

Kreatin Fosfatın İzole Kurbağa Kalbi Spontan Kontraktıl Aktivitesi Üzerine Doz ve Zamana Bağımlı Etkisi

DOSE-AND TIME-DEPENDENT EFFECT OF CREATINE PHOSPHATE ON SPONTANEOUS CONTRACTILE ACTIVITY OF ISOLATED FROG HEART

Doç.Dr.Kıymet SALBAŞ*, Yard.Doç.Dr.Hasan GÖK**, Uz.Dr.Vasfi JLUSOY*

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji ABD, ANKARA

** Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji ABD, KONYA

ÖZET

Çalışmada kreatin fosfatın izole kurbağa kalbi spontan kontraktıl aktivitesi üzerine etkisi, etkinin doza ve zamana bağımlı değişimi incelenmiştir. Sonuçlarımız kreatin fosfatın etki modelinin doza ve zamana bağımlı olarak değiştiğini göstermiştir. Etki 10-20 mM konsantrasyon aralığında uzunca süreli bir pozitif inotropik, 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda önce kısa süreli bir negatif inotropik sonra uzunca süreli bir pozitif inotropik karakterdedir. 105 mM de kontraktıl aktivite tamamen yok olmakta, kontraktıl parametreler yıkama ile düzelmektedir. Düşük dozlardaki pozitif inotropik, yüksek dozlardaki negatif+pozitif inotropik etkiler esnasında spontan kontraksiyon frekansında anlamlı bir değişme gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Kreatin fosfat, Kurbağa kalbi, Kontraktıl aktivite

T Klin Kardiyoloji 1992, 5:252-257

SUMMARY

In this study we assessed the effect of creatine phosphate and its dose-and time-dependency on spontaneous contractile activity of isolated frog heart. Our results showed that the mode of action of creatine phosphate varied with dose and time. Between 10-40 mM the effect showed a long lasting positive inotropic, at >50 mM, first a transient negative inotropic then a longer lasting positive inotropic character. At 105 mM creatine phosphate caused the complete loss of contractile activity, but the contractile parameters recovered upon washout. No significant change in spontaneous rate of contraction was observed neither during positive inotropic effect at low doses nor negative+positive inotropic effects at high doses

Key Words: Creatine phosphate, Frog heart, Contractile activity

Turk J Cardiol 1992, 5:252-257

Son çalışmalarda kurbağa kalb kasında da, zayıf da olsa sarkoplazmik retikulum vezikülleri bulunduğu, bunların Ca^{2+} depo ettiği ve kontraksiyona bir miktar katkıda bulunduğu dair çalışmalar (1-3) yayınlanmışsa da, kurbağa kalb kasında kontraksiyonun regülasyonunun hemen tamamen sarkolemmadan Ca^{2+} girişine bağlı olduğu görüşü hakimdir (4-6). Kalb kası sarkolemmasından Ca^{2+} içeri girişi de hücre içi metabolik süreçlere bağlı olup (7,8), kontraksiyonun hücre içi metabolik kontrolü esas olarak kreatin fosfokinaz sistemi tarafından yapılmaktadır (9,10).

Kreatin fosfat'ın (CP) normal koşullar altında memeli kalb kası hücre zarından geçemediği bilinmektedir

Geliş Tarihi: 1.2.1991

Kabul Tarihi: 25.4.1992

Yazışma Adresi: Doç.Dr.Kıymet SALBAŞ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kardiyoloji ABD, ANKARA

(11-13). Rosenshtraukh ve ark (14), kurbağa kalb kasında durumun farklı olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, hücre dışı CP konsantrasyonundan artmanın, izole kurbağa kalb kasında hücre içi CP konsantrasyonunda artmaya yol açtığını, kontraksiyon kuvvetinin de bu artmaya bağımlı değişmeler gösterdiğini rapor etmişlerdir.

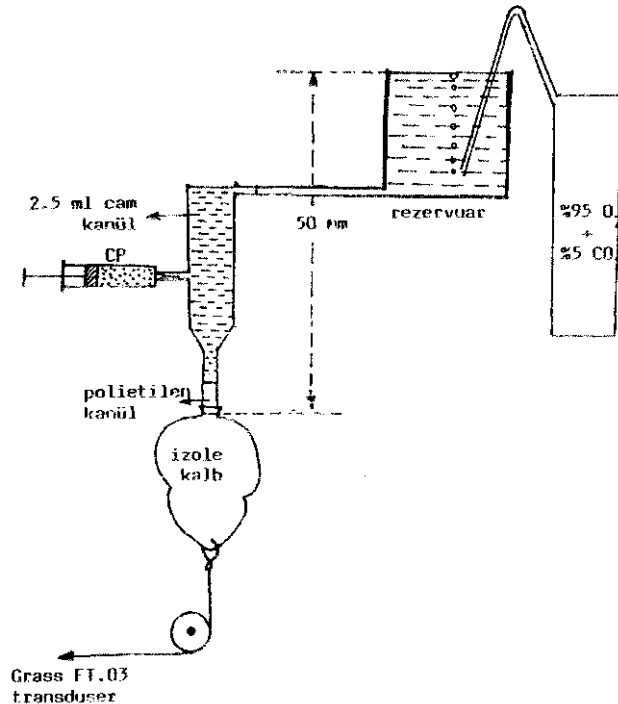
CP in kurbağa kalb kasının spontan kontraktıl aktivitesi üzerine etkisinin genişçe bir konsantrasyon aralığında doza ve zamana bağımlı olarak incelendiği bir çalışmaya mevcut literatürde rastlanamamış olması bizi bu çalışmayı yapmaya yöneltmiştir. Çalışmada, kalb kası hücre içi CP konsantrasyonunun 5-6 mM olduğu (14) göz önüne alınarak, en düşük doz olarak 10 mM den başlayarak toksik doza kadar olan konsantrasyon aralığındaki etkinin doza ve zamana bağımlı değişimini kalitatif olarak inceledik. CP'in etki mekanizma veya mekanizmalarının incelenmesi ise bu çalışmayı izleyen çalışmamızın amacı oldu.

RY E fb L> V 6 f f ITO

Çalışmanın materyalini dişi ve erkek kurbağalardan (*Rana Ridibunda*) izole edilmiş kalbler oluşturmuştur. Kalb izole edilmeden önce iç çapı 0.5 mm olan polietilen tüp aort köküne yerleştirilmiş, aortanın, dolayısıyla tüpün etrafı ipek iplikle sarılıp düğüm atılarak tüp aorta içine sabitleştirilmiştir. Bundan sonra kalb süratle izole edilmiş, polietilen tüp 2.5 ml hacmindeki cam kanülün ucuna takılarak, Şekil 1 de şematize edilen sisteme monte edilmiştir, izole kalb deney boyunca 55 mmHaO hidrostatik basınç altında spontan ritmi ile çalışmıştır. Perfüzyon sıvısı Ringer solüsyonu olup kompozisyonu (mM olarak): NaCl 90, KCl 2.5, NaHCO₃ 20, MgCl₂ 5, CaCl₂ 2.5 dür. Solüsyon sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlanmıştır (pH:7.4). Spontan kontraktıl aktivite kaydı için, kalbin apeksine paslanmaz çelikten yapılmış bir forseps aracılığıyla bağlanan ipek iplik, dönme eksenindeki sürtünmesi oldukça azaltılmış bir makaradan geçirilerek Grass FT.03 kuvvet-uzanım çevirecine (force-displacement transducer) bağlanmıştır.

Deneye başlamadan önce her bir preparat 60 dakikalık bir süre içinde stabilizasyona tabi tutulmuş, bu süre içinde diyastolik gerginlik maksimum kontraksiyon kuvveti elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. Kontrol kayıtları 60 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda yapılmıştır.

Çalışmada şu kontraktıl parametreler incelenmiştir: Diyastolik gerginlik (diastolic tension): T_p, kasılma kuvveti (tension): T, kasılma ve gevşeme hızları: $\pm dT/dt$,



Şekil 1. Deney sisteminin şeması.

spontan kasılma frekansı. TD ve T, Grass 79D poligrafın 1. kanalından kaydedilirken, $\pm dT/dt$ Grass 7P20 türev alıcı aracılığı ile poligrafın 2. kanalından kaydedilmiştir.

CP solüsyon halinde iken oldukça labil olduğundan (16), toz halindeki CP (Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A) her bir deneyden hemen önce, Ringer solüsyonu içinde eritilerek sadece o deneyde kullanılmak üzere 300mM konsantrasyonda stok solüsyon hazırlanmış, 2.5 ml lik cam kanül içine bu solüsyondan gerekli miktarlarda ilave edilerek istenen dozlar elde edilmiştir.

Sonuçlar ortalama + standart hata (SH) olarak sunulmuş, etkilerin anlamlılığının istatistiksel analizi Student's t test ile yapılmış, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

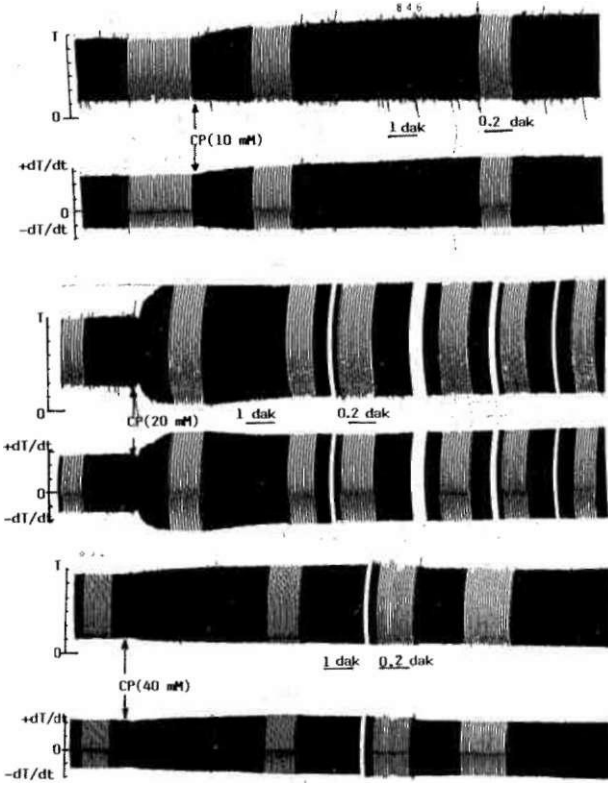
SONUÇLAR

Deney sonuçlarımız CP in etki modelinin düşük ve yüksek dozlarda farklı olduğunu göstermiştir.

10-40 mM arası: Bu konsantrasyon aralığındaki etki uzunca süreli bir pozitif inotropik etkidir. CP tatbikini izleyen 5±2 saniye içinde TD düşmeye, T ve $\pm dT/dt$ yükselmeye başlamaktadır. Bu değişmelerin gelişme kinetiği doza bağımlı olarak değişmektedir. 10 ve 40 mM de TD, T ve $\pm dT/dt$ deki değişmelerin maksimum değerlerine ulaşma süresi 8±3.5 dakika iken, 20 mM de 4±1.5 dakikadır. Pozitif inotropik etkinin şiddeti de benzer şekilde doza bağımlıdır. 10 ve 40 mM deki etkilerin farkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok iken, 20 mM deki etkiler 10 ve 40 mM deki etkilerden çarpıcı biçimde farklıdır. Pozitif inotropik etki her üç dozda da uzunca süreli olup, kontraktıl parametreler kontrol değerlerine CP tatbikini izleyen 23±9 dakikadan sonra dönmektedirler.

Şekil 2 de 10, 20 ve 40 mM deki etkileri gösteren örnek kayıtlar görülmektedir. Spontan kasılma frekansının gözlenebilmesi için, kayıt kağıdının kayma hızı zaman zaman yükseltilmiştir. 10-40 mM CP pozitif inotropik etkisi esnasında izole kurbağa kalbinin spontan kasılma frekansı üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Şekil 3'de 10-40 mM CP in TD, T ve $\pm dT/dt$ üzerindeki etkilerinin doz ve zamana bağımlı değişimleri gösterilmiştir.

50mM ve daha yüksek: 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda CP tatbikini izleyen 4±1 saniye içinde TD yükselmeye, T ve $\pm dT/dt$ düşmeye başlamaktadır. Bu değişmeler oldukça hızlı gelişmekte, maksimum negatif inotropik etkiye ulaşma hızı, etkinin şiddeti ve süresi doza bağımlı olarak artmaktadır. Bu ani negatif inotropik etki kısa sürede ortadan kalkmakta bunu uzunca süreli bir pozitif inotropik etki izlemektedir. 50 mM ve daha yüksek dozlarda görülen bu bifazik etkinin negatif inotropik komponentinin ortaya çıkış hızı, şiddeti ve süresi artan CP dozu ile artarken, pozitif inotropik komponentinin şiddeti artan CP dozu ile azalmaktadır. Pozitif inotropik etkinin maksimum düzeyine ulaşma zamanı ile doz arasında anlamlı bir



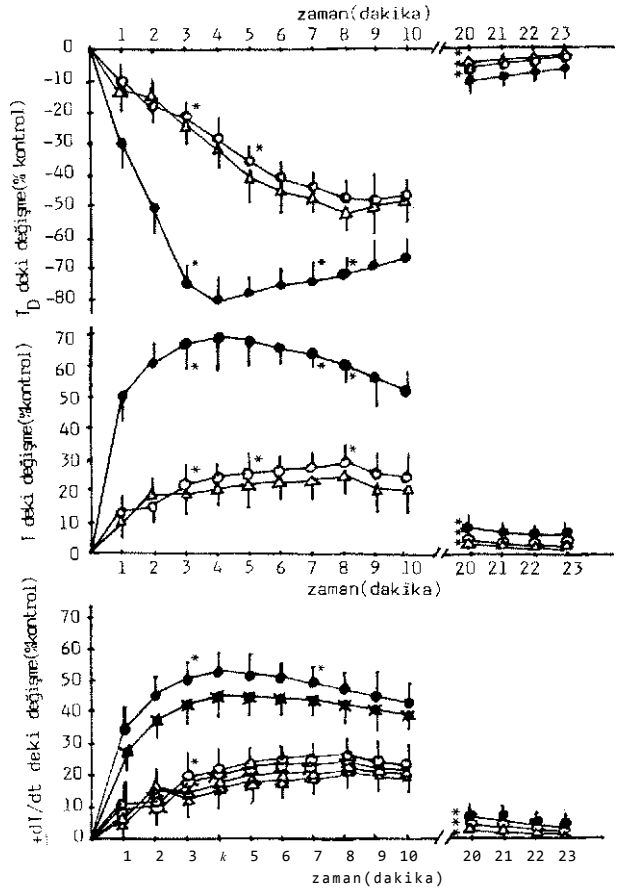
Şekil 2. 10, 20, ve 40 mM CP in izole kurbağa kalbi spontan kontraktil aktivitesi üzerine etkileri. Üstteki ve alttaki traseler simültane kaydedilmiş olup, üsttekiler T deki, alttakiler $\pm dT/dt$ teki değişimleri göstermektedir. CP in spontan kontraksiyon frekansı üzerindeki etkisinin kaydedilebilmesi için kayıt kağıdının kayma hızı zaman zaman 10 mm/dak. dan 50 mm/dak. ya çıkarılmıştır. CP ok ile işaretlenmiş olan anda, 2.5 ml cam kanül içine bir kereye mahsus olmak üzere enjekte edilmiştir.

ilişki gözlenmemiş olup, etkinin ortadan kalkma hızı ise düşük dozlarda düşük yüksek dozlarda yüksektir. Şekil 4 de 50,70,80 ve 100 mM CP in kontraktil aktivite üzerine etkilerini gösteren örnek kayıtlar görülmektedir. CP, 105 mM de spontan kontraktil aktiviteyi tamamen inhibe etmektedir. Etki 70 ± 15 saniye sürmekte, kontraktil aktivite düzelmekte ve bunu hafif bir pozitif inotropik etki izlemektedir (Şekil 5). CP nin 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki bifazik etkisinin hiçbir fazında, spontan kontraksiyon frekansında anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Şekil 6 da 50-100 mM CP in izole kurbağa kalbi kontraktil parametreleri üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağımlı değişimi özetlenmiştir.

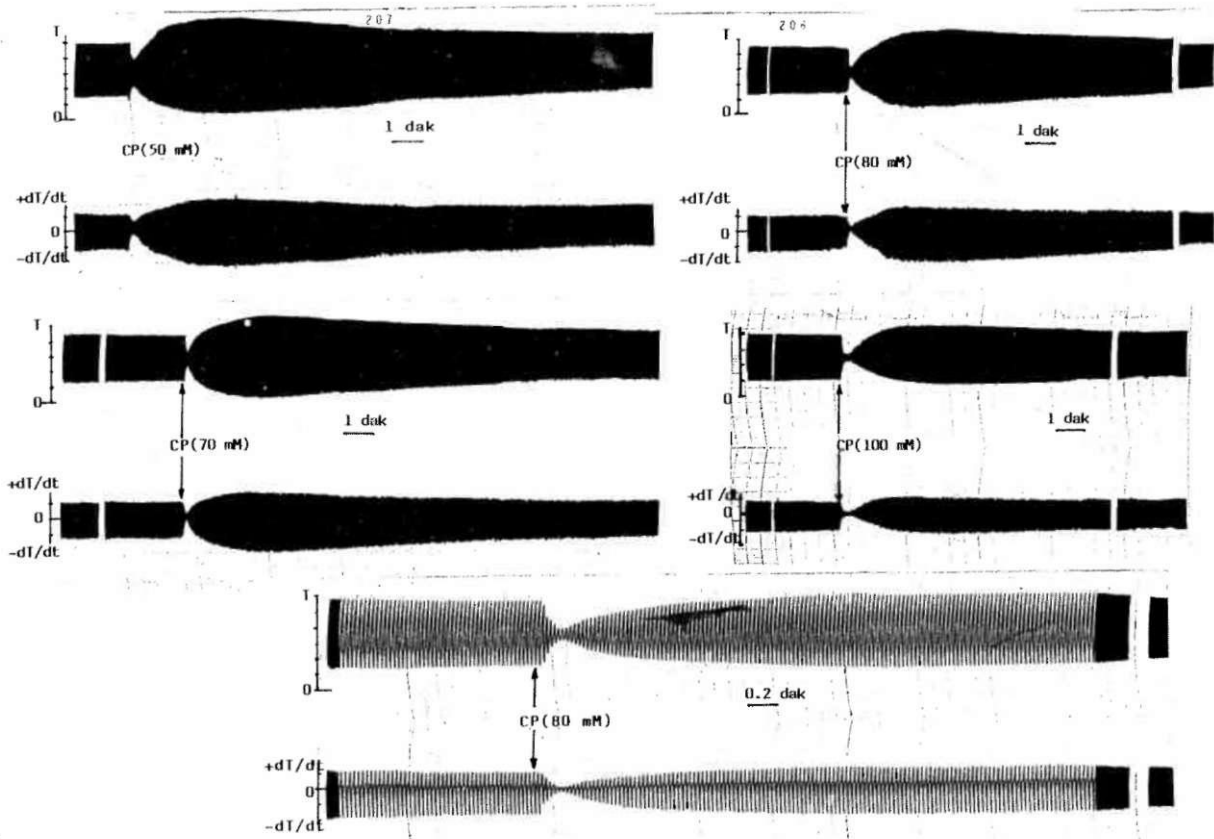
TARTIŞMA

CP mitokondride kreatin fosfokinaz reaksiyonu ile oluşmakta, oradan sitoplazmaya diffüze olup, miyofibrillere ulaşarak, miyofibriller fosfokinaz reaksiyonu ile, bir önceki Kontraksiyon siklusunda oluşmuş olan ADP nin refosforilasyonunda kullanılmaktadır (15,16). Yani kontraksiyon için gerekli enerji, miyofibriller fosfokinaz reaksiyonu ile CP molekülünden alınarak ADP ye verilmekte ve bir sonraki kontraksiyonda kullanılmak üzere

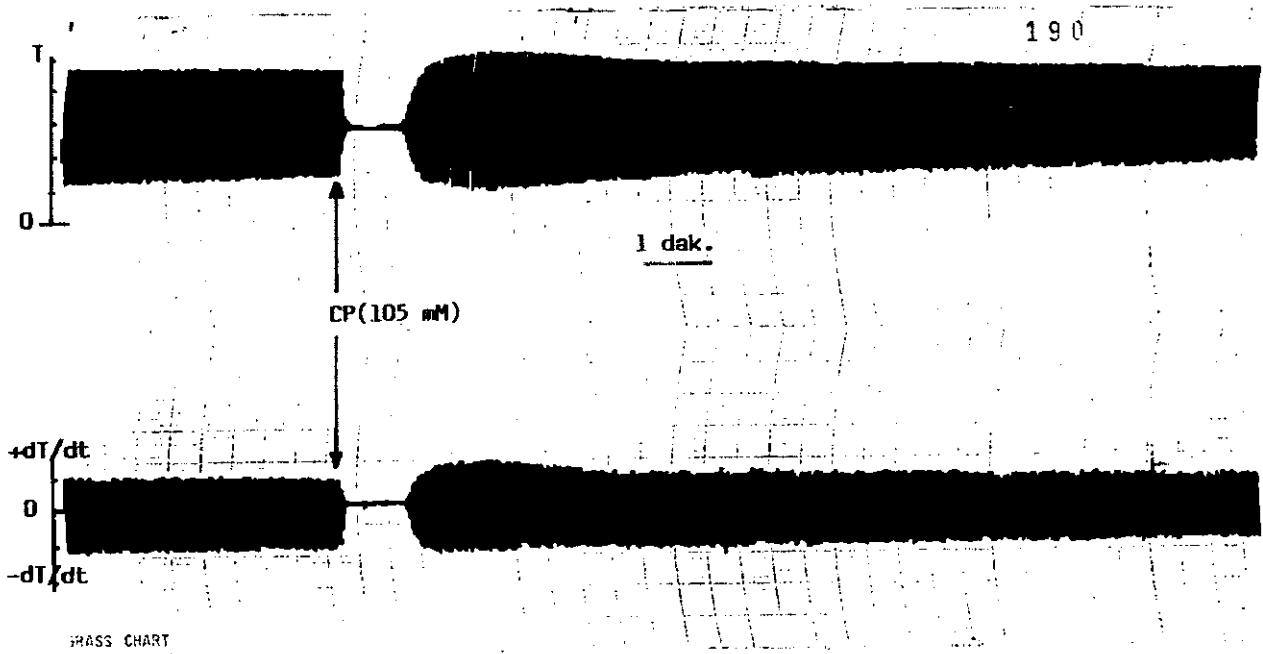
ATP de hazır bekletilmektedir. Kalb kasında hücre içi ATP ve CP içeriğindeki önemsiz değişimler bile, mekanik aktivitede önemli değişimlere yol açmaktadır (17,18). CP normal koşullar altında memeli kalb kası hücre zarından geçememektedir (11-13). Kurbağa kalb kası hücre zarının ise CP a yüksek bir geçirgenlik gösterdiği, hücre dışına giderek artan dozlarda CP ilave edildiğinde, hücre içi CP konsantrasyonun giderek arttığı mitokondride CP üretimi tamamen inhibe edildiğinde, hücre dışına CP tatbik edilmesinin kontraktil aktiviteyi düzeltip sürdürdüğü Rosenshtraukh ve ark. tarafından gösterilmiştir (14,19). Bu çalışmalarda 10-20 mM CP in elektriksel uyarılarla uyarılan izole miyokard şeritlerinde kontraksiyon kuvvetini artırdığı, 10 dakikalık süperfüzyon süresince artan kontraksiyon kuvvetinin normal Ringer solüsyonu ile yıkamayla biraz daha arttığı, yıkamanın başlamasından 25-30 dakika sonra kontrol değerine döndüğü gösterilmiştir. Yine bu araştırmacılar CP konsantrasyonu 50-70 mM olduğunda etki modelinin



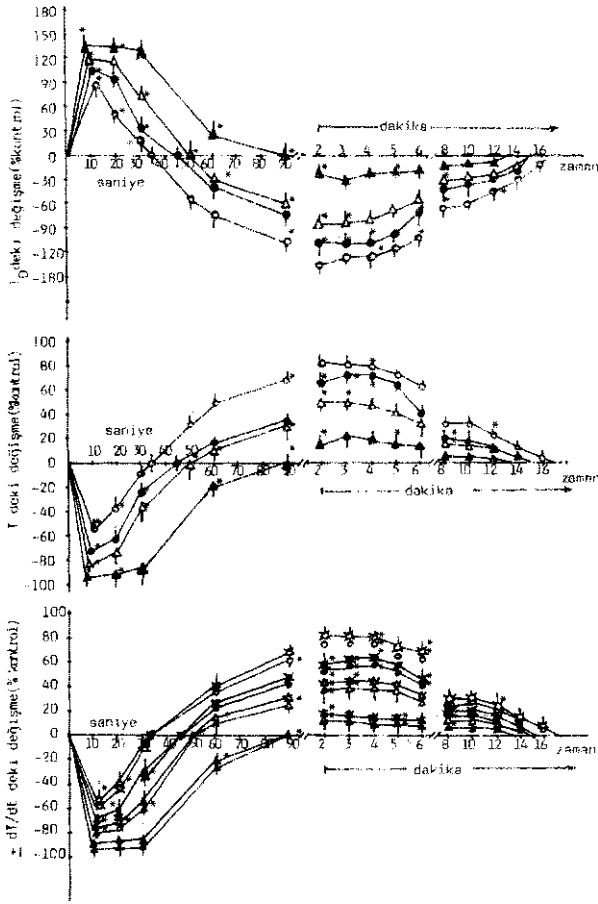
Şekil 3. CP in 10-40 mM konsantrasyon aralığında izole kurbağa kalbi kontraktil parametreleri üzerine doz ve zamana bağımlı etkisi (Her bir nokta 10 deney ortalaması $\pm SH$). Üzerinde * bulunan değerler için $p < 0.01$, diğerleri için $p < 0.05$ dir. o, • ve A sırasıyla 10, 20 ve 40 mM de TD, T ve $+dT/dt$ deki etkileri gösterirken, », J* ve ^Jf bu konsantrasyonlarda $-dT/dt$ deki etkileri göstermektedir.



Şekil 4. 50, 70, 80 ve 100 mM CP in izole kurbağa kalbi spontan kontraktıl aktivitesi üzerine etkileri. CP ok ile işaretlenmiş olan anda kanül içine bir kereye mahsus olmak üzere enjekte edilmiştir. CP in spontan kontraksiyon frekansı üzerine etkisinin kaydı için her bir konsantrasyondaki deneylerin bir kısmında kayıt kağıdının kayma hızı yükseltilmiştir. Şekil 5 e bu hızdaki kayıtlardan bir örnek kayıt olup, 80 mM CP in T_n , T ve $\pm dT/dt$ üzerindeki etkilerini gösterirken, spontan kontraksiyon frekansını etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 5. CP in 105 mM de izole kurbağa kalbi spontan kontraktıl aktivitesi üzerine etkilerini gösteren bir örnek kayıt. Ok ile işaretlenmiş olan CP tatbiki ile kontraktıl parametreler hızla deprese olmakta, kontraktıl aktivite bir süre için (70 ± 15 saniye) tamamen inhibe edilmektedir. Etki diğer konsantrasyonlardan (50—100 mM) etki gibi geçici olup, kontraktıl parametreler hızla düzelmektedir.



Şekil 6. CP in 50-100 mM konsantrasyon aralığında izole kurbağa kalbi kontraktıl parametreleri üzerine doz ve zamana bağımlı etkisi (Her bir nokta 12 deney ortalaması \pm SH). Üzerinde* bulunan değerler için $p < 0.01$, diğerleri için $p < 0.05$ dir, o, *, A ve A sırasıyla 50, 70, 80 ve 100 mM de T_o , T ve $+dT/dt$ deki etkileri gösterirken, n, m, ve ^ sırasıyla 50, 70, 80 ve 100 mM de $-dT/dt$ deki etkileri göstermektedir,

değiştiğini gözlemişlerdir. Bizim bulgularımız ile literatür sonuçları arasında nitelik bakımından önemli benzerlikler olduğu gibi, nicelik ve zamana bağımlılık bakımından bazı farklılıklar vardır. Ayrıca literatürde, CP in miyokardiyal kontraktılitenin göstergesi olan dT/dt_{max} (20) üzerine ve İzole tam kalbin spontan çalışma hızı üzerine etkileriyle ilgili bilgi yoktur.

Çalışma sonuçlarımız CP in 10-40 mM konsantrasyon aralığında izole kurbağa kalbi üzerinde önemli bir pozitif inotropik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 2). Kontraksiyon kuvvetindeki artma (kontrol değerinin yüzdesi olarak) 10,20 ve 40 mM de sırasıyla 31.17 ± 5.27 , 69.18 ± 14.64 ve 30.19 ± 5.15 dir. 20 mM deki etki 10 ve 40 mM deki etkilerden oldukça farklıdır ($p < 0.01$). 10 ve 40 mM deki etkiler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Etkinin ortaya çıkış hızı da benzer bir doza bağımlılık göstermekte olup, 10 ve 40 mM deki etkiler 20 mM deki etkiye göre daha yavaş gelişmekte, etki 10 ve 40 mM de maksimum değerine 8 ± 3.5 dakikada ulaşırken, 20

mM de 4 ± 1.5 dakikada ulaşmaktadır. Etkinin ortadan kalkma hızında önemli bir doza bağımlılık gözlenmemiş olup, kontraktıl parametreler her üç konsantrasyonda da kontrol değerlerine 23 ± 9 dakikada dönmektedirler. Çalışmamızda CP in 10-40 mM konsantrasyon aralığında T_o yi düşürdüğü gözlenmiştir. Bu düşme 20 mM de fazla, 10 ve 40 mM de azdır. Mevcut literatürde, CP in kurbağa kalb kası dinlenim (diastolik) gerginliği üzerine etkisinden bahsedilmemiştir. TD kalb kasında önemli bir kontraktıl parametre olup hücre dışı ve içi faktörlerce belirlenmektedir (20). Sonuçlarımıza göre 10-40 mM de $\pm dT/dt$ nin doz ve zamana bağımlı değişimine paraleldir. Maksimum kasılma hızı (dT/dt_{max}) miyokardiyal kontraktılitenin göstergesi olduğundan, CP in 10-40 mM konsantrasyon aralığında miyokardiyal kontraktıliteni artırdığını söyleyebiliriz. Bu konsantrasyon aralığında CP in izole kurbağa kalbi spontan kontraksiyon frekansı üzerinde önemli bir etkisi görülmemiştir. Bu önemli bir bulgu olup, CP in bu konsantrasyon aralığındaki pozitif inotropik etkisinin kontraksiyon frekansındaki değişme sonucu ortaya çıkmadığını göstermektedir. Zira kurbağa kalbinde de memeli kalbindeki (21) gibi, kontraksiyon frekansındaki ani bir artmanın net Ca^{2+} içeriği akımında artma ile asosiyel olduğu ve kontraksiyon kuvvetinin yeni bir denge seviyesine ulaşmaya kadar arttığı bilinmektedir (22-24). CP in 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki etkisi 10-40 mM deki etkisinden farklıdır. 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda gözlediğimiz etki bifazik karakterde olup, önce bir negatif inotropik sonra bir pozitif inotropik etki şeklindedir (Şekil 4), Birinci faz yani negatif inotropik komponent, kısa süreli bir etki olup, ortaya çıkış hızı, şiddeti ve süresi şiddetli bir doza bağımlılık göstermektedir. Etkinin maksimum düzeye ulaşma süresi 50, 70, 80 ve 100 mM de sırasıyla 12 ± 2 , 9.5 ± 1.5 , 8.5 ± 2 ve 7.5 ± 1.5 saniyedir. Bu konsantrasyonlarda T deki maksimum düşmeler (kontrol değerinin yüzdesi olarak) sırasıyla 56.50 ± 11.32 , 72.64 ± 17.73 , 83.82 ± 12.46 ve 90.42 ± 5.36 dir. $+dT/dt$ de T deki düşmelere paralel düşmeler göstermiş olup, $-dT/dt$ deki düşme, $+dT/dt$ deki düşmeden biraz daha fazladır. Maksimum negatif inotropik etkinin süresi ise düşük dozlarda kısa, yüksek dozlarda uzundur. Örneğin 50 mM de negatif inotropik etkinin maksimum düzeyde kalma süresi 1-2 saniye iken 100 mM de 22-28 saniyedir. 105 mM de ise CP spontan kontraktıl aktiviteyi 70+15 saniye süre ile tamamen inhibe etmektedir (Şekil 5). Bifazik etkinin ikinci komponenti, süresi birinci komponente göre oldukça uzun bir pozitif inotropik etkidir. Pozitif inotropik etkinin şiddeti düşük dozlarda yüksek, yüksek dozlarda düşüktür (Şekil 4,6). T deki maksimum artmalar (kontrol değerinin yüzdesi olarak) 50, 70, 80 ve 100 mM de sırasıyla 72.05 ± 10.66 , 56.74 ± 10.08 , 50.35 ± 9.78 ve 24.52 ± 6.62 dir. Etkinin maksimum değere ulaşma zamanı ile konsantrasyon arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Etkinin ortadan kalkma hızı ise düşük dozlarda düşük, yüksek dozlarda yüksektir. Kontraktıl parametreler kontrol değerlerine 50 mM de 16 ± 3 dakikada dönerken, 100 mM de 12.5 ± 3 dakikada dönmektedir.

Literatürde rapor edilmiş olan 10-20 mM (19) ve 10-70 mM (14) CP trı kurbağa kalb kası kontraksiyon kuvveti üzerin@ etkisinin doza ve zamana bağımlı değişimi ile bizini bulgularımız arasında farklılıklar vardır. Burada öncelikle kullanılan preparatların, CP in preparata uygulama süresi ve şeklinin farklılığını belirtmek gerekir. Bizim deneylerimizde izole tam kalb kullanılmış ve CP aort köküne yerleştirilmiş ince polietilen tüülle bağlantılı olan 2.5 ml lik cam kanül içine (şekil 1) stok solüsyondan gerekli miktarda alınarak bir ke-rede (bolus) enjekte edilmiştir. Yani kalb, örneğin 50 mM CP'a çok kısa bir süre ile maruz kalmakta, kanüle rezervuarında sürekli Ringer solüsyonu gelmekte olduğundan, kanül içindeki CP konsantrasyonu her bir kalb atımından sonra biraz daha düşmektedir. Literatürde (14,19) izole ventrikül ve atrium şeritleri kullanılmış, CP rezervuara ilave edilerek preparat 10 dakika süreyle hep aynı dozdaki CP ile süperfüze edilmiştir. Etki şid-detinin ve süresinin doza ve zamana bağımlı değişimle-rinde bizim sonuçlarımızla literatür bulguları arasında farklılık olmasına karşın, etki modelinin doza bağımlı olarak değiştigi sonucu literatürle uyum içindedir.

Deney sonuçlarımızdan bir önemli nokta da CP in spontan kontraktıl aktivite üzerindeki etkisinin atım fre-kansından bağımsız olduğunun gösterilmesidir. CP 50 mM v@ daha yüksek konsantrasyonlarda da TD, T ve $\pm T/dt$ üzerindeki etkilerini spontan kontraksiyon fre-kansını değiştirmeden göstermektedir.

Sonuç olarak: Kurbağa kalb kasında kontraktıl per-formans CP tarafından doz ve zamana bağımlı olarak etkilenmektedir. Etki hem nitelik hem de nicelik baki-mından doz ve zamana bağımlı olup, spontan kontrak-siyon frekansında değişikliğe yol açmadan ortaya çık-maktadır.

KAYNAKLAR

- Chapman HA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 1983; 245: H235-H552.
- Anderson ME, Fox U, Swayze CR, Donaldson SK. Frog ventricle: Participation of SR in excitation-contraction coupling. *Am J Physiol* 1986; 256:H1432-H9.
- McLeod AG, Shen ACY, Campbell KP, Michalak M, Jorgensen AO, Fro cardiac calsequestrin. Identification, characterization and subcellular distribution in two structurally distinct regions of peripheral sarcoplasmic reticulum in frog ventricular myocardium. *Circ Res* 1991; 69:344-59.
- Morad M, Orkiand RK. Excitation-contraction coupling in frog ventricle: Evidence from voltage clamp studies. *J Physiol Lond* 1971;219:167-89.
- Fabiato A, Fabiato F. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and newborn rat ventricles. *Ann New York Acad Sci* 1978; 78:491-521.
- Anderson TYV, Hirsch C, Kavalier F. Mechanism of activation of contraction in frog ventricular muscle. *Circ Res* 1977; 41:472-80.
- Schneider JA, Sperelakis N. The demonstration of energy dependence of the isoproterenol-induced transcellular Ca^{2+} current in isolated perfused guinea pig hearts. An explanation for mechanical failure in ischemic myocardium. *J Surg Res* 1974; 16:389-403.
- Sperelakis N, Schneider JA. A metabolic control mechanism for calcium ion flux that may protect the ventricular myocardial cell. *Am J Cardiol* 1976; 37:1079-85.
- Saks VA, Rosenshtraukh LV, Undrovlnas AI, Smirnov VN, Chazov EI. Studies on energy transport in heart cells. Intracellular creatine content as a regulatory factor of frog heart energetics and force of contraction. *Biochem Med* 1976; 16:21-36.
- Sacks VA, Rosenshtraukh LV, Chazov EI. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 1978; 56:691-706.
- Parrat JR, Marshall RJ. The response of isolated cardiac muscle to acute anoxia. Protective effect of adenosine triphosphate and creatine phosphate. *J Pharm Pharmacol* 1972;26:427-33.
- Fagbemi O, Kane KA, Parrat JR. Creatine phosphate suppresses ventricular arrhythmias resulting from coronary artery ligation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:53-8.
- Hears DJ, Tanaka K, Crome R, Manning AS. Creatine phosphate and protection against reperfusion induced arrhythmias in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 1986; 131:21-30.
- Rosenshtraukh LV, Saks VA, Undrovlnas AI, Chazov EI, Smirnov VN, Sharov VG. Studies on energy transport in heart cells. The effect of creatine phosphate on the frog ventricular contractile force and action potential duration. *Biochem Med* 1978; 19:148-64.
- Gudbjarnason S, Matties P, Ravens KG. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1970; 1:325-39.
- Gerken G, Schlette U. Metabolic status of heart in acute insufficiency due to 1-fluoro-4 dinitro-benzene. *Experientia* 1968;24:17-9.
- Neely JR, Denton RM, England PJ, Randle PJ. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and interactions with glycolysis in perfused rat heart. *Biochem J* 1972;128:147-59.
- Williamson JR, Ford C, Illingworth J, Safer B. Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res* 1976; 38 (Suppl. I):39-51.
- Rosenshtraukh LV, Saks VA, Yuriavichus IA, et al. Effect of creatine phosphate on the slow inward calcium current, action potential, and the contractile force of frog atrium and ventricle. *Biochem Med* 1979; 21:1-15.
- Brady AJ. Contractile and mechanical properties of myocardium. In: Sperelakis N, Ed. *Physiology of the heart*. Boston: Martinus Nijhoff publishing, 1984: 279-99.
- Langer GA, Brady AJ. Calcium flux in mammalian ventricular myocardium. *J Gen Physiol* 1963; 46:703-20.
- Niedergerke R. Movements of calcium in beating ventricles of frog heart. *J Physiol* 1963; 167:551-80.
- Niedergerke R, Page S, Talbot MS. Determination of calcium movements in heart ventricles of frog. *J Physiol* 1969; 202:58P-60P.
- Sands SD, Winegrad S. Treppe and total calcium content of frog ventricle. *Am J Physiol* 1970; 218:908-10.