

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО Na^+/K^+ -БАЛАНСА У ДВУХКЛЕТОЧНОГО ЭМБРИОНА МЫШИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИТОХАЛАЗИНА Б

© Д. В. Гольдштейн,^{1–3} В. Н. Погорелова,³ А. Г. Погорелов^{3,4}

¹ Институт стволовой клетки и клеточных технологий, ² ЗАО «РЕМЕТЭКС», Москва,

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино,

и ⁴ Факультет биофизики и медицины Пуцинского государственного университета;
электронный адрес: Pogorelov@iteb.ru

В данной работе изменение внутриклеточной концентрации элементов (Na и K), индуцированное действием цитохалазина Б, определяли с помощью электронно-зондового микроанализа. В течение всей процедуры замены ядерного материала раннего эмбриона на ядро соматической клетки в физиологической среде присутствует цитохалазин Б. Прямое действие препарата обусловлено трансформацией цитоскелета, которая может быть причиной активизации калиевых каналов и в результате — нарушения цитоплазматического Na^+/K^+ -баланса. Показано, что влияние цитохалазина Б проявляется в уменьшении изначально высокого внутриклеточного содержания Na^+ против градиента его концентрации. Отмывка эмбриона в среде Дюльбекко, не содержащей цитохалазина, восстанавливает Na^+/K^+ -баланс до контрольного уровня. Обсуждаются механизмы, которые могут отвечать за регистрируемые изменения концентрации Na^+ в цитоплазме эмбриональной клетки.

Ключевые слова: ранний эмбрион, мышь, цитохалазин Б, цитоплазматический Na^+/K^+ -баланс, калиевый канал, Na^+/K^+ -АТФаза, электронно-зондовый микроанализ.

Условием, обязательным для проведения энуклеации, является присутствие в физиологическом растворе цитохалазина Б (ЦХБ) на всех этапах процедуры. Показано, что по завершении переноса ядра соматической клетки в клетку раннего эмбриона в последней регистрируется дефицит K^+ (Гольдштейн и др., 2004а; Погорелов и др., 2004а). Следует отметить, что изменение содержания K^+ в цитоплазме не только характеризует степень травматического действия агента, но и означает переход клетки в новое функциональное состояние. В результате мишенью действия измененного K^+ -баланса могут быть такие молекулярно-генетические механизмы, как рекомбинация ДНК (Parkinson et al., 2002), экспрессия новых белков (Taurin et al., 2002) и деполимеризация актина — основного структурного элемента цитоскелета (Goldmann, 2003).

Внутриклеточная концентрация K^+ является суммарным результатом разнонаправленных потоков его пассивного и активного транспорта. Механизм действия ЦХБ на комплекс калиевых каналов и насосов *in vitro* не вполне ясен. Известно, что прямое действие препарата на клетку обусловлено разрушением ее цитоскелета. Этот фактор гипотетически может быть причиной каскада модификаций функций всей системы транспорта ионов на мембране клетки. Взаимодействие Na^+/K^+ -АТФазы с элементами цитоскелета обсуждалось ранее в работе, которая представляет интерес для широкого круга специалистов, изучающих механизмы формирования ионного гомеостаза клетки (Лопина, 2001). Было показано и влияние структуры цитоскелета на ионные каналы (Yazaki et al., 1995).

Для разработки способов коррекции травматического действия энуклеации необходимо знать, какие манипуляции с эмбрионом наиболее критичны для наблюдаемых нарушений. Уже на этапе удаления собственного ядерного материала требуется предобработка эмбриональной клетки ЦХБ. В течение всей последующей процедуры препарат присутствует в физиологическом растворе. Таким образом, изменение клеточного гомеостаза является результатом сочетанного влияния вещества и специфических условий, характерных для каждого этапа протокола. Однако на начальной стадии обработки эмбриона ЦХБ проявляется действие только этого препарата.

В настоящей работе проведен анализ изменения концентраций K^+ и Na^+ уже на первом этапе нуклеации, а также исследована возможность коррекции повреждающего действия ЦХБ посредством инкубации эмбриона в среде, не содержащей препарата.

Материал и методика

Исследования проводили на мышах NMRI. Во время эксперимента животных содержали в стандартных условиях: температура в комнате 20 ± 2 °С, гранулированный корм ПК-121-2, питье *ad libitum*. Воду, корм и подстилку меняли ежедневно без предварительной стерилизации. Получение двухклеточных эмбрионов в G₁/S-фазе развития проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Манк, 1990). Вымытые эмбрионы инкубировали в среде Дюльбекко, содержащей 5 мкг/мл ЦХБ. Схема обработки зародыша препаратом представлена на рис. 1.

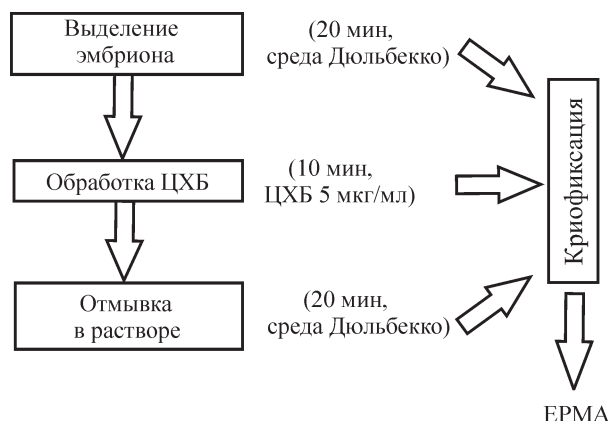


Рис. 1. Схема обработки двухклеточного эмбриона мыши цитохалазином Б и последующей отмывки препарата раствором Дюльбекко.

Последовательно на всех этапах эксперимента часть эмбрионов отбирали для криофиксации с последующей их подготовкой для измерения цитоплазматической концентрации элементов (К и Na) методом электронно-зондового микроанализа (ЕРМА).

Принципы подготовки одиночного эмбриона для электронно-зондового микроанализа (ЕРМА) элементов, растворимых в цитоплазме, описаны нами ранее (Погорелов и др., 2005; Погорелов, Гольдштейн, 2006). Первым и обязательным этапом является криофиксация объекта в жидком пропане (-188°C), охлажденном жидким азотом. Дальнейшая последовательность подготовки полутонких срезов двухклеточного эмбриона мыши для ЕРМА внутриклеточной концентрации элементов (К и Na) представлена в ряде публикаций (Гольдштейн и др., 2004б; Pogorelov et al., 2006). Замороженные образцы дегидратировали в вакууме ($\sim 10^{-5}$ Па) при низкой температуре ($\sim 180^\circ\text{K}$), используя установку МВА 5 (Balzers, Лихтенштейн).

Высушенные эмбрионы заключали в заливочную среду, приготовленную на основе эпоксидной смолы Ерон 812. После полимеризации стеклянном ножом на ультрамикротоме (Riechert, Австрия) получали последовательную серию срезов толщиной 2 мкм. Под световым микроскопом для анализа отбирали несколько срезов, сечение которых прошло в плоскости, расположенной близко к диаметру эмбриона. Для просмотра неокрашенных полутонких (2 мкм) срезов использовали интерференционный микроскоп Peraval Interphako (Zeiss, Германия). Отобранные срезы монтировали на бленду, вырезанную в медной сеточке без подложки. На поверхность подготовленного препарата термическим распылением в вакууме наносили слой углерода (~ 30 нм), используя установку JEE 4В (JEOL, Япония).

Сеточки со срезами помещали на держатель сканирующего электронного микроскопа-микроанализатора JSM-U3 (JEOL, Япония), оснащенного детектором рентгеновского излучения. Характеристическое рентгеновское излучение элементов (K^+ и Na^+), возбуждаемое в образце ускоренными электронами, регистрировали с растра на срезе, который вписывался в контуры бластомера. По интенсивности K_α линии K^+ или Na^+ рассчитывали внутриклеточную концентрацию элементов (Pogorelov et al., 1991, 1994; Погорелов и др., 2005). ЕРМА проводили при ускоряющем напряжении электронов 25 кВ, времени регистрации рентгеновского излучения 40 с и токе зонда

~ 5 нА, что соответствует диаметру зонда ~ 0.1 мкм. Морфологию неокрашенного среза наблюдали в режиме прошедших электронов.

Учитывая количество эмбрионов в группах и трудность в оценке вида распределения полученных результатов, мы использовали непараметрический метод определения достоверности различий. В методах непараметрического анализа аналогом критерия Стьюдента является критерий суммы рангов Манна—Уитни, известный как Т-критерий. Методика применения данного статистического подхода детально описана в литературе (Гланц, 1999). Различия считали достоверными при уровне значимости $P \leq 0.05$.

Результаты

Изображения серии полутонких неокрашенных срезов (2 мкм), полученные в интерференционном световом микроскопе, регистрировали в компьютере с помощью цифровой камеры WAT-505ex (Watec, Япония). На рис. 2 представлена микрофотография группы двухклеточных эмбрионов мыши в плоскости сечения среза.

На отобранном срезе по интенсивности характеристического рентгеновского излучения измеряли цитоплазматическую концентрацию калия и натрия. Препараты анализировали в сканирующем электронном микроскопе-микроанализаторе, в котором морфологию эмбриона наблюдали в режиме прошедших электронов. Характерное изображение анализируемого двухклеточного эмбриона, полученное в электронном микроскопе (срез 2 мкм), приведено на рис. 3.

Результаты ЕРМА цитоплазматической концентрации калия и натрия в бластомере двухклеточного эмбриона мыши суммированы в табл. 1. В эмбрионе сразу после его выделения из яйцевода (контроль) регистрируется высокий уровень цитоплазматического натрия (табл. 1).

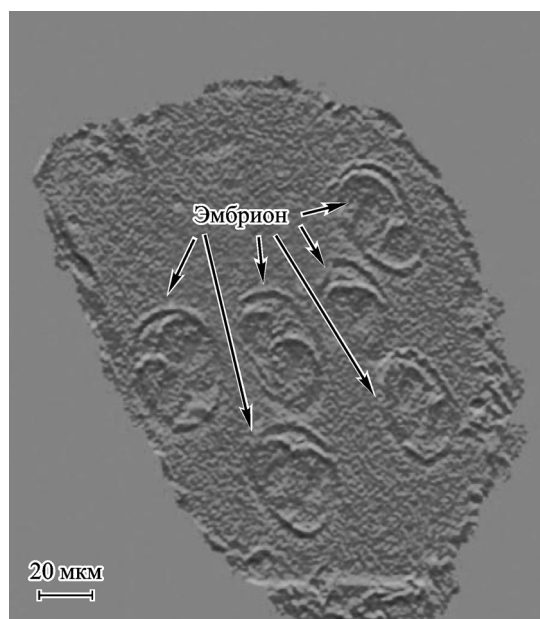


Рис. 2. Фотография группы двухклеточных эмбрионов мыши в G_1/S -фазе, полученная в оптическом микроскопе (режим интерференции) на неокрашенном срезе (2 мкм), плоскость которого прошла близко к диаметральному сечению бластомеров.

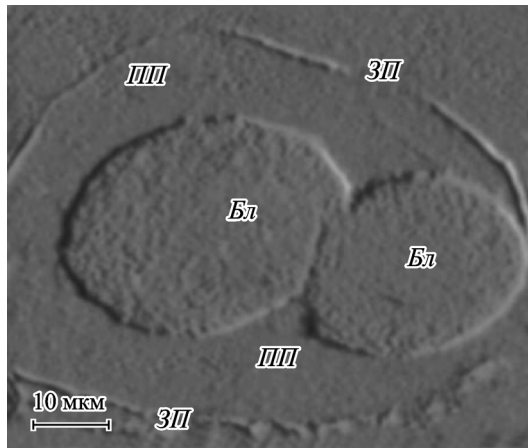


Рис. 3. Изображение двухклеточного эмбриона мыши в G_1/S -фазе на срезе (2 мкм) в сканирующем электронном микроскопе (режим прошедших электронов).

ПП — перивителлиновое пространство, ЗП — зона пеллюцида, Бл — бластомер (эмбриональная клетка).

Следует отметить, что такой феномен характерен для двухклеточного эмбриона мыши (Гольдштейн и др., 2004б; Pogorelov et al., 2006). Инкубация эмбриона в течение 30 мин в среде Дюльбекко не вызвала значимых изменений внутриклеточного содержания элементов (K^+ и Na^+). Достоверное уменьшение концентрации Na^+ регистрируется только после обработки двухклеточного зародыша в среде, содержащей ЦХБ (табл. 1). За последующие 20 мин отмывки препарата в среде Дюльбекко цитоплазматический Na^+/K^+ -баланс эмбриона восстанавливается до контрольного уровня. Возможные механизмы, отвечающие за регистрируемые эффекты, обсуждаются далее.

Обсуждение

Видно (табл. 1), что внутриклеточная концентрация калия в интактном эмбрионе мыши близка по значению к величине, регистрируемой в специализированной клет-

ке, например кардиомиоците или нейроне (Pogorelov et al., 1994; Погорелов и др., 2004б). При этом уровень цитоплазматического натрия в бластомере гораздо выше, чем в соматической клетке. «Натриевый» феномен согласуется с другими данными, полученными для раннего эмбриона амфибий (Slack et al., 1973). В указанной работе приведены кривые изменения внутриклеточной концентрации K^+ и Na^+ в течение раннего эмбриогенеза лягушки. По мере развития Na^+/K^+ -баланс в клетке раннего эмбриона быстро сдвигается в сторону, характерную для специализированной клетки. По-видимому, указанную тенденцию можно рассматривать как самый начальный этап клеточной дифференцировки. Интересно, что суммарное содержание натрия значительно отличается от концентрации Na^+ , которая к тому же со временем остается на постоянном уровне. На этом основании Слэк и соавторы (Slack et al., 1973) предполагают, что в цитоплазме есть пул связанного и свободного натрия. Авторы этой работы рассматривают механизм формирования бластоцеля за счет натрия, депонированного в эмбриональной клетке (Slack et al., 1973). В соответствии с выдвигаемой гипотезой усиление активного транспорта Na^+ во внеклеточное пространство инициирует образование внутренней полости зародыша на стадии ранней бластоцисты. Причиной этого может быть активизация Na^+/K^+ -АТФазы в завершающей фазе раннего эмбриогенеза (Powers, Tupper, 1977; Watson, Kidder, 1988; Van-Wikle, Campione, 1991).

ЦХБ не вызвал прогнозируемого дефицита цитоплазматического калия (табл. 1). Таким образом, если препарат и индуцирует открытие калиевых каналов с последующим выходом иона K из клетки, то этот эффект компенсируется другими механизмами. Уровень внутриклеточного K^+ обусловлен интегративной активностью пассивного и активного транспорта катиона. Отсутствие уменьшения концентрации K^+ в бластомере под действием ЦХБ может указывать на активизацию Na^+/K^+ -АТФазы.

Интересным представляется то, что на фоне действия ЦХБ в цитоплазме эмбриональной клетки наблюдается падение уровня Na^+ (табл. 1), которое направлено против градиента его концентрации. Такой эффект можно получить только за счет работы насоса, что косвенно подтверждает активизацию Na^+/K^+ -АТФазы, направленную на компенсацию выхода из клетки K^+ , обусловленного действием ЦХБ. Гипотетически не следует исключать еще один способ активного транспорта Na^+ посредством Na^+ -АТФазы (Beltowski et al., 2004; Caruso-Neves et al., 2004). Такой механизм, который помимо Na^+/K^+ -АТФазы осуществляет активный транспорт Na^+ , показан для ряда типов специализированных клеток и также может быть вовлечен в систему адаптации раннего эмбриона млекопитающих к травматическому действию ЦХБ.

В используемом протоколе (рис. 1) действие ЦХБ имеет обратимый характер (табл. 1). Другими словами, после отмывки в клетке восстанавливается изначально высокая концентрация натрия, характерная для раннего эмбриона. Механизм обратимого накопления Na^+ требует дальнейшего изучения, так как известный Na^+/H^+ -обмен не показан для зародыша мыши на стадии двухклеточного эмбриона (Baltz et al., 1990, 1993). Возможно, что для компенсации в бластомере потерь Na^+ вовлекается обмен $1Na^+/3Ca^{2+}$ (DiPolo, 1989). Однако учитывая стехиометрию обменника и объем потерь,

Т а б л и ц а 1

Цитоплазматическая концентрация (мМ) калия и натрия в двухклеточном эмбрионе мыши в зависимости от схемы эксперимента

Протокол обработки эмбриона ^а	K	Na	n
Сразу после выделения из яйцевода (контроль)	118	124	16
Инкубация в растворе Дюльбекко, 30 мин	116	120	14
Инкубация в среде Дюльбекко, содержащей 5 мкг/мл ЦХБ, 10 мин	117	64 ^б	12
Отмывка от ЦХБ в растворе Дюльбекко, 20 мин	111	126	12

^а Данные представлены как среднее, где n — количество анализируемых эмбрионов в группе; отклонение измерений по группе не превышало 15% для калия и 20% для натрия. ^б Величина достоверно отличается от контроля при уровне значимости $P \leq 0.05$, оцененном по Т-критерию Манна—Уитни.

Таблица 2

Изменение цитоплазматической концентрации (мМ) калия и натрия в двухклеточном эмбрионе мыши в результате инкубации в среде, содержащей этиленгликоль

Протокол обработки эмбриона ^a	K	Na	n
Сразу после выделения из яйцевода (контроль)	128	116	12
Инкубация в растворе Дюльбекко, 30 мин	122	120	13
Отмывка от этиленгликоля в растворе Дюльбекко, 20 мин	59	65	20

^a Данные рассчитаны по: Гольдштейн и др., 2004б; Pogorelov et al., 2006.

трудно предположить наличие такого экстремально высокого количества кальция в бластомере. Следует отметить, что в схожем по схеме проведения эксперименте с применением этиленгликоля отмывка препарата не привела к восстановлению Na/K -баланса клетки (табл. 2).

Факт регистрации изменения концентрации основных цитоплазматических катионов под действием ЦХБ и этиленгликоля указывает на эффективность ЕРМА как метода контроля за травматическим действием клеточных технологий. Различие в биологических эффектах, индуцированных препаратами, обусловлено разной природой прямого и(или) опосредованного их взаимодействия с системой регуляции ионного гомеостаза эмбриональной клетки.

Завершая обсуждение полученных результатов, следует отметить, что мы не обнаружили в эмбриональной клетке прогнозируемого дефицита калия. Возможно, отсутствие ожидаемого эффекта обусловлено компенсирующим влиянием Na^+/K^+ -АТФазы. Учитывая низкий уровень активного транспорта и дезэнергизацию раннего эмбриона млекопитающих (Houghton et al., 1996; Sturmey, Leese, 2003), для объяснения аномально высокой концентрации натрия в бластомере, по-видимому, было бы целесообразно привлечь положения фазовой теории (Трошин, 1984; Ling, 1992, 2001). В основу данной теории положены экспериментальные факты, свидетельствующие о способности накапливать ионы щелочных металлов (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ и Rb^+) в цитоплазме только за счет абсорбции. Рассматривая действие ЦХБ, исходя из предположения о взаимодействии его молекулы непосредственно с мембраной эмбриональной клетки. Однако нельзя исключить роль других морфологических структур эмбриона, например зоны пеллюциды и перивителлинового пространства (рис. 3), которые могут значительно модифицировать прогнозируемый эффект ЦХБ.

Список литературы

Гланц 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
 Гольдштейн Д. В., Погорелов А. Г., Чайлахян Т. А., Смирнов А. А. 2004а. Изменение внутриклеточной концентрации калия в одноклеточном эмбрионе мыши после энуклеации. Бюл. эксперим. биол. мед. 138 : 275—276.
 Гольдштейн Д. В., Смольянинова Е. И., Погорелов А. Г. 2004б. Анализ калия в бластомере двухклеточного эмбриона

мышы после эквивибрации и отмывки криопротектора. Бюл. эксперим. биол. мед. 138 : 48—49.

Лопина О. Д. 2001. Взаимодействие каталитической субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. Биохимия. 66 : 1389—1400.

Манк М. 1990. Биология развития млекопитающих (методы). М.: Мир. 185 с.

Погорелов А. Г., Гольдштейн Д. В. 2006. Электронно-зондовый микроанализ цитоплазматической концентрации элементов в одиночной клетке культуры и суспензии. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 84—91.

Погорелов А. Г., Гольдштейн Д. В., Чайлахян Т. А., Смирнов А. А. 2004а. Анализ влияния энуклеации на концентрацию калия в цитоплазме одноклеточного эмбриона мыши. Цитология. 46 (10) : 934—935.

Погорелов А. Г., Погорелова В. Н., Хренова Е. В., Дубровкин М. И., Демин И. А. 2004б. Роль «спящих» механизмов в регуляции K/Na -баланса мышечной клетки сердца крысы при гипоксии. Журн. эволюц. биохим. физиол. 40 (4) : 353—358.

Погорелов А. Г., Погорелова В. Н., Хренова Е. В., Кантор Г. М., Гольдштейн Д. В., Аксиров А. М. 2005. Количественный рентгеноспектральный микроанализ биоорганических пленок с помощью кристалл-дифракционного спектрометра. Поверхность. Рентгеновские синхротронные и нейтронные исследования. 2 : 49—54.

Погорелов А. Г., Русаков А. В., Погорелова В. Н. 2006. Цитоплазматический K/Na -баланс в мышечной клетке сердца при кислород-субстратном дефиците у молодых и старых крыс. Биофизика. 51 (5) : 121—128.

Трошин А. С. 1985. Распределение веществ между клеткой и средой. Л.: Наука. 191 с.

Baltz J. M., Biggers J. D., Lechene C. 1990. Apparent absence of Na^+/H^+ antiport activity in the two-cell mouse embryo. Develop. Biol. 138 : 421—429.

Baltz J. M., Biggers J. D., Lechene C. 1993. A novel H^+ permeability dominating pH in the early mouse embryo. Development. 118 : 1353—1361.

Beltowski J., Jamroz-Wisniewska A., Nazar J., Wojcicka G. 2004. Spectrophotometric assay of renal ouabain-resistant Na^+ -ATPase and its regulation by leptin and dietary-induced obesity. Acta biochim. pol. 51 : 1003—1014.

Caruso-Neves C., Vives D., Dantas C., Albino C. M., Fonseca L. M., Lara L. S., Iso M., Lopes A. G. 2004. Ouabain-insensitive Na^+ -ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. Biochim. biophys. acta. 1660 : 93—98.

DiPolo R. 1989. The Na^+ - Ca^{2+} exchange in intact cells. In: Sodium-calcium exchange. Oxford: Oxford Univ. Press. 321.

Goldmann W. H. 2003. Examination of actin polymerization and viscosity by cations and ionic strength when cross-linked by alpha-actin. Cell Biol. Int. 27 : 391—394.

Houghton F. D., Thompson J. G., Kennedy C. J., Leese H. J. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Mol. Reprod. Develop. 44 : 476—485.

Ling G. N. 1992. A revolution in the physiology of the living cell. Malabar, Florida: Krieger Publ. Comp. 378 p.

Ling G. N. 2001. Life at the cell and below-cell level: the hidden history of a fundamental revolution in biology. New York: Pacific Press. 373 p.

Parkinson G. N., Lee M. P. H., Neidle S. 2002. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature. 417 : 876—880.

Pogorelov A., Allachverdov B., Burovina I., Mazay G., Pogorelova V. 1991. Study of potassium deficiency in cardiac muscle: quantitative X-ray microanalysis and cryotechniques. J. Microscopy. 12 : 24—38.

Pogorelov A. G., Katkov I. I., Smolyaninova E. I., Goldshtein D. V. 2006. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol. CryoLetters. 27 : 87—98.

Pogorelov A. G., Pogorelova V., Repin N., Mizin I. 1994. Quantitative electron probe microanalysis with a wavelength dispersive spectrometer. Scanning Microscopy. Suppl. 8 : 101—108.

Powers R. D., Tupper J. T. 1997. Development changes in membrane transport and permeability in the early mouse embryo. *Develop. Biol.* 56 : 306—315.

Slack C., Warner A. E., Warren R. L. 1973. The distribution of sodium and potassium in amphibian during early development. *J. Physiol.* 232 : 297—312.

Sturmei R. G., Leese H. J. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction.* 126 : 197—204.

Taurin S., Seyrantepe V., Orlov S. N., Tremblay T. L., Thibault P., Bennett M. R., Hamet P., Pshezhetsky A. V. 2002. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 91 : 915—922.

VanWinkle L. J., Campione A. L. 1991. Ouabain-sensitive Rb^+ uptake in mouse eggs and preimplantation conceptuses. *Develop. Biol.* 146 : 158—166.

Watson A. J., Kidder G. M. 1988. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na^+/K^+ -ATPase during mouse embryogenesis. *Develop. Biol.* 126 : 80—90.

Yazaki I., Tosti E., Dale B. 1995. Cytoskeletal elementary link calcium-channel activity and the cell-cycle in early sea-urchin embryos. *Development.* 121 : 1827—1831.

Поступила 15 II 2007

CYTOCHALASIN B INDUCED CHANGES IN CYTOPLASMIC Na^+/K^+ BALANCE IN 2-CELL MOUSE EMBRYO

D. V. Goldshtein,^{1–3} V. N. Pogorelova,³ A. G. Pogorelov^{3,4}

¹ Institute of Stem Cell and Cellular Technologies, ² REMETEX Inc., Moscow,

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Moscow Region,

and ⁴ State University at Pushchino, Dept. Biophysics and Biomedicine;

e-mail: Pogorelov@iteb.ru

This work was performed to study changes in intracellular elemental (Na/K) concentrations caused by Cytochalasin B in two-cell mouse embryo using Electron Probe Microanalysis. The presence of Cytochalasin B is required to transfer a somatic cell nuclear into an early embryo cell. The direct effect of this chemical is cytoskeleton transformation, which would be able to cause the increase of potassium channel activity resulting in cytoplasmic Na/K imbalance. In our study Cytochalasin B was shown to decrease the intracellular sodium concentration. The Na/K balance in the cytoplasm of mouse embryos reverted to its intact level after treatment them with Cytochalasin B free Dulbecco's solution. Possible mechanisms responsible for the changes in the intracellular sodium concentration observed in the embryo cells are discussed.

Key words: early embryo, mouse, Cytochalasin B, potassium channel, cytoplasmic Na/K balance, Na^+/K^+ -ATPase, Electron Probe Microanalysis.