써 변동되는 Ca^{++} 농도를 측정하였다.

Propranolol의 영향을 관찰한 실험에서는 전처리시부터 3×10^{-5} ~ 3×10^{-3} M의 propranolol을 반응액에 첨가하고 동일한 방법으로 경시적으로 측정하여 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수 및 유리에 대한 영향을 관찰하였다.

3. Mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리의 측정

Mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리는 22mCi/mg의 활성도를 지니는 Amersham UK제의 방사성 동위원소 $^{45}Ca^{++}$ 을 사용하여 Lee and Choi²¹⁾의 millipore filter (HAWP 13mm, Pore size 0.45micron) 방법으로 측정하였다. mitochondria의 Ca^{++} 흡수반응은 25°C의 항온 진탕 수욕조에서 표준반응액 (250 mM Sucrose, 10mM Tris HCl pH 7.4)에 mitochondria를 1mg/ml 농도가 되도록 첨가 시행하였고, 에너지원으로는 호흡기질인 5mM의 Tris-succinate를 첨가하였으며 반응액내의 Ca^{++} 농도는 각 실험 조건에 따라 적절하게 조절하였으며 동위원소 $^{45}Ca^{++}$ 는 0.5 μ Ci/ml 되게 첨가하였다.

Mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리량의 측정은 0.25ml의 반응액을 millipore filter를 통과시켜 얻은 여액 0.1ml를 10ml의 liquid scintillation co-

cktail (4 gm PPO, 0.242 gm POPOP 60 gm naphthalene, 100ml menthol, 20ml ethylene glycol, 1 liter of Dioxane)에 첨가하여 liquid scintillation spectrometer (Packard, Tris-Carb, Model 3375)로 방사능을 측정하여 mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리량을 계산하였다.

Propranolol의 mitochondria Ca^{++} 흡수 및 유리에 미치는 효과는 실험조건에 따라 Ca^{++} 흡수반응 개시전 또는 반응중 3×10^{-6} M 내지 1×10^{-3} M의 propranolol을 첨가하여 대조실험과 동일한 방법으로 시행하였다.

i) Mitochondria의 Ca^{++} 운반 및 dinitrophenol에 의한 Ca^{++} 의 유리:

15 μ M의 Ca^{++} , 5mM의 succinate를 함유하는 5ml 표준 반응액에 5mg의 mitochondria를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응 15초후부터 경시적으로 0.25ml의 반응액을 채취하여 millipore filter로 여과하였으며 반응개시후 5분에 Ca^{++} 흡수를 차단하여 mitochondria 외면에 에너지 비의존성으로 결합된 Ca^{++} 을 제거키 위해²⁷⁾ 1.2mM의 EGTA-Tris를 첨가하였고 이후 30초후에 H^+ -ionophore인 50 μ M의 2,4-Dinitro-phenol을 처리하여 흡수된 Ca^{++} 의 유리를 유도하였다.

ii) Mitochondria의 Ca^{++} 흡수

Mitochondria의 Ca^{++} 운반은 mitochondria의 내막을 통한 Ca^{++} 흡수와 에너지 비의존성의 외면 결합으로 구분될 수 있다^{27,28)}. 따라서 내막을 통한 Ca^{++} 흡수량을 정확히 분석하기 위해 mitochondria의 외막은 자유로이 투과하나 내막을 통과할 수 없는 Ca^{++} -chelator인 EGTA와 mitochondria의 Ca^{++} 흡수 차단제로 알려진 ruthenium red를 이용하였다²⁴⁾.

130 μ M Ca^{++} 을 함유하는 반응조건에서 30초 이후 경시적으로 채취한 0.25ml의 반응액을 0.125ml의 6mM EGTA, 90 μ M ruthenium red액과 즉시 혼합하여 더 이상의 Ca^{++} 흡수를 막고 mitochondria 외면에 결합된 Ca^{++} 을 제거한 후 10초후 millipore filter로 여과하여 mitochondria의 Ca^{++} 흡수량을 측정하였다.

iii) Na^+ 에 의한 mitochondria의 Ca^{++} 유리

Na^+ 에 의한 mitochondria내 Ca^{++} 의 유리와 이에 대한 propranolol의 효과를 관찰하기 위해 15~25 μ M의 Ca^{++} 을 함유하는 반응조건에서 Ca^{++} 흡수 반응개시후 4분에 propranolol을 지시농도가 되게 첨가한 후 5분에 1.2mM EGTA Tris 첨가로 흡수반응을 정지

시켰다. 이후 30초후 Na^+ 10mM을 첨가하여 흡수된 Ca^{++} 의 유리를 유도하였다.

Na^+ 에 의한 Ca^{++} 의 유리속도(n mole/mg/min)는 최초 1분간은 직선양의 Ca^{++} 유리를 보여 Na^+ 첨가후 최초 30초 및 1분간의 실험성적으로부터 구하여 이들의 평균치를 취하였다.

iv) Mitochondria의 Ca^{++} 흡수에 의한 동력학적 분석

반응액내의 유리 Ca^{++} 농도의 변화에 따른 mitochondria의 초기 Ca^{++} 흡수속도를 측정하기 위해 Ca^{++} 흡수 반응 표준액에 2.5 μM 의 rotenone을 첨가하고 Ca^{++} 의 농도는 실험계획에 따라 첨가하였으며 이때 반응액에 존재하는 정확한 유리 Ca^{++} 양을 측정키 위해 Ca^{++} 흡수 반응 개시전 0.25ml씩 두개의 시료를 채취하여 한 채취액은 즉시 millipore filter로 여과하여 여액의 방사능을 측정하고 나머지 또 한 시료는 여과하지 않은 전체시료의 방사능을 측정하여 반응액내 유리 Ca^{++} 양을 계산하였다.

Mitochondria의 Ca^{++} 흡수반응은 5mM의 Tris-succinate의 첨가후 10초 및 20초에 0.25ml의 반응액을 채취하여 2mM EGTA, 30 μM ruthenium red quenching 방법을 사용하여 초당 흡수되는 양을 산출하여 이들의 평균치를 초기 Ca^{++} 흡수속도(nmole/mg/sec)로 하였다.

v) Na^+ 에 의한 mitochondria의 Ca^{++} 유리에 대한 동력학적 분석

Na^+ 농도변화에 따르는 mitochondria의 Ca^{++} 유리속도의 측정도 iii)과 동일한 방법으로 Ca^{++} 흡수를

유도하고 5분후에 1.2mM EGTA-Tris 처치후 Na^+ 각 농도를 적의 첨가하여 30초 및 1분동안 유리되는 Ca^{++} 양으로부터 초기 Ca^{++} 유리속도(n mole/mg/min)를 산출하였다.

실험 결과

1. Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수 및 유리에 대한 propranolol의 효과

i) Ca^{++} 흡수에 대한 영향

심근 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 운반 능력은 실험동물의 종에 따라 약간의 차이를 보이는데¹⁶⁾, 본 연구에서 사용한 돼지 심근 sarcoplasmic reticulum은 20 μM Ca^{++} 존재하에서 0.1mM ATP 첨가에 의하여 sarcoplasmic reticulum막을 자유로이 통과하는 음이온들(phosphate, oxalate)이 존재하지 않는 조건에서 Fig. 1에서와 같이 빠른 속도의 Ca^{++} 흡수를 보였으며 19.12 n mole/mg protein의 최대 흡수를 나타내었다. 이러한 Ca^{++} 의 흡수에 대하여 propranolol은 농도를 증가함에 따라 용량의존적인 억제를 보였으며, propranolol 3×10^{-3} M의 경우 최대 흡수가 4.34 n mole/mg protein으로 대조에 비해 77%의 억제를 보였다(Fig. 1, Table 1).

ii) Ca^{++} 유리에 대한 영향

심근 sarcoplasmic reticulum은 ATP 첨가후 시간 경과에 따라 Ca^{++} 을 최대로 흡수한 후 다시 흡수했던 Ca^{++} 의 일부를 자연적으로 유리하였다(Fig. 1). 이러한 Ca^{++} 유리는 대조에서 분당 1.96 n mole/mg pro-

Table 1. Effect of Propranolol on the Ca^{++} -uptake and release of porcine cardiac Sarcoplasmic Reticulum

	Maximum uptake		Release Rate	
	nmol/mg protein	Δ %	nmol mg ⁻¹ min ⁻¹	Δ %
Control	19.12 \pm 1.55*		1.96 \pm 0.09*	
Propranolol				
3 \times 10 ⁻⁵ M	18.56 \pm 1.49	- 2.9	1.85 \pm 0.14	- 5.6
1 \times 10 ⁻⁴ M	16.26 \pm 1.50	-15.0	1.88 \pm 0.12	- 4.1
3 \times 10 ⁻⁴ M	14.38 \pm 1.07	-24.8	1.81 \pm 0.17	- 7.7
5 \times 10 ⁻⁴ M	11.28 \pm 1.16	-41.0	1.73 \pm 0.22	-11.7
1 \times 10 ⁻³ M	8.66 \pm 0.92	-54.7	1.19 \pm 0.19	-39.3
3 \times 10 ⁻³ M**	4.34 \pm 0.35	-77.3	-	-

* Each value represents Mean \pm S.E. of 6 experiments from different preparations.

** The value was obtained from 3 experiments.

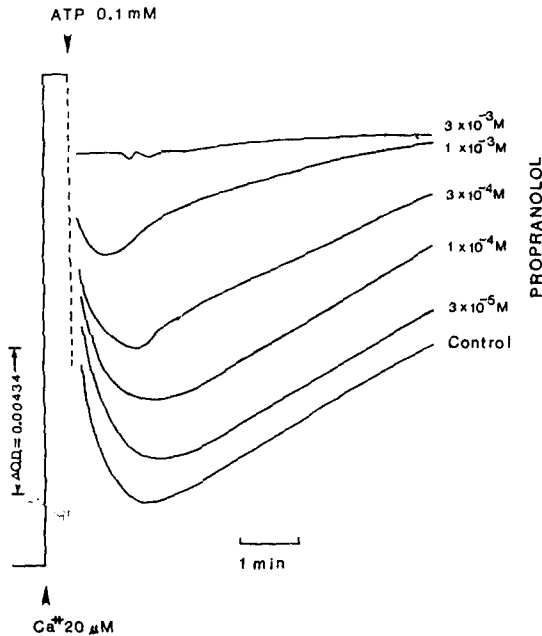


Fig. 1. Calcium uptake and release of porcine sarcoplasmic reticulum measured by dual-beam spectrophotometry. Cardiac sarcoplasmic reticulum (0.7-0.86 mg/ml) were preincubated 3ml of medium containing 100mM KCL, 10mM MgCl₂, 5mM NaN₃, 20mM TRIS-malate (pH 7.0), 100 microM arsenazo III at 30°C, 20 microM CaCl₂ was added and followed by 0.1 mM tris-ATP to initiate the ATP-dependent Ca²⁺ uptake of sarcoplasmic reticulum.

tein의 유리속도를 나타내었으며, propranolol 첨가에 따라 최대 흡수후 초기 유리시기에는 대조에 비해 빠른 유리 양상을 보이나 이후에는 propranolol 5×10^{-4} M의 농도까지 대조에 비해 유리속도의 변화를 관찰할 수 없었으나 1×10^{-3} M의 경우는 분당 1.19 n mole/mg protein으로 현저한 감소를 보였고 3×10^{-3} M에서는 최대 흡수후 Ca²⁺ 유리를 관찰할 수 없었다(Fig. 1, Table 1).

2. Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 및 유리에 대한 Propranolol의 효과

i) Mitochondria의 Ca²⁺ 운반 및 dinitrophenol에 의한 Ca²⁺ 유리에 미치는 propranolol의 효과

15 μM Ca²⁺ 과 5mM Tris-succinate 존재하에서 mitochondria의 Ca²⁺ 운반은 대단히 활발하여 3분후 반응액내 Ca²⁺의 90% 이상이 mitochondria에 존재

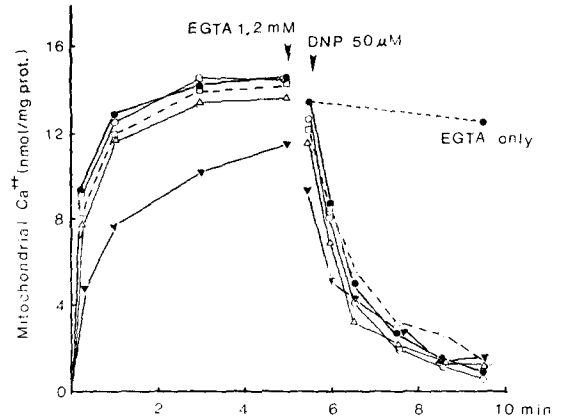


Fig. 2. Effect of propranolol on Ca²⁺ transport and dinitrophenol induced Ca²⁺ release of porcine cardiac mitochondria. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated at 25°C in a 5 ml medium containing 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM Tris-succinate and 15μM Ca²⁺, with or without propranolol. 0.25 ml of aliquote was taken and used for determination of mitochondrial Ca²⁺ transport and release as described in the Method. After 5 min incubation, EGTA-tris (final concentration: 1.2 mM) was added to chelate externally bound ca²⁺ and block the further Ca²⁺-uptake 30 sec later, Ca²⁺ release was observed by adding 50μM dinitrophenol; Control(●), Propranolol, 3×10^{-4} M(○), 1×10^{-4} M(△), 1×10^{-3} M(▲).

하였으며 propranolol 첨가시에는 용량의존적으로 Ca²⁺ 운반이 감소하여 1×10^{-3} M의 농도에서는 현저한 감소를 나타내었다. 반응 5분후 1.2mM EGTA 첨가로 Ca²⁺ 흡수를 억제 mitochondria 외면 결합된 Ca²⁺을 유리시킨 바 외면의 에너지 의존성 Ca²⁺ 결합은 10%내의였으며 EGTA만 처리한 경우 흡수된 Ca²⁺의 유리는 분당 0.3 n mole 이하였다. H⁺-ionophore인 50 μM dinitrophenol 처리로 succinate 기질첨가에 의해 형성된 mitochondria의 막전압을 제거시킨 바 mitochondria에 흡수된 Ca²⁺은 신속히 유리되었으며대조시 초기 30초동안 4.80 n mole의 Ca²⁺유리를 보였다.

Propranolol 첨가에 따른 흡수된 Ca²⁺의 유리속도는 1×10^{-3} M의 고농도에서까지 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

ii) Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수에 미치는 propranolol의 효과

상기의 실험에서 나타난 propranolol의 mitochondria의 Ca²⁺ 운반 억제효과를 에너지 의존성의 Ca²⁺

흡수만을 관찰하기 위해 2mM EGTA, 30 μ M ruthenium red quenching 법을 사용한 바 대조시 mitochondria는 130 μ M의 Ca⁺⁺ 존재하에서 반응 5분후 50,30 nmole/mg protein의 최대 Ca⁺⁺ 흡수를 보였으며 이후 흡수했던 Ca⁺⁺ 은 일부를 점차 유리하였다.

Propranolol을 첨가한 경우에 있어서 mitochondria의 Ca⁺⁺ 흡수율 및 최대 흡수는 용량의존적인 감소를 보였으며 1 \times 10⁻³M 처치의 경우 20,52 nmole/

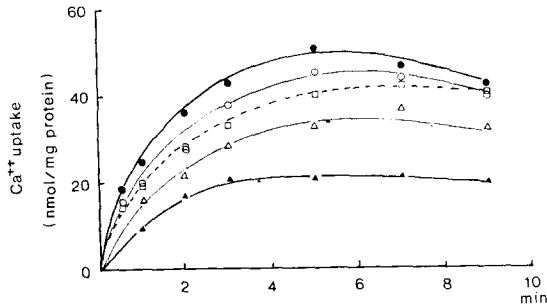


Fig. 3. Effect of propranolol on the Ca⁺⁺-uptake of cardiac mitochondria. Experimental conditions were same as in Fig. 1, except that 130 μ M Ca⁺⁺ was added in the reaction medium. Each aliquote (0.25ml) at different intervals of incubation was rapidly mixed with 2mM EGTA-tris and 30 μ M ruthenium red to terminate Ca⁺⁺ uptake, filtered 10 sec after the mixing and assayed for radioactivity; Control (●), Propranolol, 3 \times 10⁻⁵ M(O), 1 \times 10⁻⁴M(□), 3 \times 10⁻⁴ M(Δ), 1 \times 10⁻³(*).

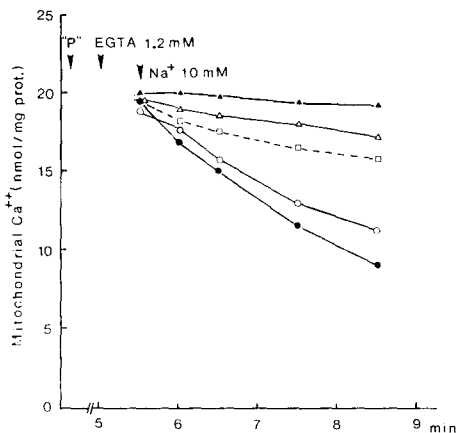


Fig. 4. Effect of propranolol on the Na⁺ induced Ca⁺⁺-efflux from cardiac mitochondria. The mitochondria (1 mg/ml) were incubated in the same conditions as in Fig. 1, except that the reaction medium contained 25 μ M Ca⁺⁺. After 4 min incubation, varying concentrations of propranolol were added (marked "P") and followed by 1.2 mM EGTA-tris. Ca⁺⁺-efflux was observed by adding 10 mM NaCl; Control (●), propranolol, 1 \times 10⁻⁵ M(O), 3 \times 10⁻⁵ M(□), 1 \times 10⁻⁴ M(Δ), 3 \times 10⁻⁴ M(\blacktriangle).

mg protein의 최대 Ca⁺⁺ 흡수를 보였다(Fig. 3).

iii) Na⁺에 의한 mitochondria Ca⁺⁺ 유리에 미치는 propranolol의 효과

Na⁺에 의한 mitochondria 내막을 통해 흡수된 Ca⁺⁺의 유리를 관찰하고자 15~25 μ M의 Ca⁺⁺ 존재하에서 5분동안 흡수시키고 1.2 mM EGTA를 처치후 10 mM Na⁺을 첨가하였을 때 mitochondria의 Ca⁺⁺ 유리속도는 대조시 평균 분당 3.60 nmole/mg 이었으며 반응 4분에 propranolol을 첨가한 경우 Ca⁺⁺의 유리는 용량의존적으로 감소하였다(Fig. 4).

Na⁺에 의한 Ca⁺⁺ 유리작용에 대한 propranolol의 억제 정도는 Fig. 5에서와 같으며 Ca⁺⁺ 흡수작용을 억제하는 농도보다 현저히 낮은 3 \times 10⁻⁶M부터 유의한 억제를 보였으며 3 \times 10⁻⁵M에서 64%, 3 \times 10⁻⁴M에서 88%의 억제를 보이는 sigmoid 양상의 용량 반응곡선을 나타내었다.

iv) Propranolol의 mitochondria Ca⁺⁺ 흡수 억제 효과의 동력학적 분석

실험 방법에 언급한 바와 같이 반응액내의 유리 Ca⁺⁺

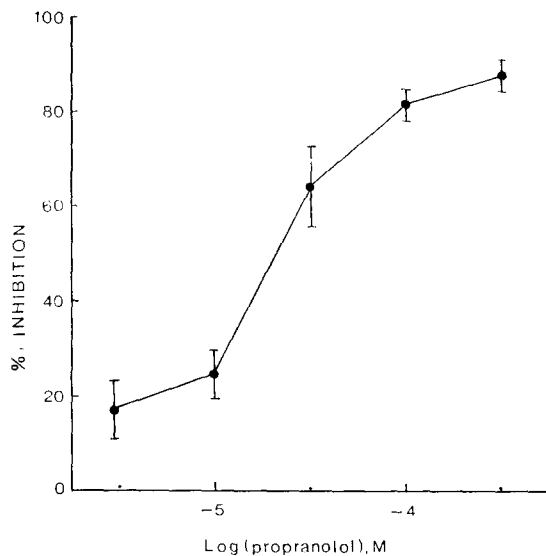


Fig. 5. The inhibition of Na⁺ induced Ca⁺⁺-efflux from cardiac mitochondria by propranolol. Experimental conditions were exactly same as in Fig. 4, except that 15-25 μ M Ca⁺⁺ were contained in the reaction medium. Ca⁺⁺-efflux rate (nmol mg⁻¹ min⁻¹) was obtained from the mean Ca⁺⁺ release rate for the periods of 30 and 60 sec after addition of 10 mM NaCl. Ca⁺⁺-efflux rate in the absence of propranolol was 3.60 \pm 0.25 nmol mg⁻¹ the absence of propranolol was 3.60 \pm 0.25 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Each point represents mean \pm S.E. of 5 experiments.

농도를 측정하고, 반응액내 유리 Ca^{++} 농도 변화에 따른 초기 Ca^{++} 흡수 속도를 측정할 결과, 초기 Ca^{++} 흡수 속도곡선은 유리 Ca^{++} 농도 증가에 따라 Michaelis Menton 방정식에 따르는 양상을 보였고 (Fig. 6) 대조시 최대 Ca^{++} 흡수속도 (V_{\max})는 초당 0.65 n mole/mg 이었고 K_m 치(최대 Ca^{++} 흡수속도의 50% 흡수속도를 보이는 Ca^{++} 농도)는 11.67 μM 이었다.

한편 propranolol 이 첨가된 상태에서의 K_m 치는 변화가 없고 최대 Ca^{++} 흡수 속도만이 감소하는 비경쟁적인 억제 양상을 보였으며 K_i 치 (Ca^{++} 흡수속도를 50% 억제하는 propranolol 의 농도)는 6.21×10^{-4} M이었다 (Fig. 7).

v) Propranolol 의 Na^+ 에 의한 mitochondria

Ca^{++} 유리억제 효과의 동력학적 분석

15~25 μM 의 Ca^{++} 존재하에서 5분간 Ca^{++} 을 흡수시킨 후 Na^+ 각 농도 첨가에 따라 유리되는 Ca^{++} 의 유리량으로 Ca^{++} 유리속도를 측정할 바, 대조시 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리속도는 최대 분당 7.43 n mole/mg 이었고 Ca^{++} 유리속도는 "S" 자형 곡선의 Na^+ 농도 의존성을 보였다 (Fig. 8).

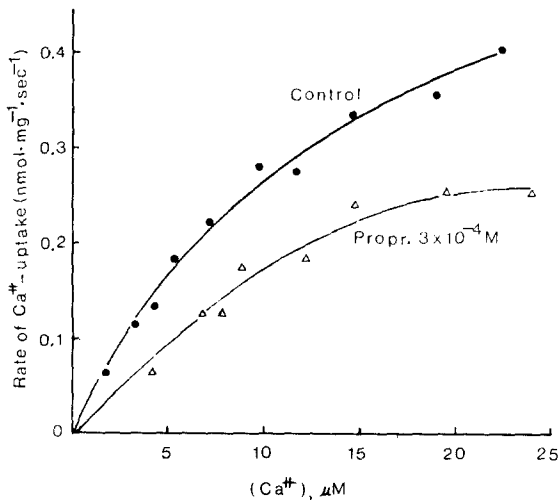


Fig. 6. Effect of propranolol on the rate of cardiac mitochondrial Ca^{++} -uptake in the presence of various extramitochondrial Ca^{++} concentrations. Incubation medium contained in a total volume of 3 ml, 250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 μM rotenone and 3 mg mitochondrial protein. Ca^{++} uptake was initiated by adding 5 mM Tris-succinate. Uptake was terminated by using the quenching technique with 2 mM EGTA-tris and 30 μM ruthenium red. Data are the means of the initial rates obtained from 10 and 20 sec periods.

이러한 결과는 mitochondria 내막에 존재하는 Na^+ - Ca^{++} 교환 carrier 의 Na^+ 결합부는 복합체로 존재

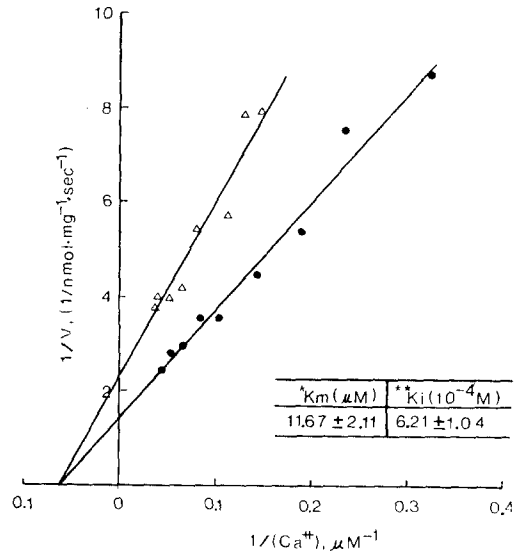


Fig. 7. A double reciprocal plot of the rate of Ca^{++} -uptake by cardiac mitochondria taking the data of Fig. 6. Symbols; Control (\bullet), Propranolol 3×10^{-4} M (Δ). * Ca^{++} concentration producing half-maximal uptake velocity, Mean \pm S.E. of 5 experiments. ** Propranolol concentration for 50% inhibition of Ca^{++} uptake velocity, Mean \pm S.E. of 5 experiments.

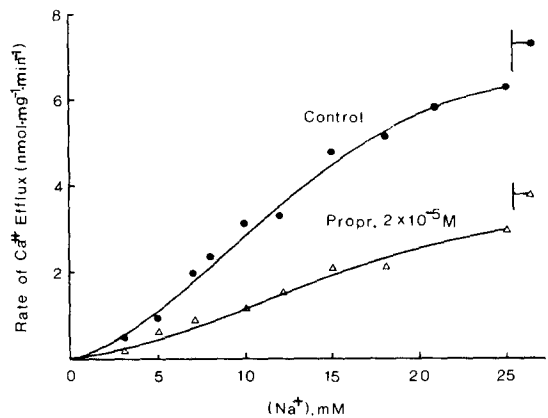


Fig. 8. Effect of propranolol on the Na^+ induced Ca^{++} -efflux rate in cardiac mitochondria. The mitochondria were incubated in same conditions as in Fig. 5. After 5 min preloading period, 1.2mM EGTA-tris was added. 30 sec later, Ca^{++} -efflux was observed by adding varying concentrations of Na^+ . Na^+ induced Ca^{++} -efflux rates are the mean values obtained from 30 and 60 sec data.

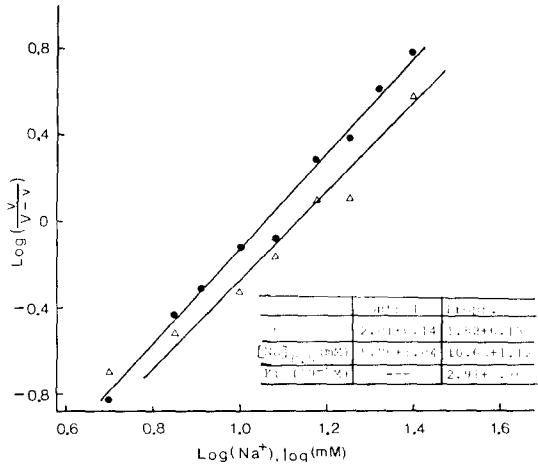


Fig. 9. A Hill plot of Na⁺ induced Ca⁺⁺-efflux rate in cardiac mitochondria taking the data of Fig. 8, where v is the velocity of Ca⁺⁺-efflux (nmol mg⁻¹) and V is the maximum velocity of efflux at saturating Na⁺ concentration. Symbols; Control (●), Propranolol, 2 × 10⁻⁵ M (Δ). The values in square are the Mean ± S.E. obtained from 5 different preparations.

하며 Na⁺ 결합시 결합부간에 협동성이 존재하는 결과로 보고 이를 Hill 방정식에 적용시켰다.

이때 Hill plot의 기울기는 2.01 이었고 최대 Ca⁺⁺ 유리속도의 50%의 Ca⁺⁺ 유리속도를 보이는 Na⁺의 농도([Na⁺]_{0.5})는 8.80 mM이었다(Fig. 9). 한편 propranolol 처치한 경우에 있어서도 “S” 자형 곡선의 Na⁺ 농도 의존도를 보이며(Fig. 8) 최대 Ca⁺⁺ 유리속도는 감소되었으나, Hill plot의 기울기는 1.82, [Na⁺]_{0.5}는 10.63으로 네 조리와 유의한 차이를 보이지 않는 비상경적인 억제 양상을 나타내었으며 K_i 치는 2.91 × 10⁻⁵ M이었다(Fig. 9).

고찰

Ca⁺⁺은 세포내 정보전달체로서 생체세포의 여러가지 기능조절에 관여하고 있으며 심장근에서는 심근 수축-이완기전의 정보전달체로써뿐 아니라 세포막 이온전도와 관련한 전기생리학적 변화에도 중요한 의의를 지닌 것으로 인정되고 있다.

심근에서의 부정맥 발생기전에 대한 연구는 그간 많은 연구가 진행되어 왔으며 특히 전기생리학적인 견지에서의 많은 연구로 심부정맥의 발생과정과 유관한 세포막 이온전도의 변화에 관련하여 설명하려는 시도가

많은 진전을 이루었다.

심근 부정맥에 있어서 저포타슘혈증, 고칼슘혈증, 저산소증 및 digitalis 배당체의 독작용 출현시에 막전압의 진동성 전압변동(oscillatory activity)이 나타나며 이러한 막전압의 진동성 전압변동은 세포막을 통한 완만 내향성 전류(slow inward current) 즉 Ca⁺⁺ 전류가 주 원인으로 간주되어 상기 조건에서 나타나는 부정맥의 발생기전에 Ca⁺⁺이 관여하는 것으로 추정되고 있다^{1,15}.

또한 Isenberg 등은¹⁸ 양의 Purkinje 섬유에서 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 증가시킬 때 세포내 Ca⁺⁺ 농도의 증가는 세포막 K⁺ 이온 투과성의 변화를 유도하여 빠른 세포막 재분극으로 활동전압 기간을 짧게 하여 부정맥 발생조건을 유도하며, 이러한 현상은 타 부정맥 유발조건인 세포내 Ca⁺⁺이 고농도일 때 또는 digitalis 및 adrenalin 투여시 등에서도 나타나 심근세포내 Ca⁺⁺ 농도의 증가가 부정맥 생성에 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있다^{15,19}.

한편 심근세포내 유리 Ca⁺⁺은 심근수축기전의 세포막 흥분-수축 연결과정에서(excitation-contracti-on coupling) 절대적 중심적 역할을 하여, 이완시 10⁻⁸~10⁻⁷ M이던 세포내 유리 Ca⁺⁺ 농도가 근세포막 탈분극에 이은 수축이 일어나기 시작할 때에는 10⁻⁵ M로 증가하여 근단백질중 칼슘에 민감한 troponin C에 결합함으로써 수축단백인 actin과 myosin의 상호연결을 가능케 하여 수축을 일으키며, 이 칼슘이 다시 troponin C로부터 떨어져나와 세포내부 칼슘 저장소에 축적되거나, 세포외로 유리되어 나가 Ca⁺⁺ 농도가 낮아짐으로써 심근 이완이 일어난다고 알려져 있다^{12,14}.

이와 같이 심근 부정맥 발생기전 및 근 수축-이완에 관여하는 세포내 유리 Ca⁺⁺ 농도는 근 세포막과 세포내 기구들인 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 및 기타 Ca⁺⁺ 결합단백질 등의 복합적인 작용에 의해 조절될 것으로 받아들여지고 있으며 이중 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria에 의한 조절이 많은 학자들에게 특히 중요시 되고 있다^{3,12,13}.

Propranolol은 전기생리학적 Class II에 속하는 β-아드레날린 수용체 차단성 항부정맥제로써, 항부정맥 효과의 작용기전으로는 β-아드레날린 수용체 차단효과에 의해 나타나는 세포막에서의 제 4기 탈분극(phase 4 de-polarization) 시기에 외향성 포타슘전류(iK₂) 억제가 주 작용이며 더 높은 농도에서 나타나는 내향성 소듐전류(iNa)의 억제효과가 그 항부정맥 작용기전의

로 추정되고 있다^{15,32)}.

한편 propranolol은 고농도에서 β -아드레날린 수용체 차단효과와는 무관한 심근 수축력 억제효과를 보이며^{11,24)} 이는 아마도 심근 세포내 Ca^{++} 조절기구에 대한 효과에 의한 2차적인 결과라 추정하고 있다^{10,24)}.

심근 sarcoplasmic reticulum은 막에 존재하는 Ca^{++} ATPase가 ATP를 분해하는 것과 연관되어 정량적으로 1 mol 당 2개의 Ca^{++} 이 막내외로 운반되며, Ca^{++} 과 Mg^{++} 은 ATPase 활성을 또한 조절하게 된다. 따라서 sarcoplasmic reticulum은 Mg^{++} 존재하에서 Mg^{++} -의존성 Ca^{++} ATPase의 활성화로 근 이완시에는 Ca^{++} 을 축적하는 저장고로서 수축시에는 Ca^{++} 유리원으로써 역할을 함으로써 근 수축에 이용가능한 세포내 유리 Ca^{++} 을 조절하는 것으로 받아들여지고 있다²³⁾.

본 실험에서 propranolol은 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수에 대해 최대 흡수를 억제하였으며 이는 Dhalla 등¹¹⁾과 유사한 결과이었으며 이는 propranolol이 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수에 연관된 Ca^{++} ATPase 활성화도의 억제가 Enzyme - phosphate 복합체 형성과정을 억제²⁶⁾함에 의해 나타난 결과로 생각할 수도 있겠다.

한편, propranolol은 Ca^{++} 흡수과정을 억제하나 Ca^{++} 흡수를 억제하는 농도에서 Ca^{++} 의 유리는 영향을 주지 않았으며 고농도에서 유리속도의 억제를 보였다. 그러나 대조 실험에서도 최대 Ca^{++} 유리후 sarcoplasmic reticulum에 잔존하는 Ca^{++} 의 양은 고농도의 propranolol 첨가시와 동일한 점(data not shown in this report)으로 비추어 고농도의 propranolol에 의한 Ca^{++} 유리속도의 억제는 유리 가능한 Ca^{++} 양의 적은 것에 기인할 수 있다. 따라서 propranolol의 Ca^{++} 흡수억제 효과는 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca^{++} 축적의 억제로 심근 수축 이완에 이용가능한 세포내 Ca^{++} 양을 줄임으로 심근 수축 이완의 억제효과 기전의 일부로 작용할 수 있으리라 추정되나³¹⁾, 이러한 억제 효과는 고농도에서 나타나며 Ca^{++} 유리속도에 대해서는 고농도에 이르기까지 영향을 주지 않는 점과 생체에서 항부정맥효과가 나타나는 농도를 감안할 때 sarcoplasmic reticulum에 대한 propranolol의 효과는 항부정맥 효과와는 무관한 현상으로 사료된다.

심근 mitochondria는 호흡체인 기질에 의해서 형성되는 Proton-motive force($\Delta\phi$)의 형성으로 mitochondria 내막의 Ca^{++} -carrier를 통하여 Ca^{++} 흡수가 일어나며^{7,17)}, 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않

으나 Ca^{++} 흡수 carrier는 ruthenium red에 의해 억제된다²⁾. 이러한 mitochondria의 Ca^{++} 흡수작용에 의한 세포내 Ca^{++} 농도 조절기전 이외에도 생리적 세포내 중요이온인 Na^{+} 에 의해 mitochondria내의 Ca^{++} 이 유리되며 이는 mitochondria 내막의 Ca^{++} 흡수 carrier와는 다른 Na^{+} - Ca^{++} 교환을 촉매하는 carrier에 의한 결과로 생각되어 Crompton⁷⁾ 등은 mitochondria는 막전압 형성을 원동력으로 하는 Ca^{++} 흡수와 세포내 Na^{+} 에 의한 Ca^{++} 유리가 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 중요 역할을 하리라 시사하고 있다.

본 실험에서는 mitochondria의 Ca^{++} 흡수량을 정확히 측정하기 위해 Ca^{++} 흡수과정을 차단하고 생리적 의의가 적은 mitochondria의 외면에 에너지 비의존성으로 결합하는 Ca^{++} 을 제외키 위해 2mM EGTA와 30 μ M ruthenium red를 처리하였다. 그러나 EGTA의 사용시 문제점은 반응액내의 Ca^{++} 을 zero상태를 만듦으로써 해서 mitochondria 내막을 사이에 두고 Ca^{++} 의 농도경사를 크게 함으로써 과도적인 Ca^{++} 의 누출을 추측할 수 있으나 대조 실험결과 소량만이 누출된 것은 mitochondria 내부에 형성된 막전압에 의한 것으로 추측되며, 이 방법으로 mitochondria의 흡수에 대한 propranolol의 영향을 관찰하였던 바 대조시 mitochondria의 최대 Ca^{++} 흡수율의 50%를 나타내는 Ca^{++} 의 농도는 11.67 μ M, 최대 Ca^{++} 흡수속도는 초당 0.65 n mole/mg으로 Crompton 등⁶⁾의 결과와 유사하였으며 propranolol은 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 흡수를 억제하는 농도와 유사한 농도($K_i = 6.91 \times 10^{-4}$ M)에서 최대 Ca^{++} 흡수 및 Ca^{++} 흡수율을 억제하였고 이러한 억제 양상은 Ca^{++} 과 비상경적으로 작용하는 결과를 보였다.

본 실험결과만 가지고 mitochondria의 Ca^{++} 흡수과정 중 propranolol의 작용부위는 알 수 없으나 이러한 억제현상은 sarcoplasmic reticulum에서와 같이 Ca^{++} 축적의 억제로 심근 수축 이완에 이용가능한 세포내 Ca^{++} 양을 줄이는 결과로 생각되었다²⁹⁾.

Na^{+} 에 의한 mitochondria 내부에 흡수된 Ca^{++} 의 유리는 현저하였으며 Na^{+} 과 mitochondria 내부의 Ca^{++} 의 교환은 Ca^{++} 의 유리속도 곡선이 "S"자형의 Na^{+} 농도 의존성을 보여 Hill 방정식에 적용시킨 바 Hill coefficient는 2에 가까워 매 Na^{+} - Ca^{++} 교환 시마다 1개 Ca^{++} 에 대하여 2개 이상의 Na^{+} 이 관여할 것으로 사료되었다.

이러한 관점에서 Crompton 등⁶⁾은 ruthenium red

로 Ca^{++} 흡수를 차단시 Hill coefficient는 3에 가까워 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 의 교환기전은 electrogenic 교환일 것으로 추정하였으나, 이들의 실험조건은 mitochondria이면 결합 Ca^{++} 의 유리가 가미되는 조건인 문제점이 있다. 또한 Carafoli²⁾의 succinate 첨가에 의해 mitochondria에 Ca^{++} 흡수를 시킨 후 Na^+ 첨가에 의해 Ca^{++} 유리시 mitochondria의 막전압이 변하지 않는다는 보고로 미루어볼 때 mitochondria 내막에서의 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환은 electro-neutral한 즉 전반적으로 막 내외부 하전의 변화를 초래치 않는 $2\text{Na}^+-1\text{Ca}^{++}$ 의 교환이 일어난 것으로 추정된다.

대조시의 50%의 최대 Ca^{++} 유리를 나타내는 Na^+ 농도($[\text{Na}^+]_{0.5}$)가 8.80mM로써 이는 Crompton^{6),8)}의 결과와 유사하였고, Ca^{++} 유리속도가 $[\text{Na}^+]^2$ 에 비례함은 심실근 세포내 유리 Na^+ 의 농도가 6~7mM²⁰⁾이라는 점을 감안할 때 세포내 Na^+ 농도의 적은 변화도 mitochondria와 원형질 간의 Ca^{++} 분포를 큰 폭으로 조절할 것으로 사료된다. Propranolol은 Ca^{++} 흡수속도를 억제하는 농도에 비해 훨씬 낮은 농도에서부터 mitochondria의 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환의 억제를 나타내었으며, 그 억제 양상은 Na^+ 과 비상경적인 양상의 억제를 보였다. 현재로서는 mitochondria의 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환기전이 심근 수축시 세포내 Ca^{++} 동원 인자로서의 중요성이 완전히 확립되어 있지는 않으나, propranolol의 mitochondria의 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환의 억제는 심근 수축시 mitochondria에서의 Ca^{++} 유리량을 낮추어 심근 수축억제 효과가 나타나리라 사료된다. 또한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환 속도의 50% 억제농도가 29 μM 이었다. 이는 심근 β -수용체 차단효과를 나타내는 농도(100~300 ng/ml) 보다는 높으나 심실성 부정맥 치료에 요구되는 propranolol 고용량 투여시 항부정맥 기전으로 관여할 것으로 추정되는¹⁵⁾ 내향성 소듐전류를 억제하는 국소 마취효과 출현농도(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 보다 낮은 농도임을 감안할 때 propranolol의 mitochondria에 대한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ 교환억제에 의한 세포내 Ca^{++} 농도 저하는 세포막에서의 활동전압 제 2, 3기에 관여하는 외향성 포타슘전류의 변화로 항 부정맥효과가 나타날 가능성을 지니며, 특히 세포내 Na^+ 또는 Ca^{++} 농도의 증가를 동반하여 나타날 수 있는 부정맥 발생조건에서는 더욱이 가능한 항 부정맥 기전으로 추측된다.

이상의 실험결과로 보아 심근 sarcoplasmic reticulum 및 mitochondria의 Ca^{++} 조절작용에 대한 propranolol의 억제작용은 생리적 심근세포내 Ca^{++} ho-

meostasis에 영향을 주어 propranolol 고농도 처치시에 나타날 수 있는 심근 수축력 억제 및 항부정맥 효과의 작용기전의 일부로써 관여할 수 있을 것으로 추정하였다.

결 론

전기 생리학적 견지에서 제 2군에 속하는 약물인 propranolol의 항 부정맥 효과와 고농도에서 보이는 β -수용체 차단효과와 무관한 심근 억제효과의 작용기전을 추구하기 위한 연구의 일환으로 심근 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria의 Ca^{++} 조절작용에 미치는 propranolol의 효과를 세포내 Ca^{++} 이온농도 변화와 관련지어 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Sarcoplasmic reticulum의 최대 Ca^{++} 흡수는 propranolol에 의해 용량의존적으로 억제되었다.
2. Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} 유리는 propranolol 5×10^{-4} M까지는 영향을 받지 않았으나 1×10^{-3} M 이상의 농도에서는 유리 속도가 억제되었다.
3. Mitochondria의 최대 흡수 및 Ca^{++} 흡수율은 propranolol에 의하여 비상경적으로 억제되었다($K_i : 6.21 \times 10^{-4}$ M).
4. Mitochondria의 내막 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 교환에 있어 Ca^{++} 유리속도는 $[\text{Na}^+]^2$ 에 비례하였고 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리는 sarcoplasmic reticulum 및 mitochondria의 Ca^{++} 흡수를 억제하는 농도보다 훨씬 낮은 농도의 propranolol에 의해 비상경적으로 억제되었다($K_i : 2.91 \times 10^{-5}$ M).

이상에서 propranolol의 심근에 대한 직접적인 수축력 억제효과와 항부정맥 효과의 일부는 심근세포의 sarcoplasmic reticulum이나 mitochondria의 Ca^{++} 조절작용의 억제에 의한 심근세포내 Ca^{++} homeostasis의 변화에 기인할 것으로 생각하였다.

(본 논문작성에 있어 지도편달과 많은 도움을 주신 박찬웅, 신상구선생님께 깊이 감사드립니다.)

REFERENCES

1. Aronson, R.S., and Cranefield, P.E.: *The electrical activity of canine cardiac Purkinje fibers in sodium free, calcium-rich solutions.* J. Gen. Physiol. 61:786-806, 1973..
2. Carafoli, E.: *Mitochondrial calcium transport; an overview; Calcium-binding proteins; Structure and function, p.*

- 121-130, Elsevier North Holland Inc., 1980.
3. Carafoli, E. and Crompton, M.: *The regulation of intracellular calcium by mitochondria*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:269-284, 1978.
 4. Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Grovetti, F., and Kratzing, C.: *The regulation of calcium from heart mitochondria by sodium*. *J. Mol. Cell. Card.*, 6:361-371, 1974.
 5. Chiu, W.C.K. and Haynes, D.H. (1977): High and low affinity Ca^{++} binding to the sarcoplasmic reticulum use of a high affinity fluorescent calcium indicator. *Biophys. J.K.*: 3-22.
 6. Crompton, M., Capano, M., and Carafoli, E.: *The sodium-induced efflux from heart mitochondria*. *Eur. J. Biochem.*, 69:453-462, 1976.
 7. Crompton, M., and Heid, I.: *The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria*. *Eur. J. Biochem.*, 91:599-608, 1978.
 8. Crompton, M., Künzi, M. and Carafoli, E.: *The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria, Evidence for a sodium-calcium carrier*. *Euro. J. Biochem.*, 79:549-558, 1977.
 9. Crompton, M., Siegel, E., Salzmann, M., and Carafoli, E.: *A kinetic study of the energy-linked influx of calcium into heart mitochondria*. *Eur. J. Biochem.*, 69:240-434, 1976.
 10. Dhalla N.S., S.L. Lee, M.B. Anand and M.S. Chauhan: *Effects of acebutolol, practolol and propranolol on the rat heart sarcolemma*. *Biochem. Pharmacol.* 26:2055-2060, 1977.
 11. Dhalla, N.S. and S.L. Lee: *Comparison of the actions of acebutolol, practolol and propranolol on calcium transport by heart microsomes and mitochondria*. *Br. J. Pharmacol.*, 57:215-221, 1976.
 12. Ebashi, S.: *Excitation-Contraction coupling*. *Ann. Rev. Physiol.*, 38:293-313, 1976.
 13. Fabiato, A. and Fabiato, F.: *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling*. *Ann. Rev. Physiol.*, 41:473-484, 1979.
 14. Fozzard, H.A.: *Heart; Excitation-contraction coupling*. *Ann. Rev. Physiol.* 39:201-220, 1977.
 15. Hauswirth, O., B.N. Singh: *Ionic mechanisms of Heart muscle in relation to the genesis and the pharmacological control of cardiac arrhythmias*. *Pharmacol. Rev.* 30(1):5-63, 1978.
 16. Harigaya, S., Schwarz, A.: *Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle*. *Cir. Res.*, 25:781-794, 1969.
 17. Haton, G.M., and Nicolls, D.G.: *The calcium conductance of inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient*. *Biochem. J.* 156:635-646, 1976.
 18. Isenberg, G., and Trantwein, W.: *Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibers controlled by $[Ca^{++}]_i$* . *Nature (London)* 253:273-274, 1975.
 19. Kass, R.S., and Tsien, K.W.: *Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibers*. *J. Gen. Physiol* 67:599-617, 1976.
 20. Lee, C.O., Fozzard, H.A.: *Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle*. *J. Gen. Physiol.*, 65:695-708, 1975.
 21. Lee, K.S., Choi, S.J.: *Effect of the cardiac glycoside on the Ca^{++} uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 153:114-120, 1966.
 22. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S.: *Protein measurement with the folin-phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
 23. Martonosi, A.N., Chyn, T.L., Schibec, A.: *The calcium transport of sarcoplasmic reticulum*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:148-159, 1978.
 24. Noack, E.: *The interaction of drugs with mitochondrial functions; a possible mechanism for certain pharmacological effect*. *TIPS*, 22-24, August 1981.
 25. Page, E., McCallister, L.P.: *Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells*, *Am. J. Cardiol.*, 31:172-181, 1973.
 26. Pang, D.C. and N.N. Briggs: *Mechanisms of propranolol inhibition of cardiac sarcotubule- γ -AT³²P reaction*, *Biochem. Pharmacology* 22:1301-1308, 1973.
 27. Reed, K.C., and Bygrave, F.L.: *A reevaluation of energy-independent calcium ion binding by rat liver mitochondria*, *Biochem. J.*, 142:555-566, 1974 b.
 28. Reed, K.C., and Bygrave, F.L.: *Methodology for in vitro studies of Ca^{++} transport*, *Analyt. Biochem.*, 67:44-54, 1975.
 29. Sealles, B. and McIntosh, D.A.V.: *Effects of propranolol and its optical isomers on the radiocalcium uptake and the adenosine triphosphatases of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum fraction (SRF)*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 160:261-267, 1968.
 30. Sulakhe, P.V., and Dhalla, N.S.: *E-C coupling in heart. VII. Calcium accumulations; subcellular particles in congestive heart failure*, *J. Clin. Invest.*, 60:1019-1027, 1971.
 31. Sulakhe, P.V. and Dhalla, N.S.: *Excitation-Contraction coupling in Heart X. Further studies on the Energy-Linked*

calcium transport by subcellular particules in the failing heart of myopathic hamster. Biochem. Med. 8:18-27, 1973.

potassium current of cardiac Purkinje fibers. J. Gen Physiol. 64:293-319, 1974

32. Tsien, R.W.: *Effect of epinephrine on the pacemaker*
