

НЕЗАВИСИМАЯ ОТ ПРОТЕИНКИНАЗЫ А РЕГУЛЯЦИЯ КАВЕОЛЯРНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ КАРДИОМИОЦИТОВ, ОПОСРЕДОВАННАЯ G α -БЕЛКОМ

Поступила 22.10.08

В электрофизиологических экспериментах в условиях фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и регистрации активности одиночных каналов внеклеточное приложение 1 мМ QX-314 (производного триэтиллитокаина) полностью и необратимо блокировало натриевую проводимость через каналы поверхностных мембран вентрикулярных кардиомиоцитов крыс. После удаления QX-314 из внеклеточной среды в условиях активации бета-адренорецепторов изопротеренолом (10 мкМ) в присутствии ингибитора протеинкиназы А (ПКА, 22 мкг/мкл) выявлялся только тетродотоксин-чувствительный компонент натриевого тока. При этом натриевые токи, активируемые под влиянием изопротеренола, полностью ингибировались в условиях внутриклеточной аппликации моноклональных антител к кавеолину-3. Данное наблюдение подтверждает предположение о том, что увеличение натриевой проводимости в таких случаях опосредовано активацией натриевых каналов кавеолярных пулов. Полученные результаты указывают на то, что субклеточная локализация каналов Na_v1.5 в кавеолярных мембранных пулах кардиомиоцитов может играть особую функциональную роль в увеличении натриевой проводимости и модуляции потенциалов действия, генерируемых вентрикулярными кардиомиоцитами крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кардиомиоциты, натриевые каналы Na_v1.5, кавеолярный пул, β -адренергическая активация, QX-314.

ВВЕДЕНИЕ

Нейрогуморальный контроль функционирования натриевых каналов Na_v1.5 в кардиомиоцитах, опосредуемый активацией бета-адренорецепторов, является важным регуляторным фактором; особо существенно его действие в условиях стресса и при болезнях сердца. Бета-адренергическая активация воздействует на Na_v1.5-каналы через два основных независимых пути. В обоих случаях действие опосредовано примембранными G α -протеинами, отделяющимися от G $\beta\gamma$ -комплекса в процессе активации упомянутых рецепторов. Согласно общепринятой интерпретации, протеин G α стимулирует аденилатциклазу, которая и активирует протеинкиназу А (ПКА). В свою очередь, ПКА обеспечивает фосфорилирование белков каналов

Na_v1.5, которые содержат в себе группировки серин – треонин (ПКА-зависимый путь). В результате ПКА-опосредованное фосфорилирование Na_v1.5-каналов приводит к увеличению амплитуды и длительности натриевого тока (I_{Na}) через мембрану кардиомиоцитов; возрастание продолжительности этого тока происходит за счет затягивания его спада [1–4]. С возрастанием количества активных натриевых каналов увеличивается скорость проведения потенциалов действия (ПД) при сокращении сердечной мышцы.

В ряде работ было выдвинуто предположение, что функционирование натриевых каналов в вентрикулярных кардиомиоцитах в существенной степени связано с наличием мембранообразующего протеина кавеолина-3 [5, 6], который присутствует в динамических мембранных образованиях – кавеолах. Кавеолы имеются в волокнах скелетных, гладких и сердечных мышц; это мембранные образования, насыщенные холестерином и сфинголипидами. Было показано, что мутации, изменяющие

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: palygin@biph.kiev.ua (О. А. Палыгин).

первичную структуру молекул кавеолина-3, непосредственно модулируют характеристики I_{Na} в кардиомиоцитах. Это, в свою очередь, является важнейшим фактором патогенеза ряда заболеваний, например, так называемого длительного QT-синдрома сердца (LQTS9) и синдрома внезапной младенческой смерти (SIDS, LQTS3-like-syndrom) [7–12]. В связи с данным обстоятельством выяснение фундаментальных механизмов функционирования кавеол кардиомиоцитов и кавеолярных натриевых каналов представляет собой весьма актуальную задачу. Результаты последних исследований показали, что в динамических мембранных кавеолах кардиомиоцитов действительно локализованы натриевые каналы $Na_v1.5$ [5, 13, 14], а также кальциевые каналы L-типа ($Ca_v1.2a$) [5, 10, 15]. В васкулярных кавеолах были обнаружены калиевые каналы $K_v1.5$, однако наличие таких каналов в аналогичных структурах кардиомиоцитов пока четко не доказано [14, 16, 17].

Кавеолы неподвижны относительно плазматической мембраны. Их динамика аналогична таковой нейронных везикул и основывается на регуляции открывания/закрывания внеклеточных пор, определяющих связь между вне- и внутриклеточным пространствами [14]. В нейронных везикулах ответственным за регуляцию данной динамики является комплекс SNARE; белковые же комплексы и механизмы, регулирующие динамику кавеолярных пор, пока неизвестны [9, 19]. Гипотеза о сигнальной роли кавеолина нашла подтверждение в клетках некоторых типов, в которых кавеолярные пулы опосредуют взаимодействия примембранных белковых структур [18, 19]. Известно также, что кавеолы могут участвовать в процессе эндоцитоза или функционировать как транцитозольные везикулы, обеспечивающие перенос крупных молекул [20]. Локализация натриевых каналов $Na_v1.5$ и кавеолярных пулов была выявлена с использованием методик иммунопреципитации, непрямой иммуофлуоресценции и электронной микроскопии [14].

В наших предыдущих работах было показано, что активация бета-адренорецепторов (и, соответственно, белка G_{sa}) может приводить к активации натриевых каналов, ассоциированных с кавеолярным пулом сарколеммы [6]. Как оказалось, такой эффект регистрируется в присутствии ингибитора ПКА. В качестве прямого доказательства эффекта открывания кавеолярных пор может рассматриваться потенциалзависимое увеличение амплитуды I_{Na} в ответ на стимуляцию агонистом

β -адренорецепторов кардиомиоцитов (например, изопротеренолом) в условиях блокирования ПКА-зависимого сигнального пути. С учетом подобных соображений и была выполнена настоящая работа, направленная на выяснение механизмов регуляции кавеолярных натриевых каналов вентрикулярных кардиомиоцитов.

МЕТОДИКА

Изоляция вентрикулярных кардиомиоцитов. Крысам линии Sprague-Dawley (масса 175–200 г) анестезировали с помощью изофлурана. Сердце крысы быстро извлекали и помещали в охлажденный до 0 °С модифицированный раствор Тироде, содержащий в себе 0.2 мМ $CaCl_2$, с добавлением гепарина и инсулина. После закрепления аорты на канюле во влажной камере сердце перфузировали в течение 5 мин при температуре 37 °С с помощью аппарата Лагендорфа модифицированным раствором Тироде, не содержащим в себе кальция, с добавлением альбумина BSA («Sigma», США). После этого раствор заменяли модифицированным бескальциевым раствором Тироде с добавлением 0.33 мг/мл коллагеназы CLS-2 («Worthington», США) и альбумина BSA. Перфузия таким раствором при температуре 37 °С длилась 12 мин. После этого желудочки сердца отделяли и помещали в 25 мл бескальциевого модифицированного раствора Тироде, содержащего в себе коллагеназу. Кусочки ткани желудочков (объем приблизительно 1 мм³) пропускали через пастеровские пипетки; полученную клеточную суспензию отделяли и центрифугировали в растворе с высоким содержанием калия (КВ); в этом растворе ее далее сохраняли на льду (не более 48 ч).

Протокол электрофизиологических экспериментов. Потенциалзависимые I_{Na} отводили с помощью стандартной методики «пэтч-клэмп» в конфигурации «целая клетка» с применением усилителя Axopatch 200B. Аналоговые сигналы оцифровывали с использованием восьмиполосного фильтра Бесселя с частотой среза не менее 5 кГц. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров («VWR», США). Сопротивление таких микроэлектродов варьировало от 0.8 до 1.2 МОм при сопротивлении пипетка–мембрана около 1–5 ГОм. Регистрацию трансмембранных I_{Na} в конфигурации «целая клетка» производили в условиях поддерживаемого потенциала –120 мВ и его изменений от

–110 до + 30 мВ. Компенсация последовательного сопротивления во всех экспериментах составляла не менее 95 %. Токи регистрировали во внеклеточном растворе следующего состава (в миллимолях на 1 л): NaCl – 10, холина хлорид – 130, KCl – 4.5, CaCl₂ – 1.0, MgCl₂ – 2.0, CoCl₂ – 2.0, HEPES – 10.0 и глюкоза – 5.5 (рН доводили до 7.35 путем добавления KOH). Проводимость через кальциевые каналы L-типа блокировалась в результате наличия 2 мМ Co²⁺ во внеклеточном растворе. Внутривнутриклеточный базовый раствор содержал в себе (в миллимолях на 1 л): CsCl – 130, CaCl₂ – 0.5, MgCl₂ – 2, Na₂ATP – 5, GTP – 0.5, EGTA – 5, HEPES – 10 (рН доводили до 7.25 с помощью добавления CsOH). Рассчитанная внутриклеточная концентрация свободных ионов натрия составляла около 5 мМ; соответственно, равновесный потенциал, определенный согласно уравнению Нернста, был равен +17.6 мВ (при 22 °С). Во всех экспериментах действие ПКА на I_{Na} полностью блокировалось за счет добавления 22 мг/мл ингибитора указанного фермента во внутривнутриклеточный раствор.

Для стандартизации данных амплитудные характеристики I_{Na} обычно оценивались путем расчета плотности этого тока – отношения его регистрируемой амплитуды к значению емкости мембраны исследуемого кардиомиоцита. Для отведения активности одиночных каналов использовали стеклянные микроэлектроды (пирекс) с предварительно оплавленным кончиком (сопротивление 1–10 МОм). Это позволяло получать гигаомные контакты с мембраной кардиомиоцита. Для уменьшения емкостных транзиев кончики пипеток покрывали силгардом («WPI», США). Внеклеточный раствор в опытах с регистрацией активности одиночных каналов содержал в себе (в миллимолях на 1 л): KCl – 140, MgCl₂ – 2.0, CoCl₂ – 2.0, EGTA – 5, HEPES – 10.0 и глюкозу – 5.5 (рН доводили до 7.35 путем добавления KOH). Внутривнутриклеточный раствор имел следующий состав (в миллимолях на 1 л): NaCl – 140, CaCl₂ – 2, KCl – 4, MgCl₂ – 2.0, HEPES – 10.0 (рН доводили до 7.35, добавляя CsOH).

Моноклональные антитела к кавеолину-3 (BD; «Transduction Laboratories», США) добавлялись во внутривнутриклеточный раствор в концентрации 0.34 мкМ. Для контроля специфичности антител к кавеолину-3 в некоторых экспериментах были использованы антитела к кавеолину-1 (BD; «Transduction Laboratories», США). Препараты антител не содержали в себе консервантов (таких, как азид натрия и подобные).

Эксперименты в конфигурации «целая клетка» проводили при комнатной температуре (20–23 °С), а эксперименты с регистрацией активности одиночных каналов – при температуре 37 °С.

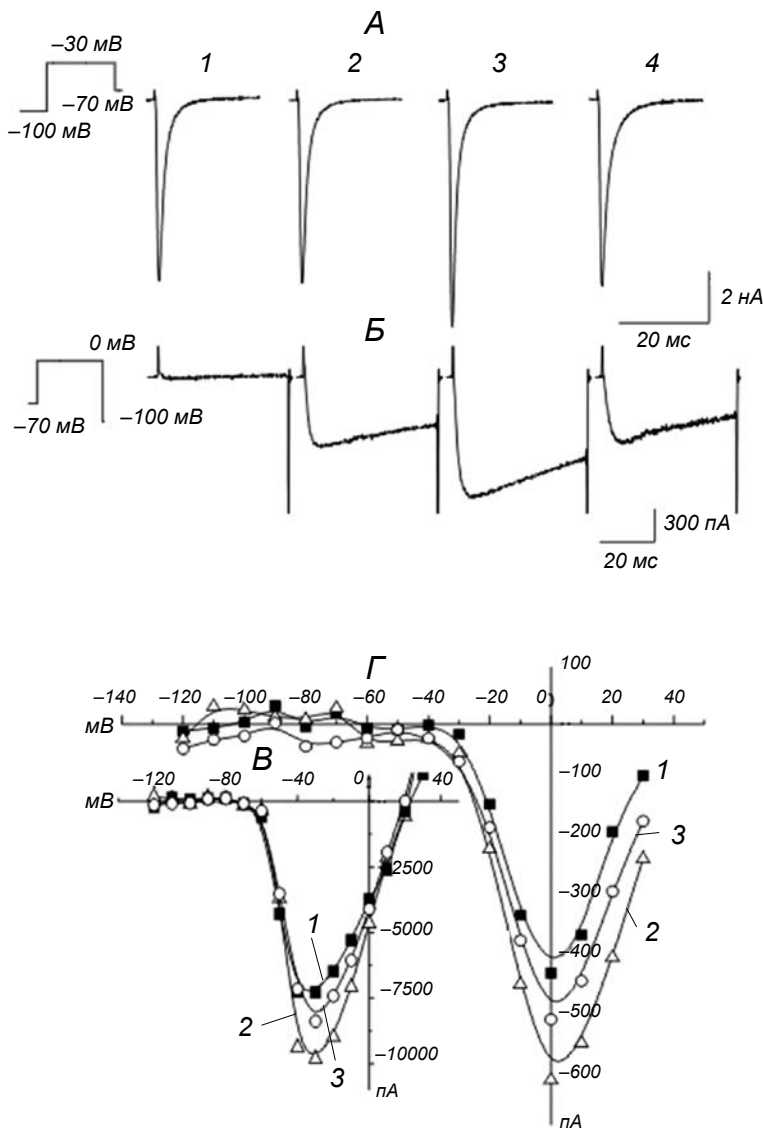
Анализ экспериментальных данных. Регистрация и анализ результатов электрофизиологических опытов выполнялись с помощью программного пакета «pCLAMP 9.0» («Axon Instruments», США); в ходе анализа применялся также программный продукт «OriginPro 7.5» («OriginLab Corp.», США). Для статистической обработки числовых данных использовался дисперсионный анализ (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как уже указывалось, исследования изменений кинетики I_{Na} в изолированных (диссоциированных) вентрикулярных кардиомиоцитах взрослых крыс производились в условиях бета-адренергической стимуляции, пэтч-клэмп-регистрации и в присутствии ингибитора ПКА во внутривнутриклеточном растворе. Под воздействием агониста бета-адренорецепторов изопротеренола в концентрации 10 мкМ амплитуда и пиковое значение плотности I_{Na} увеличивались в среднем на 31 % по сравнению с контролем ($n = 25$) (рис. 1, А; 2).

В ряде экспериментов для выяснения влияния активации бета-адренорецепторов на проводимость через кальциевые каналы ионы Ca²⁺ во внеклеточном растворе после отмывания Co²⁺ заменяли на 5 мМ Ba²⁺. В подобных условиях пиковая плотность бариевого тока (аналога кальциевого тока) возрастала после приложения изопротеренола в среднем на 37 % ($n = 7$; рис. 2). Описанные процедуры позволяли с высокой достоверностью дифференцировать влияния изопротеренола на I_{Na} и кальциевый ток через мембрану кардиомиоцитов. Примеры записей упомянутых токов и регистрации их вольт-амперных характеристик приведены на рис. 1, а протокол смены растворов и результаты статистической обработки – на рис. 2. Необходимо подчеркнуть, что аппликации Co²⁺ и Ba²⁺ не влияли на амплитуду I_{Na} (рис. 1, Б; 2).

Компенсация последовательного сопротивления в опытах на кардиомиоцитах в конфигурации «целая клетка» представляет собой существенную проблему. В связи с этим целесообразным было перейти к регистрации активности одиночных каналов, что позволило бы устранить ошибки, связанные с недостаточно качественной фиксацией потенциа-



Р и с. 1. Бета-адренергическая модуляция токов через натриевые и кальциевые каналы в мембранах кардиомиоцитов крысы.

А, Б – трансмембранные токи в конфигурации «целая клетка» в контроле и при аппликации 10 мкМ изопротеренола. *А* – натриевый ток в условиях добавления во внеклеточный раствор 2 мМ блокатора кальциевых каналов Co^{2+} (1), добавления 5 мМ Va^{2+} после отмывания Co^{2+} (2), при аппликации 10 мкМ изопротеренола в указанных выше условиях (3) и после отмывания изопротеренола (4). Токи вызывались путем приложения деполяризующего импульса, смещающего потенциал до -30 мВ от поддерживаемого потенциала -120 мВ. *Б* – бариевые токи через кальциевые каналы в указанных выше условиях (1–4). Токи вызывались путем приложения деполяризующего импульса, смещающего потенциал до 0 мВ от поддерживаемого потенциала -70 мВ. *В, Г* – вольт-амперные характеристики натриевого (*В*) и бариевого (аналога кальциевого, *Г*) токов. По оси абсцисс – потенциал, мВ; по оси ординат – максимальная амплитуда тока, пА (в данных случаях плотность тока с учетом емкости мембраны кардиомиоцита не рассчитывалась). 1 – контроль; 2 – при аппликации 10 мкМ изопротеренола; 3 – после отмывания.

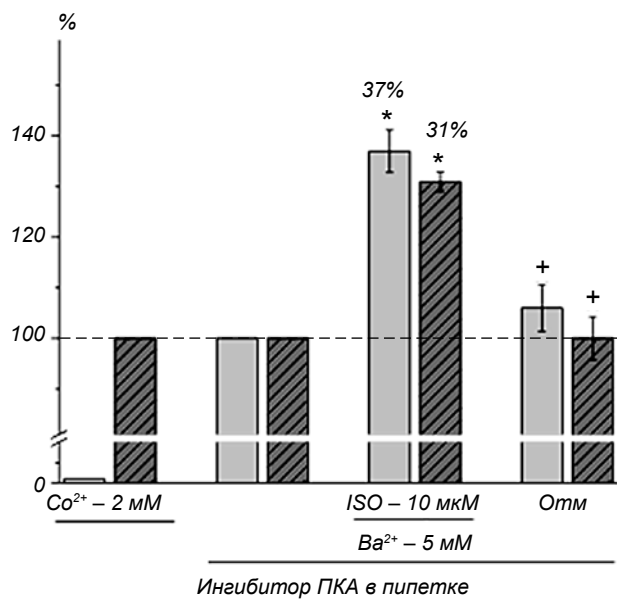
Р и с. 1. Бета-адренергічна модуляція струмів через натрієві та кальцієві канали в мембранах кардіоміоцитів щура.

ла. В рамках данной экспериментальной парадигмы отводились токи через одиночные натриевые каналы, которые возникали в ответ на короткие (10 мс) деполяризующие толчки тока, смещающие потенциал на мембране до -40 мВ от поддерживаемого потенциала -100 мВ. Обычно мы усредняли эффекты срабатывания одиночных натриевых каналов, вызванные изменением мембранного потенциала длительностью 10 мс, по 486–500 реализациям. Добавление изопротеренола в указанной выше концентрации во внеклеточный раствор приводило к существенному обратимому увеличению амплитуд таких усредненных токов через одиночные каналы во всех экспериментах ($n = 10$) (рис. 3).

Для дальнейшего исследования природы натриевых каналов кавеол некавеолярные натриевые каналы поверхностной мембраны были фармаколо-

гически изолированы от каналов, локализованных в кавеолярных пулах. Для этого было использовано производное местного анестетика лидокаина QX-314 [21]. Молекулы данного блокатора натриевых каналов обладают постоянным зарядом и неспособны проходить через клеточную мембрану. Натриевые каналы клеток сердечной мышцы блокируются при внеклеточной аппликации QX-314, тогда как натриевые каналы в мембранах нейронов ингибируются в условиях внутриклеточного приложения этого агента [21, 22]. Характерно, что для данного вещества свойственна длительная кинетика диссоциации (время половинного восстановления из заблокированного состояния превышает 1.5 ч).

Рис. 4 иллюстрирует изменения нормированных амплитуд I_{Na} в двух кардиомиоцитах в присут-



Р и с. 2. Диаграммы среднегрупповых значений нормированных плотностей (%) натриевого и бариевого токов (заштрихованные и светлые столбики соответственно) через мембрану кардиомиоцитов.

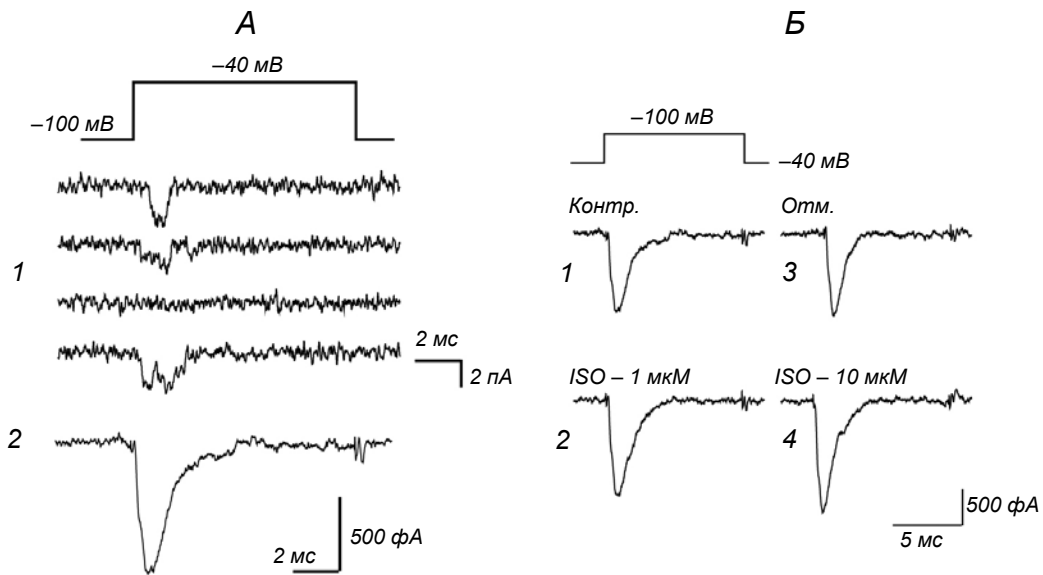
За 100 % приняты плотности токов в контрольных условиях. Под диаграммами приведена схема, иллюстрирующая наличие веществ-анализаторов во внеклеточной среде (Co²⁺, изопротеренол – ISO и Ba²⁺) и ингибитора протеинкиназы А (ПКА) в пипетке, а также указаны их концентрации. Количество наблюдений для натриевого тока $n = 25$, для бариевого – $n = 7$. Звездочками отмечены случаи достоверных ($P < 0.05$) отличий средних плотностей токов от контрольных значений, крестиками – от значений при аппликации ISO.

Р и с. 2. Діаграми середньогрупових значень нормованих щільностей (%) натрієвого та барієвого струмів (заштриговані та світлі стовпчики відповідно) через мембрану кардіоміоцитів.

ствии ПКА во внутриклеточном растворе во время аппликации QX-314 в концентрации 1.0 мМ, что приводило к блокированию упомянутого тока. Результаты данного эксперимента показывают, что внеклеточная аппликация использованного блокатора натриевых каналов обуславливала практически полное блокирование I_{Na} через 8–10 мин после начала такой аппликации; отмывание от QX-314 в течение 20 мин не приводило к какому-либо восстановлению I_{Na} , возникавших в ответ на прикладываемую деполяризацию. Если же производилась стимуляция бета-адренорецепторов в условиях приложения 10 мкМ изопротеренола после 15-минутного периода отмывания QX-314, происходило

частичное восстановление амплитуды I_{Na} , в среднем до 24 % исходного значения ($n = 10$; рис. 4). Интервалы в ходе наблюдения изменений пиковой амплитуды I_{Na} (пробелы на диаграмме) были использованы для измерения вольт-амперных характеристик исследуемых токов. Некоторые различия в скорости блокирования натриевых каналов под действием QX-314 в разных экспериментах были, видимо, обусловлены флуктуациями скорости потока раствора в регистрационной камере. Время полного блокирования I_{Na} при поддерживаемых потенциалах от -110 до -70 мВ и деполяризации до -40 мВ в условиях стимуляции с частотой 1 с^{-1} было примерно постоянным (как уже указывалось, порядка 8–10 мин). Величина токов, вызываемых в условиях приложения изопротеренола (рис. 4), достаточно хорошо согласовывалась с нашими описанными выше данными, полученными в стандартных экспериментах на целой клетке.

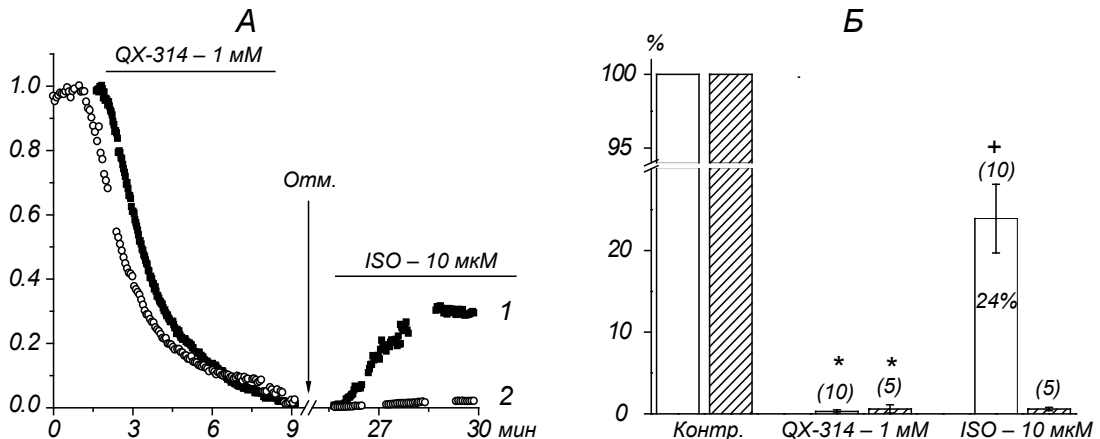
Пропранолол (антагонист β -адренорецепторов) и антитела к кавеолину-3 были использованы в контрольных экспериментах. Частичное восстановление амплитуды I_{Na} в условиях приложения изопротеренола после блокирования β -адренорецепторов могло бы быть вызвано изменением аффинности QX-314 по отношению к натриевым каналам. Для экспериментальной проверки данного предположения мы использовали антитела к кавеолину-3, которые, как было установлено, блокируют кавеолинзависимый ток. На рис. 4, А график 2 показывает изменение амплитуды I_{Na} в присутствии антител к кавеолину-3 в условиях, аналогичных контрольным (график 1; следует упомянуть, что регистрации 1 и 2 были получены на разных клетках). Итоговая статистика результатов данных экспериментов иллюстрируется рис. 4, Б. В условиях аппликации 10 мкМ изопротеренола и присутствия антител к кавеолину-3 во внутриклеточном растворе I_{Na} не появлялся. Следовательно, частичное, но достаточно существенное восстановление этих токов было опосредовано задействованием кавеолярных каналов и не вызывалось непосредственно отмыванием блокатора QX-314. Данный результат подтверждает гипотезу об увеличении поверхностной плотности натриевых каналов в кардиомиоцитах за счет вовлечения кавеолярных пулов таких каналов. Следует упомянуть, что изоляция кавеолярных кальциевых или калиевых каналов с применением аналогичного подхода пока невозможна по причине отсутствия ингибиторов, необратимо блокирующих некавеолярные каналы.



Р и с. 3. Модуляция токов через одиночные натриевые каналы в мембране кардиомиоцитов при активации бета-адренорецепторов.

А – записи токов через одиночный потенциалуправляемый натриевый канал, которые возникали в ответ на приложение депполяризующего импульса, смещающего потенциал до -40 мВ от поддерживаемого уровня -100 мВ (1), и усредненный ток через одиночный натриевый канал в ответ на смещение потенциала длительностью 10 мс (по данным примерно 500 реализаций; 2). *Б* – обратимое увеличение амплитуды усредненных токов через одиночные натриевые каналы (по данным 486–500 реализаций) при аппликации 1 мкМ изопротеренола – *ISO* (2) по сравнению с таковой в контроле – *Контр.* (1) и аналогичный эффект 10 мкМ *ISO* (4) после отмывания – *Отм.* (3).

Р и с. 3. Модуляція струмів через поодинокі натрієві канали в мембрані кардіоміоцитів при активації бета-адренорецепторів.



Р и с. 4. Влияние антител к кавеолину-3 на чувствительный к изопротеренолу (*ISO*) натриевый ток после полного блокирования натриевой проводимости через плазматическую мембрану вентрикулярных кардиомиоцитов крысы, обусловленного аппликацией *QX-314*.

А – временное течение уменьшения нормированной пиковой амплитуды натриевого тока в результате аппликации 1 мМ *QX-314* и частичное восстановление этого тока после отмывания (*Отм.*) от блокатора под действием 10 мкМ *ISO* (1); показано также отсутствие подобного восстановления под действием *ISO* в условиях дополнительной внутриклеточной аппликации антитела к кавеолину-3 (2). *Б* – диаграмма средних нормированных значений амплитуды натриевого тока в контроле (*Контр.*), при аппликации *QX-314* и аппликации *ISO* после отмывания от блокатора в условиях дополнительной аппликации антитела к кавеолину-3 и без такой аппликации (заштрихованные и светлые столбики соответственно). Количество наблюдений указано в скобках над столбиками; звездочками отмечены случаи достоверных ($P < 0.05$) отличий от контрольных значений, крестиками – отличий значений в условиях действия *ISO* от значений в условиях аппликации *QX-314*.

Р и с. 4. Вплив антитіл до кавеоліну-3 на чутливий до ізопротеренолу (*ISO*) натрієвий струм після повного блокування натрієвої провідності через плазматичну мембрану вентрикулярних кардіоміоцитів щура, зумовленого аплікацією *QX-314*.

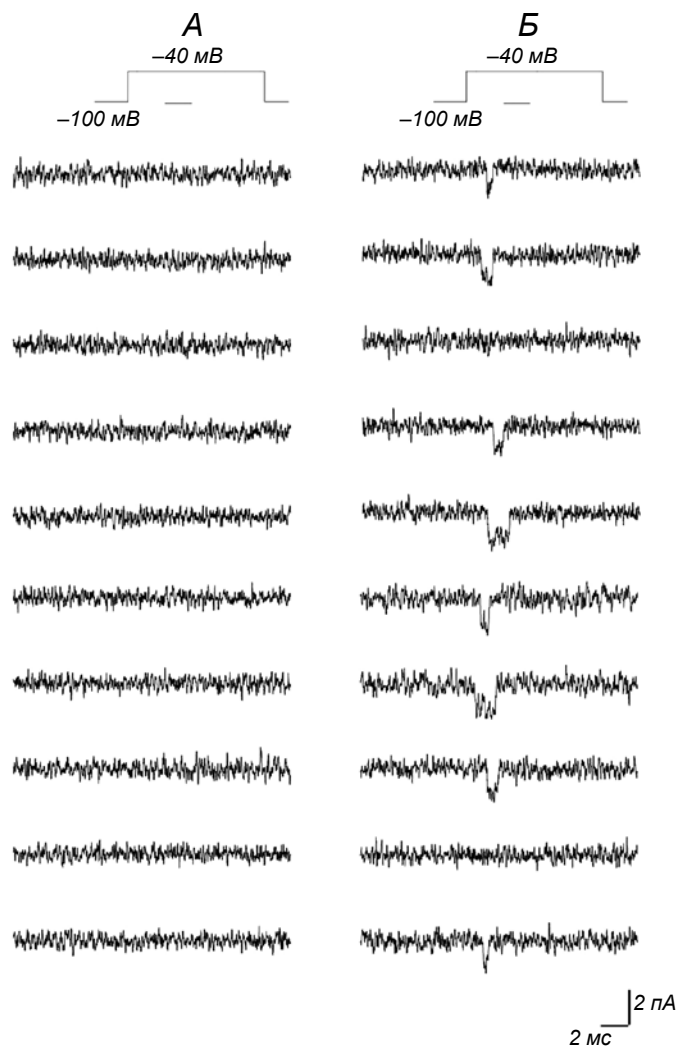


Рис. 5. Натриевые токи через одиночные каналы вентрикулярных кардиомиоцитов. *А* – отсутствие токов через одиночный канал в условиях блокирования натриевой проводимости через плазматическую мембрану в результате аппликации QX-314 и приложения деполяризующего тест-импульса. *Б* – токи через кавеоларный канал после отмывания QX-314 и аппликации 10 мкМ изопротеренола.

Рис. 5. Натрієві струми через поодинокі канали вентрикулярних кардіоміоцитів.

Далее в наших исследованиях природы кавеоларных пулов мы применяли блокатор QX-314 и использовали технику регистрации активности одиночных натриевых каналов. Генерация потенциалов действия и инициация сокращений изолированных с помощью ферментативной обработки вентрикулярных кардиомиоцитов взрослых крыс обеспечивались путем стимуляции с частотой 1 с⁻¹

через пару электродов, находящихся во внеклеточном растворе («полевая» стимуляция). Подбором параметров стимуляции достигался режим, при котором начиналось синхронизированное сокращение клеток, после чего интенсивность тока стимуляции увеличивалась на 20 %. Сокращения клеток (и, соответственно, активация натриевых каналов мембраны кардиомиоцитов) инициировались на протяжении как минимум 10 мин в присутствии 1 мМ QX-314; затем клетки отмывались в течение 5 мин в растворе, не содержащем данного блокатора. В этих условиях QX-314 блокировал все мембранные натриевые каналы, но не препятствовал активации кавеоларных натриевых каналов, обусловленной внеклеточной аппликацией изопротеренола или внутриклеточной – Gsα-протеина. Именно в данной конфигурации проводилась регистрация активности одиночных каналов.

Результаты подобного эксперимента представлены на рис. 5. Клетка подвергалась «полевой» стимуляции в присутствии 1 мМ QX-314 в течение 10 мин; после отмывания блокатора устанавливались условия фиксации потенциала на участке мембраны под отверстием пипетки. На рис. 5, *А* приведен пример регистрации активности одиночных натриевых каналов в таких условиях (фльтрация с частотой среза 5 кГц). Деполяризующий импульс относительно поддерживаемого потенциала -100 до уровня -40 мВ длился 10 мс (протокол показан на вставке сверху). Во всех контрольных записях открывания одиночных каналов не наблюдалось (рис. 5, *А*; показаны 10 пробегов из 60). Данный результат полностью соответствует данным, ранее полученным на целой клетке, когда QX-314 необратимо блокировал все мембранные натриевые каналы. На *Б* показаны аналогичные отведения от участка мембраны при идентичном протоколе стимуляции, но после добавления во внеклеточный раствор 10 мкМ изопротеренола. Как видно, приложение деполяризующего импульса в большинстве случаев вызывало возникновение отчетливых токов через исследуемый участок мембраны. В подобных условиях количество нулевых ответов (когда токи не возникали) составляло порядка 20 % (в данном конкретном случае 14 из 72). Таким образом, можно полагать, что нам удалось выделить и зарегистрировать «чистый» компонент кавеоларного I_{Na} через одиночные каналы. Использование подобной методики в будущем может дать достаточно подробные сведения о природе кавеоларных

натриевых каналов (об их количестве, проводимости, механизмах действия и др.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Натриевые каналы $Na_v 1.5$ в вентрикулярных кардиомиоцитах сердца присутствуют не только в плазматической мембране таких клеток, но и в динамических внутриклеточных мембранных образованиях – пулах, называемых кавеолами. Встраивание кавеол в поверхностную мембрану и последующее их открывание во внеклеточное пространство существенно влияют на функциональные свойства резидентных потенциалуправляемых натриевых каналов. В кардиомиоцитах динамическое открывание кавеоларных пулов может быть модулировано приложением агониста β -адренорецепторов, инициирующего взаимодействие примембранных субъединиц G-белков G_{α} и кавеолина-3. Бета-адренергическая регуляция управляет процессами перехода встроенных в мембрану кавеоларных пулов из закрытого состояния в открытое. Субпопуляция каналов $Na_v 1.5$, локализованных в кавеоларном пуле вентрикулярных кардиомиоцитов крысы, представляет собой неотъемлемую часть сигнального комплекса, прямо и непосредственно регулируемого β -адренергическими влияниями. Такой регуляторный путь опосредован G_{α} -белком, независим от ПККА, определяется процессом взаимодействия протеина G_{α} с мембранообразующим протеином кавеолином-3 и способен эффективно обеспечить быстрое увеличение поверхностной плотности каналов в плазматических мембранах вентрикулярных клеток сердца.

В функциональном аспекте кавеоларные пулы – это плотно упакованные сигнальные комплексы, посредством которых сигнальные протеины взаимодействуют с молекулами кавеоларных протеинов или внеклеточно ориентированными молекулами кавеоларных липидов. В сердечной мышце взаимосвязь ряда сигнальных путей в существенной степени обеспечивается именно кавеоларными пулами. Размещение сигнальных молекул в кавеоле и/или их диффузия из кавеолы определяют указанную функцию данных пулов.

В контексте наших экспериментов кавеоларные комплексы рассматриваются как носители функциональных потенциалуправляемых натриевых каналов. Как уже упоминалось, активация этих каналов опосредована сложным механизмом взаимодей-

ствия протеина G_{α} с кавеолином-3; последний, в свою очередь, определяет состояние и функционирование кавеоларных пор. Результаты нашей работы подтверждают гипотезу о функциональном взаимодействии протеин G_{α} – кавеолин-3, в результате чего происходят открывание кавеоларных пулов и возрастание натриевой проводимости за счет увеличения количества (плотности) активных натриевых каналов в плазматической мембране.

В ряде исследований было показано, что экспрессия кавеолина-3 явно повышена в условиях различных видов сердечной гипертрофии, сопряженных с нарушением работы натриевых каналов. Ключевой фактор, определяющий сигнальную роль кавеоларного пула – собственно механизм открывания кавеоларных пор, – пока неизвестен. В закрытых кавеолах каналы и рецепторы, локализованные в кавеоларном пуле, практически не функционируют. Это обуславливает электрическую изоляцию кавеоларного пространства от внеклеточной среды и невозможность воздействия лигандов на внутрикавеоларные рецепторы. Данные нашего исследования свидетельствуют о потенциально важной роли ПККА-независимого пути открывания кавеоларных пулов посредством стимуляции бета-адренорецепторов. Этот процесс способен приводить к резкому увеличению натриевой проводимости через плазматическую мембрану кардиомиоцитов. Вопросы о функциональной роли изменений состояния кавеоларного пула натриевых каналов в условиях нормы и патологии заслуживают серьезного внимания и требуют дальнейшего изучения.

О. О. Палигин¹

НЕЗАЛЕЖНА ВІД ПРОТЕЇНКИНАЗИ А РЕГУЛЯЦІЯ
КАВЕОЛЯРНИХ НАТРІЄВИХ КАНАЛІВ
КАРДІОМІОЦИТІВ, ОПОСЕРЕДКОВАНА G_{α} -БІЛКОМ

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
Київ (Україна).

Резюме

В електрофізіологічних експериментах в умовах фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та реєстрації активності поодиноких каналів позаклітинне прикладання 1 мМ QX-314 (похідного триетиллідокаїну) повністю та необоротно блокувало натрієву провідність через канали поверхневих мембран вентрикулярних кардіоміоцитів щура. Після видалення QX-314 із позаклітинного середовища в умовах активації бета-адренорецепторів ізопротеренолом

(10 мкМ) у присутності інгібітора протеїнкінази А (ПКА, 22 мкг/мкл) виявлявся тільки тетродотоксинчутливий компонент натрієвого струму. При цьому натрієві струми, активовані під впливом ізопротеренолу, повністю інгібувалися в умовах позаклітинної аплікації моноклональних антитіл до кавеоліну-3. Дане спостереження підтверджує припущення про те, що збільшення натрієвої провідності в таких випадках опосередковано активацією натрієвих каналів кавеоларних пулів. Отримані результати вказують на те, що субклітинна локалізація каналів $\text{Na}_v1.5$ у кавеоларних мембранних пулах кардіоміоцитів відіграє особливу функціональну роль у збільшенні натрієвої провідності та модуляції потенціалів дії, генерованих венетрикулярними кардіоміоцитами щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. Lu, H. C. Lee, J. A. Kabat, and E. F. Shibata, "Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit," *J. Physiol.*, **518**, Part 2, 371-384 (1999).
2. J. J. Matsuda, H. Lee, and E. F. Shibata, "Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation," *Circ. Res.*, **70**, 199-207 (1992).
3. W. Schreibmayer, "Isoform diversity and modulation of sodium channels by protein kinases," *Cell Physiol. Biochem.*, **9**, 187-200 (1999).
4. K. Ono, H. A. Fozzard, and D. A. Hanck, "Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics," *Circ. Res.*, **72**, 807-815 (1993).
5. T. L. Yarbrough, T. Lu, H. C. Lee, and E. F. Shibata, "Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude," *Circ. Res.*, **90**, 443-449 (2002).
6. O. A. Palygin, J. M. Pettus, and E. F. Shibata, "Regulation of caveolar cardiac sodium current by a single G α histidine residue," *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, **294**, H1693-H1699 (2008).
7. R. Cagliani, N. Bresolin, A. Prella, et al., "A CAV3 microdeletion differentially affects skeletal muscle and myocardium," *Neurology*, **61**, 1513-1519 (2003).
8. P. F. de M. Vainzof, A. L. Bernardino, E. McNally, et al., "Mutations in the caveolin-3 gene: When are they pathogenic?" *Am. J. Med. Gen.*, **99**, 303-307 (2001).
9. R. Hnasko and M. P. Lisanti, "The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease," *Mol. Interv.*, **3**, 445-464 (2003).
10. A. Maguy, T. E. Hebert, and S. Nattel, "Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function," *Cardiovascul. Res.*, **69**, 798-807 (2006).
11. D. S. Park, S. E. Woodman, W. Schubert, et al., "Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype," *Am. J. Pathol.*, **160**, 2207-2217 (2002).
12. M. Vatta, M. J. Ackerman, B. Ye, et al., "Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome," *Circulation*, **114**, 2104-2112 (2006).
13. D. R. Scriven, A. Klimek, P. Asghari, et al., "Caveolin-3 is adjacent to a group of extradyadic ryanodine receptors," *Biophys. J.*, **89**, 1893-1901 (2005).
14. E. F. Shibata, T. L. Brown, Z. W. Washburn, et al., "Autonomic regulation of voltage-gated cardiac ion channels," *J. Cardiovascul. Electrophysiol.*, **17**, Suppl. 1, S34-S42 (2006).
15. R. C. Balijepalli, J. D. Foell, D. D. Hall, et al., "Localization of cardiac L-type Ca^{2+} channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7500-7505 (2006).
16. J. Eldstrom, D. R. Van Wagoner, E. D. Moore, and D. Fedida, "Localization of Kv1.5 channels in rat and canine myocyte sarcolemma," *FEBS Lett.*, **580**, 6039-6046 (2006).
17. E. J. Folco, G. X. Liu, and G. Koren, "Caveolin-3 and SAP97 form a scaffolding protein complex that regulates the voltage-gated potassium channel Kv1.5," *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, **287**, H681-H690 (2004).
18. A. W. Cohen, R. Hnasko, W. Schubert, and M. P. Lisanti, "Role of caveolae and caveolins in health and disease," *Physiol Rev.*, **84**, 1341-1379 (2004).
19. R. S. Ostrom and P. A. Insel, "The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology," *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 235-245 (2004).
20. R. G. Parton and K. Simons, "The multiple faces of caveolae," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185-194 (2007).
21. L. A. Alpert, H. A. Fozzard, D. A. Hanck, and J. C. Makielski, "Is there a second external lidocaine binding site on mammalian cardiac cells?" *Am. J. Physiol.*, **257**, H79-H84 (1989).
22. Y. Qu, J. Rogers, T. Tanada, et al., "Molecular determinants of drug access to the receptor site for antiarrhythmic drugs in the cardiac Na^+ channel," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11839-11843 (1995).