

APŽVALGINIS STRAIPSNIS

Širdies L-tipo Ca^{2+} kanalai: struktūra ir reguliacija*

Rimantas Treinys, Jonas Jurevičius

Kauno medicinos universiteto Kardiologijos instituto Membranų biofizikos laboratorija

Raktažodžiai: Ca^{2+} kanalai, kinazės, fosforilinimas, inaktyvacija, fasilitacija.

Santrauka. Šiame apžvalginiame straipsnyje analizuojama įtampos valdomų širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų struktūra bei jų reguliacijos mechanizmai. Širdies L-tipo Ca^{2+} kanalai sudaryti iš keturių skirtingų baltyminių subvienetų, tarp kurių svarbiausias yra kanalo porą suformuojantis subvienetas α_1 . Širdies ląstelių L-tipo Ca^{2+} kanalai yra pagrindinis Ca^{2+} jonų patekimo kelias iš ląstelės išorės į citoplazmą ir yra labai svarbi širdies Ca^{2+} jonų apykaitą reguliuojanti sistema. Nuo šių kanalų aktyvumo priklauso sarkoplazminio tinklo RyR2 kanalų aktyvumas ir širdies raumens susitraukimo jėga, kartu ir širdies darbas. Vienas svarbiausių L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumo reguliavimo būdų yra kanalą sudarančių baltymų fosforilinimas įvairiomis kinazėmis. L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumas taip pat priklauso nuo Ca^{2+} jonų koncentracijos citoplazmoje. Širdies ląstelėms būdinga Ca^{2+} srovės fasilitacija ir šis procesas priklauso nuo L-tipo Ca^{2+} kanalų fosforilinimo bei Ca^{2+} jonų koncentracijos citoplazmoje. L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliacijos sutrikimai ir ląstelinės Ca^{2+} jonų apykaitos pokyčiai yra tiesiogiai susiję su širdies ligomis, lemia gyvenimo kokybę bei trukmę.

Įtampos valdomi Ca^{2+} jonų kanalai

Įtampos valdomus Ca^{2+} jonų kanalus 1953 m. pirmą kartą identifiko P. Fatt ir B. Katz (1). Vėliau šiuos kanalus intensyviai tyrinėjo ir jų skirstymą į skirtingus tipus pasiūlė S. Hagiwara ir kt. (2). Remiantis įtampos valdomų Ca^{2+} kanalų elektrofiziologinėmis savybėmis, jie buvo suskirstyti į dvi pagrindines klases: sužadinamus esant žemam membraniniam potencialui (angl. *low-voltage activated*) ir sužadinamus esant aukštam membraniniam potencialui (angl. *high-voltage activated*). Pagal įtampos valdomų Ca^{2+} jonų kanalų farmakologines ir biofizikines savybes jie suskirstyti į keletą funkcinį kanalų tipų ir pavadinti T, L, N, P/Q ir R Ca^{2+} kanalais. Žemo potencialo sužadinamų kanalų klasei priklauso tik T-tipo Ca^{2+} kanalai, kurie atsidaro esant nedidelei membranios depoliarizacijai ir greitai inaktyvinasi. R tipo Ca^{2+} kanalai kartais dar vadinami vidutinio potencialo sužadinamais Ca^{2+} kanalais (angl. *intermediate-voltage activated*). Ca^{2+} kanalai į atskirus tipus suskirstyti atsižvelgus į jų sužadinimo slenkstį, laidumą, inaktyvacijos priklausomybę nuo potencialo ir laiko, selektyvumą kitiems divalentiems katijonams, kanalo valdymą, atviros ir uždaros būsenos trukmę, farmakolo-

gines kanalo savybes (3, 4).

L-tipo Ca^{2+} kanalai (angl. *Long lasting*) literatūroje dažnai vadinami dihidropiridinų receptoriais (arba DHPR). Jie yra jautrūs įvairiems 1,4-dihidropiridinams, kurie blokuoja (nifedipinas, nikardipinas) arba didina (Bay K8644) Ca^{2+} srovę per L-tipo Ca^{2+} kanalus (4). Šie aukšto potencialo sužadinami kanalai paplitę įvairiuose audiniuose: griaučių raumenyse, širdyje, smegenyse, endokrininėse ląstelėse, neuronuose ir kt. Jiems būdingas gana didelis laidumas (nuo 11 iki 25 pS) ir lėta nuo laiko ir įtampos priklausoma inaktyvacija (~500 ms). L-tipo Ca^{2+} kanalų įvairovė yra gana didelė ir toje pačioje ląstelėje gali būti ekspresuojami skirtingi L-tipo Ca^{2+} kanalai. Šių kanalų funkcinės savybės širdyje, sekretuojančiose ląstelėse ir neuronuose yra gana panašios, o skersaruožių raumenų L-tipo Ca^{2+} kanalai, kurių laidumas yra nedidelis (~11 pS), savo savybėmis gana smarkiai skiriasi (3).

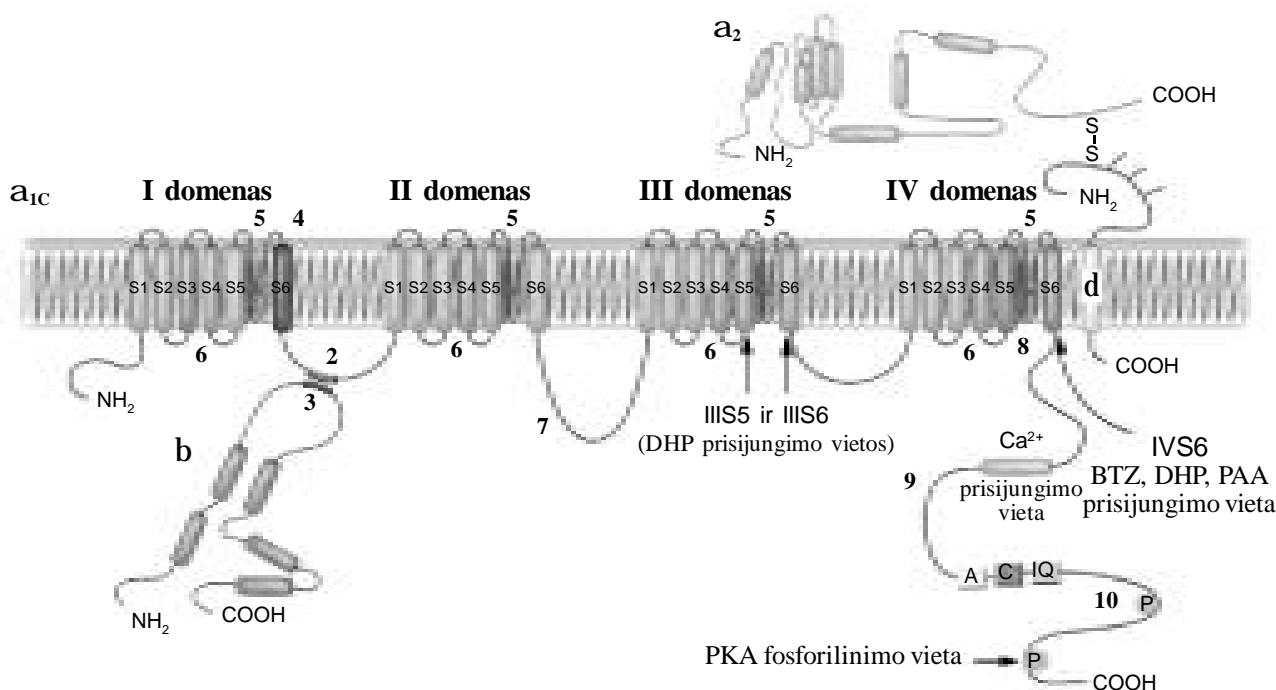
L-tipo Ca^{2+} kanalų struktūra

Širdies L-tipo Ca^{2+} kanalai sudaryti iš keturių polipeptidinių subvienetų: α_1 , β , α_2/δ ir sudaro heterotetramerinį kompleksą, kurio molekulinė masė yra apie 400 kDa (pav.). Griaučių raumenų ir smegenų

Ca^{2+} kanalų sudėtyje yra penktasis subvienetas (γ), tačiau širdyje jis neekspresuojamas (4–6). α_1 polipeptidas yra hidrofobiškas ir įsitvirtina ląstelės membranoje, β subvienetas išsidėsto ląstelės viduje. δ subvienetas yra įsitvirtinęs ląstelės membranoje, šį baltymą sudaro vienas transmembraninis segmentas, trumpa viduląstelinė seka ir didelė ekstraląstelinė dalis, kuri yra glikozilinama. α_2 yra ekstraląstelinis Ca^{2+} kanalo polipeptidinys subvienetas. L-tipo Ca^{2+} kanalo α_2 ir δ subvienetai tarpusavyje yra tampriai surišti disulfidinėmis jungtimis (6, 7) (pav.).

Nustatyta, kad α_1 subvienetas yra svarbiausias polipeptidas iš visų Ca^{2+} kanalų formuojančių baltymų, jis suformuoja jonus praleidžiančią kanalo porą. α_1 subvienetą sudaro keturi homologiniai domenai (I–IV), kurių kiekvienas susideda iš šešių transmembra-

ninių segmentų (S1–S6) (pav.). α_1 subvienetas užtikrina nuo potencialo priklausomą Ca^{2+} kanalų atsida-rymą (S4 segmente esančios teigiamai įkrautos arginino ir lizino aminorūgščių liekanos yra įtampos sensorius) ir kanalo selektyvumą kalcio jonams. Šis α_1 subvienetas turi specifines receptorines vietas, kuriose prisijungia Ca^{2+} kanalų blokatoriai (1,4-dihidropiridiniai, fenilalkilaminai ir benzotiazepinai) (4, 6). α_1 subvieneto viduląstelinėje dalyje yra išsidėsčiusios sritys, vadinamos L ir K domenais, kurios dalyvauja nuo Ca^{2+} priklausomoje kanalo inaktyvacijoje tiek kaip baltymo kalmodulino (CaM) prisijungimo vieta, tiek kaip Ca^{2+} sensorius (6, 8). Šiuo metu nustatyta mažiausiai 10 skirtingų genų, koduojančių L-tipo Ca^{2+} kanalo α_1 subvienetą, tačiau širdies raumenyje gausiai ekspresuojama tik α_{1C} ($\text{Ca}_v1.2$) izoforma (6).



Pav. L-tipo Ca^{2+} kanalo struktūra

α_{1C} subvienetas suformuoja kanalo porą, jį sudaro keturi homologiniai domenai (I–IV), kurių kiekvienas sudarytas iš šešių transmembraninių segmentų (S1–S6). α_2 subvienetas yra ekstraląstelinis, δ subvienetas sudarytas iš transmembraninio segmento, viduląstelinio galo ir išorinės grandinės, kuri jungiasi su α_2 disulfidinėmis jungtimis. Ca^{2+} kanalo β subvienetas išsidėsto ląstelės viduje. γ subvienetas širdyje neekspresuojamas ir paveikslu nepavaizduotas.

1 – nuo įtampos priklausomą aktyvaciją reguliuojanti seka; 2 – AID (angl. *a interaction domain*) – α subvieneto sąveikos vieta su β subvienetu; 3 – BID (angl. *b interaction domain*) β subvieneto sąveikos su α subvienetu vieta; 4 – nuo įtampos priklausomos inaktyvacijos regionas (IS6 ir gretimos sekos); 5 – jonų selektyvumą lemiantis kanalo poros regionas (S5–S6); 6 – įtampos sensorius (teigiamai įkrauti segmentai) – IS4, IIS4, IIIS4, IVS4; 7 – elektromechaninio ryšio vieta; 8 – nuo dirginimo dažnio priklausomo blokavimo zona; 9 – nuo Ca^{2+} priklausomoje inaktyvacijoje dalyvaujanti seka; 10 – CaMKII fosforilinimo vieta (lemia nuo fosforilinimo priklausomą fasilitaciją); DHP – 1,4-dihidropiridiniai, BTZ – benzotiazepinai, PAA – fenilalkilaminai. (Modifikuota pagal Bodi I. et al. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. J Clin Invest 2005;115:3306-17).

Šiuo metu aprašytos keturios skirtingos Ca^{2+} kanalo β subvieneto izoformos (β_1 – β_4), o širdyje yra išreikšta β_2 izoforma (6). β subvienetas dalyvauja α_1 subvieneto ekspresijoje. Jis atlieka šaperono vaidmenį pernešant pastarąjį subvienetą iš sarkoplazminio/endoplazminio tinklo į lokalizacijos vietą plazminėje membranoje ir suformuojant čia reikalingą jo konformaciją (4, 6). β subvienetas svarbus β -adrenerginiam Ca^{2+} kanalo reguliavime ir reaguojant į ląstelės pH pokyčius, taip pat jis turi įtakos Ca^{2+} kanalų fasilitacijai (6). β subvienetai dalyvauja kanalo veiklos reguliavime, kurio metu fosforilinami kanalą sudarantys baltymai. Juose nustatytos vietos, kurios gali būti fosforilintos įvairių baltymų kinazių (PKG, PKA, PKC) (7, 9). Be to, β subvienetas didina Ca^{2+} srovės amplitudę ir greitina kanalo aktyvacijos kinetiką, veikia kanalo farmakologines savybes (6, 7).

Kanalo α_2 ir δ subvienetus koduoja tas pats genas ir yra žinomos keturios šių baltymų izoformos ($\alpha_2/\delta_{1, 2, 3, 4}$), koduojamos skirtingų genų (6). α_2/δ subvienetų įtaka L-tipo Ca^{2+} kanalų veiklai yra mažesnė nei β subvieneto. Šie subvienetai šiek tiek padidina Ca^{2+} srovės amplitudę ir nežymiai pagreitina kanalo inaktyvaciją, gali pakeisti kanalo aktyvacijos savybes. Be to, α_2/δ gali keisti Ca^{2+} kanalų raiškos lygį ląstelėje, dalyvauti α_1 subvieneto pernešime į plazminę membraną (6).

Tiek pagrindinis Ca^{2+} kanalą formuojantis subvienetas α_1 , tiek pagalbiniai subvienetai β ir α_2/δ turi daug baltymų izoformų. Tokia ekspresuojamų subvienetų gausa ir jų derinių įvairovė užtikrina reikiamą Ca^{2+} kanalų veiklą ir jų funkcijų skirtumus įvairiuose audiniuose. Dabar siekiama nustatyti L-tipo Ca^{2+} kanalų erdvinę struktūrą. I. Serysheva ir kt. (10) nustatė trimatę griaučių raumenų L-tipo Ca^{2+} kanalo sandarą ir teigia, kad kanalas yra asimetriškas ir sudarytas iš dviejų dalių, kurias autoriai pavadino „širdies formos“ ir „rankenėlės formos“ regionais. Širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų erdvinę struktūrą panaši į griaučių raumenų kanalų sandarą, tačiau širdies Ca^{2+} kanalai yra kompaktiškesni (jie neturi γ subvieneto) ir funkcinis baltymas membranoje yra labiau kūgiškas palyginus su griaučių raumenų Ca^{2+} kanalu (5).

Širdies ląstelėse Ca^{2+} jonų srovė per L-tipo Ca^{2+} kanalus (L-tipo Ca^{2+} srovė arba I_{Ca}) yra pagrindinis Ca^{2+} patekimo kelias iš ląstelės išorės į citoplazmą ir sukelia širdies raumens susitraukimą bei reguliuoja susitraukimo jėgą (11–13).

L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliacija baltymų kinaze A

L-tipo Ca^{2+} kanalą sudarančių baltymų fosforilini-

mas baltymų kinaze A (PKA) yra pagrindinis ir geriausiai ištirtas šio kanalo aktyvinimo būdas. Pati PKA yra aktyvinama prie jos prisijungus antriniam signalo pernešėjui cAMF. L-tipo Ca^{2+} kanalų fosforilinimas PKA didina jų atsidarymo tikimybę ir laiką, kurį kanalai būna atviri, ir taip padidina ląstelės I_{Ca} . PKA stimuliuoja I_{Ca} šiuo ląstelinės signalizacijos keliu: 1) prie receptoriaus prisijungia jo agonistas; 2) sužadintas receptorius aktyvina GTP surišantį baltymą (G_s), kuris stimuliuoja adenililciklazę (AC); 3) aktyvinta AC intensyviai gamina cAMF iš ATF; 4) padidėjus cAMF koncentracijai, aktyvinama PKA; 5) PKA fosforilina sujaudinimo-susitraukimo cikle dalyvaujančius baltymus, tarp jų ir L-tipo Ca^{2+} kanalus (11, 14–16). Šią kaskadą slopina cAMF fosfodiesterazės (PDE), kurios skaido cAMF ir taip riboja nuo cAMF priklausomą fosforilinimą bei serino/treonino fosfatazės, pašalinančios kinazių sukeltą baltymų fosforilinimą (14, 17, 18). AC-azę aktyvinti gali keletas skirtingų su savo receptoriais susijungusių agonistų: nuo cAMF priklausomą I_{Ca} stimuliaciją sukelia katecholaminai, gliukagonas, histaminas ir serotoninas.

L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliavimas, kai katecholaminais stimuliuojami β -adrenerginiai receptoriai ir aktyvinama PKA, geriausiai ištirtas. Šiuo metu įvairiuose audiniuose nustatyti ir klonuoti trijų tipų β -adrenerginiai receptoriai (β -AR): β_1 , β_2 ir β_3 . β receptorių kiekis ir įvairovė gali labai priklausyti nuo tyrimo objekto. Nustatyta, kad žinduolių širdyje dominuoja β_1 -adrenerginiai receptoriai, nors nemažą įtaką čia gali turėti ir β_2 receptorių stimuliacija (19, 20). Žmogaus širdies ląstelėse katecholaminų poveikis įprastai yra siejamas su β_1 ir β_2 -AR aktyvinimu, kurių tarpusavio santykis skiriasi priklausomai nuo širdies audinio tipo, patologinių pažeidimų, amžiaus ir išsivystymo (21). β -adrenerginių receptorių stimuliacija padidina vietinių kanalų aktyvumą ir visos ląstelės I_{Ca} . β_3 -AR ekspresija žmogaus miokarde taip pat nustatyta (22, 23), tačiau apie jų įtaką L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliavimui vis dar diskutuojama.

Nustatyta, kad PKA gali fosforilinti kanalo porą sudarantį α_{1C} subvienetą ties Ser-1928 (24). Taip pat nustatyta, kad *in vitro* PKA gali trijose vietose fosforilinti ir reguliacinį kanalo β subvienetą (Ser-459, Ser-478 ir Ser-479) (25). Baltymų kinazė A fosforilina L-tipo Ca^{2+} kanalo α_{1C} subvienetą tik tada, jei ląstelėje ji lokalizuota ties Ca^{2+} kanalu, o β subvieneto fosforilinimui tokia PKA lokalizacija nebūtina (26). PKA ties fosforilinamais baltymais-taikiniais tvirtinama per specialų inkarinį baltymą AKAP (angl. *A kinase anchoring protein*). Kai PKA sąveika su AKAP yra nutraukiama, ši kinazė negali fosforilinti griaučių

raumenų ir širdies miocitų L-tipo Ca^{2+} kanalų. Manoma, kad PKA su Ca^{2+} kanalais širdyje sieja mAKAP arba AKAP15, kurie prijungia PKA netoli kanalų širdies raumenyje (14, 26).

Adenililciklazės aktyvumo slopinimas yra vienas pagrindinių būdų, kuriais nutraukiama PKA sukeliamas kanalo stimuliacija. AC paprastai slopinama aktyvinant G_i baltymus. Nustatyta, kad daugumos su G_i baltymais susijusių receptorių aktyvinimas nekeičia bazinės I_{Ca} , bet slopina β -adrenerginės stimuliacijos metu padidėjusią Ca^{2+} srovę (27). Muskarininių receptorių stimuliacija slopina nuo PKA priklausomą kanalo stimuliaciją, nes šie receptoriai aktyvina G_i baltymus, slopinančius AC. Be to, nustatyta, kad muskarininiai M_2 receptoriai gali slopinti širdies ląstelių I_{Ca} aktyvindami fosfatazes arba NO keliu veikdami nuo cGMF priklausomų fosfodiesterazių aktyvumą (28). G_i baltymus gali aktyvinti (ir taip slopinti cAMF sintezę) ne tik muskarininiai, bet ir kiti širdies ląstelėse aptinkami receptoriai: adenoizino (A_1), opiatų ar prieširdžių natriuretinio peptido receptoriai (14).

Kitas būdas, kuriuo galima sumažinti kanalo fosforilinimą PKA, yra fosfodiesterazių aktyvinimas. Fosfodiesterazės (PDE) hidrolizuoja cAMF (ir cGMF) ir taip mažina jo koncentraciją ląstelėje. Tai užtikrina lokalų ciklinių nukleotidų veikimą (kompartimentaciją) (15, 18), neleidžia jiems difunduoti toli į citoplazmą ir neadekvačiai aktyvinti kitus savo taikinius (18). Širdyje randamos penkių šeimų PDE: 1) PDE1, kuri hidrolizuoja abu – cAMF ir cGMF. PDE1 daugiausia yra ekspresuojama ne raumeninėse širdies ląstelėse ir aktyvinama Ca^{2+} -kalmodulinu; 2) PDE2, kuri taip pat hidrolizuoja cAMF ir cGMF ir yra aktyvinama paties cGMF; 3) PDE3, kurios aktyvumą slopina cGMF; 4) PDE4, kuri hidrolizuoja cAMF; 5) PDE5, kuri hidrolizuoja cGMF (18). PDE1, PDE3, PDE4 ir PDE5 šeimų fermentai gali būti fosforilinami įvairių kinazių (PKA, PKG), taip keičiant jų aktyvumą (17, 18). PDE šeimų viduje dar egzistuoja įvairios šių baltymų izoformos, širdyje aptinkama mažiausiai 12 skirtingų PDE izoformų (18).

L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliacija baltymų kinaze C

Svarbų vaidmenį širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliavime atlieka ir baltymų kinazės C. Įvairių su $G_{q/11}$ baltymais susijusių receptorių (endotelino, α_1 adrenerginių, angiotenzino II, muskarininių) stimuliacija aktyvina PKC. Receptorių suaktyvintas baltymas $G_{q/11}$ stimuliuoja fosfolipazę C. Fosfolipazės C substratas yra membranos fosfolipidas inozitolfosfatidil 4,5-difosfatas (PIP_2), kurį ji skaldo į inozitoltrifosfatą (IP_3)

ir diacilglicerolį (DAG). DAG yra neutralus lipidus ir perneša signalą membranoje. DAG, fosfatidilserinas ir kai kurias atvejais Ca^{2+} kartu aktyvina PKC. Šiuo metu žinoma mažiausiai dešimt PKC izoformų, kurios skirstomos į tris grupes: paprastasias, naujasias ir netipiškas PKC. PKC izoformų skaičius ir kiekis skiriasi įvairiuose audiniuose ir priklauso nuo gyvūno rūšies ir vystymosi stadijos (9, 29, 30). Širdyje aptinkama keletas PKC izoformų: α , β ir ϵ PKC yra aptinkamos naujagimių ir suaugusiųjų skilvelio miocituose, η PKC izoforma aptikta kultūrintuose naujagimių miocituose. Yra duomenų, kad λ ir ζ PKC taip pat gali būti ekspresuojamos širdyje. β PKC izoforma širdyje aptinkama ne visada (29).

PKC poveikis I_{Ca} gali būti labai įvairus. PKC gali ir didinti I_{Ca} (31), ir mažinti ją (32). Taip pat žinoma, kad PKC gali sukelti dvifazius efektus I_{Ca} , t. y. to paties eksperimento metu I_{Ca} ir didėjo, ir mažėjo (33).

Kokiu būdu PKC keičia širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumą, tiksliai nežinoma. Nustatyta, kad *in vitro* PKC gali fosforilinti širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų α_{1C} ir β_2 subvienetus (14). PKC fosforilina L-tipo Ca^{2+} kanalo α_{1C} subvienetą baltymo N-gale, tačiau poveikis kanalui gali būti ir stimuliuojantis (33), ir slopinantis (34).

PKC stimuliuojantys hormonai dažnai sukelia ir inozitoltrifosfato sintezę, kuris išlaisvina Ca^{2+} jonus iš sarkoplazminio tinklo pro IP_3 kanalus, ir Ca^{2+} sukelia L-tipo Ca^{2+} kanalo inaktyvacija gali užgožti PKC sukeliamą I_{Ca} stimuliaciją (9). PKC sukeliami poveikiai gali priklausyti ir nuo to, kokia PKC izoforma yra aktyvuojama. PKC izoformų ekspresija širdies audinyje gali kisti vystymosi metu, priklausyti nuo objekto ar patologijų. PKC aktyvinimas sukelia fermento translokaciją link jos taikinių, skirtingos PKC izoformos gali skirtingai pasiskirstyti ląstelėje bei fosforilinti skirtingus baltymus–taikinius. Pavyzdžiui, ϵ PKC keliauja į skersaruožius regionus skilvelių miocituose, kur grupuojasi ties sarkolemos T-struktūromis, kuriose išsidėstę Ca^{2+} kanalai. Membraninių taikinių fosforilinimui svarbūs inkariniai RACK baltymai (angl. *receptors for activated C kinases*), o sąveika su šiais baltymais PKC priklauso nuo kinazės izoformos (14, 29). Manoma, kad β PKC stimuliuoja I_{Ca} (31), o ϵ PKC slopina Ca^{2+} srovę (32).

L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliacija kinaze G

PKG įtaka širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumui nėra visiškai aiški, nes tiriant cGMF/PKG aktyvacijos kelią, rezultatai būna gana skirtingi. Yra duomenų, kad šis cGMF/PKG kelias slopina Ca^{2+} kanalų veiklą (35), tačiau kiti duomenys rodo, kad cGMF/PKG

reguliavimo kelias stimuliuoja I_{Ca} (36). Šio signalizacijos kelio įtaka I_{Ca} gali būti susijusi ne tik su tiesioginiu PKG poveikiu L-tipo Ca^{2+} kanalui, bet ir su NO bei cGMF susijusiu PDE reguliavimu. PDE skaido cAMF ir cGMF ir keičia kitų nuo šių nukleotidų priklausomų fermentų veiklą (18). NO poveikis širdies I_{Ca} gali būti nesusijęs su cGMF (37). Triušio prieširdžio ląstelių Ca^{2+} srovę NO didina, aktyvindamas PKG nuo cAMF nepriklausomu keliu (37).

Yra žinoma, kad cGMF koncentracijos padidėjimas gali slopinti I_{Ca} , todėl pasiūlyta keletas būdų, kuriais gali vykti toks I_{Ca} reguliavimas: 1) tiesioginis Ca^{2+} kanalo fosforilinimas PKG; 2) fosfatazių (defosforilinančių Ca^{2+} kanalus) aktyvinimas PKG; 3) PDE2 (skaldančios cAMF) stimuliacija cikliniu nukleotidu cGMF. Taigi, cGMF padidėjimas ląstelėje gali reguliuoti I_{Ca} ne tik fosforilinant kanalą, bet ir keičiant nuo PKA priklausomą Ca^{2+} kanalo reguliavimą (9, 35, 37). Dėl daugialypio cGMF poveikio tyrimų metu gaunami įvairūs duomenys ir PKG įtaką L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumui sunku nustatyti.

Tirozino kinazių įtaka L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumui

Tirozino baltymų kinazių (PTK) veikla reguliuoja miokardo atsaką į β -adrenerginę L-tipo Ca^{2+} kanalų stimuliaciją, tačiau apie šių kinazių veiklą, reguliuojant L-tipo Ca^{2+} kanalus, žinoma nedaug. Manoma, kad PTK sukelti poveikiai I_{Ca} gali priklausyti tiek nuo audinio, tiek nuo gyvūno rūšies, tiek nuo jo amžiaus, nes kai kurios membrininės PTK yra įvairių augimo ar diferenciacijos faktorių receptoriai. Tiriant PTK poveikį širdies L-tipo Ca^{2+} kanalams įvairiuose audiniuose, gauti skirtingi rezultatai, tačiau dauguma duomenų rodo, kad PTK aktyvina L-tipo Ca^{2+} kanalus (38, 39).

Tyrimai, kurių metu buvo vartoti PTK blokatoriai (genisteinas, T23), rodo, kad PTK dalyvauja širdies L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliavime ir dažniausiai didina I_{Ca} (39). Yra duomenų, kad, PTK gali slopinti žmogaus prieširdžio ląstelių I_{Ca} , o mūsų laboratorijoje gauti duomenys rodo, kad PTK slopinant genisteinu, gaunamas dvifazis poveikis žmogaus prieširdžio ląstelių I_{Ca} : registruojamas trumpalaikis srovės slopinimas, kurį greitai pakeičia I_{Ca} stimuliacija (40). Tai rodo, kad PTK gali ir stimuliuoti, ir slopinti žmogaus prieširdžio ląstelių I_{Ca} . Manoma, kad membrininės PTK slopinimas genisteinu mažina I_{Ca} , o citoplazminių PTK slopinimas didina I_{Ca} . Koku būdu PTK keičia L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumą, tiksliai nežinoma, tačiau manoma, kad PTK, veikdama pačius β -AR, gali keisti I_{Ca} jautrumą β -adrenerginei stimuliacijai (41).

L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacija

Diastolės metu Ca^{2+} koncentracija citoplazmoje sumažėja Ca^{2+} jonus sugrąžinant į viduląstelines talpyklas ir pašalinant pro sarkolemą. Tam, kad kardiomiocituose būtų palaikoma tokia Ca^{2+} homeostazė ir nesutrikėtų širdies darbas, Ca^{2+} jonų srautas į citoplazmą L-tipo Ca^{2+} kanalais turi nutrūkti. L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacija priklauso tiek nuo membraninio potencialo, tiek nuo Ca^{2+} jonų. Šie du mechanizmai kontroliuoja Ca^{2+} patekimą į kardiomiocitus, kartu reguliuoja signalo perdavimą sarkoplazminio tinklo (ST) Ca^{2+} kanalams RyR2 ir užtikrina normalų širdies susitraukimą ir atsipalaidavimą. Širdies ląstelėse nuo Ca^{2+} priklausoma inaktyvacija (angl. *CDI – Ca^{2+} -dependent inactivation*) yra dominuojantis L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacijos mechanizmas (42, 43), o žinduolių širdies ląstelėse ši inaktyvacija tiesiogiai priklauso nuo Ca^{2+} jonų, kurie išmetami iš ST (44, 45). Taigi, I_{Ca} amplitudė ir kinetika priklauso nuo ST RyR2 kanalų aktyvumo ir nuo ST sukaupto Ca^{2+} jonų kiekio (11, 12). Nuo Ca^{2+} priklausoma greita inaktyvacija yra neigiamo grįžtamojo ryšio mechanizmas, kai Ca^{2+} jonai slopina savo pačių srovę, tekančią per L-tipo Ca^{2+} kanalus. Kai vidinė Ca^{2+} koncentracija sumažėja ir nuo Ca^{2+} priklausoma inaktyvacija nevyksta, I_{Ca} slopina nuo įtampos priklausomas lėtosios kanalų inaktyvacijos mechanizmas, kuris apsaugo nuo priešlaikinio I_{Ca} padidėjimo, išliekant depoliarizuotai ląstelės membranai (12).

Labai svarbų vaidmenį nuo Ca^{2+} priklausomoje L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacijoje atlieka baltymas kalmodulinas (CaM). Nustatyta, kad mutantiniai L-tipo Ca^{2+} kanalo α_{1C} subvienetai, kurių α_{1C} C galo aminorūgščių seka buvo pakeista, yra vienodai laidūs tiek Ca^{2+} , tiek Ba^{2+} jonams ir jų inaktyvacijos kinetika abiejų jonų srovės atveju buvo tokia pati (8). α_{1C} aminorūgščių sekoje buvo nustatytos dvi nuo Ca^{2+} priklausomą inaktyvaciją lemiančios sritys, pavadintos L ir K. Nustatyta, kad tiek L, tiek K sritis jungiasi su CaM, kuris svarbus vykstant nuo Ca^{2+} priklausomai L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacijai. Be to, L sritis turi labai specifinę Ca^{2+} jonams seką, kuri veikia kaip Ca^{2+} sensorius. Šio sensoriaus išotinis kalciu reguliuoja CaM susijungimą su α_{1C} L sritimi, o IQ (izoleucino gliutamino) seka srityje K yra atsakinga už CaM susijungimą su α_{1C} , kai CaM yra prisijungęs Ca^{2+} (8). Žinoma, kad, susijungęs su α_{1C} , kalmodulinas keičia savo konformaciją prie jo prisijungus Ca^{2+} jonams ir iš „hantelio“ formos baltymo tampa globule, apsvyniojusia savo taikinį – α_{1C} . Manoma, kad 4 Ca^{2+} jonai gali prisijungti prie CaM molekulės ir, pasikeitus CaM (bei α_{1C} subvieneto C galo) konfirmacijai, blokuoti

α_{1C} porą, tačiau tikslus inaktyvacijos mechanizmas kol kas neaiškus (6, 8). Yra duomenų, kad ne tik α_{1C} subvieneto C galas yra susijęs su kanalo inaktyvacijos Ca^{2+} jonais mechanizmu.

L-tipo Ca^{2+} srovės fasilitacija

CaM dalyvauja ne tik L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacijoje, tačiau gali būti ir svarbi stimuliuojančių I_{Ca} mechanizmų dalis. I_{Ca} didėjimo procesą, kai vyksta lėtas nuo stimuliacijos dažnio priklausomas I_{Ca} augimas varlės širdies ląstelėse, pirmą kartą aprašė S. Noble ir Y. Shimoni (46). Šis procesas vėliau buvo atrastas ir izoliuotose žinduolių (jūrų kiaulyčių, šunų, triušų, žiurkių, žmonių) širdies ląstelėse ir įvardytas kaip I_{Ca} fasilitacija (12, 47). S. Noble ir Y. Shimoni aprašytas I_{Ca} didėjimas vyksta sąlyginai lėtai, t. y. minučių laikotarpiu, be to, nustatyta, kad šis procesas yra susijęs su L-tipo Ca^{2+} kanalų fosforiliniu kinaze CaMKII (48, 49). Baltymų kinazė CaMKII yra nuo Ca^{2+} /kalmodulino priklausoma serino/treonino kinazė ir yra svarbus L-tipo Ca^{2+} kanalų reguliavimo efektorius. Širdyje dominuoja γ ir δ CaMKII kinazės izoformos, kurios gali didinti savo aktyvumą autofosforilinimo būdu (49). Šios CaMKII aktyvinamos esant nedidelėms Ca^{2+} koncentracijoms citoplazmoje ir, manoma, kad jų aktyvinimas susijęs su Ca^{2+} patekimu pro L-tipo Ca^{2+} kanalus, o ne su Ca^{2+} išmetimu iš ST (12).

I_{Ca} fasilitacija gali vykti ne tik dėl fosforilavimo CaMKII kinaze. Žinduolių ląstelėse nustatyta greitoji I_{Ca} fasilitacija, vykstanti po ramybės pauzės stimuliuojant ląsteles didelio dažnio (0,5–5 Hz) depoliarizaciniais impulsais. I_{Ca} didėjimas šiuo atveju yra susijęs daugiausia su sulėtėjusia I_{Ca} kinetika ir fiksuojamas per keletą sekundžių po pirmojo depoliarizacinio impulso. Šis fasilitacijos mechanizmas skiriasi nuo aukščiau aprašytos lėtosios fasilitacijos ir priklauso nuo Ca^{2+} išmetimo iš ST pro RyR2 kanalus, dirginant žinduolių kardiomiocitus didelio dažnio depoliarizaciniais impulsais (12). Kaip minėta, žinduolių širdies ląstelėse nuo sarkoplazminio tinklo išmetamų Ca^{2+} jonų priklausoma inaktyvacija yra pagrindinis L-tipo Ca^{2+} kanalų inaktyvacijos mechanizmas. Taigi, sumažėjus Ca^{2+} išmetimui iš ST, inaktyvacija susilpnėja ir L-tipo Ca^{2+} kanalai lėčiau inaktyvinasi (42, 44, 50). Tokios sulėtėjusios inaktyvacijos pasekmė yra Ca^{2+} jonų srauto pro L-tipo Ca^{2+} kanalus ir I_{Ca} amplitudės padidėjimas (50). C. Delgado ir kt., panaudodami Ca^{2+} indikatorius Fluo-3, įrodė, kad, depoliarizuojant žiurkės širdies ląsteles 1 Hz dažnio impulsais, mažėjo Ca^{2+} išmetimas iš ST ir tai susiejo su greita nuo dirginimo dažnio priklausoma I_{Ca} fasilitacija (44). Taip pat jie

nustatė, kad tapsigarginas panaikino greitąją I_{Ca} inaktyvacijos fazę ir eliminavo I_{Ca} fasilitaciją (44). Dėl tapsigargino poveikio Ca^{2+} nesugeriamas į ST, sumažėja ST Ca^{2+} atsargos ir silpnėja Ca^{2+} išmetimas iš ST. Tuo tarpu varlės širdies ląstelėse greitoji nuo dirginimo dažnio priklausoma I_{Ca} fasilitacija nevyksta dėl menko ST išsivystymo ir pajėgumo, tačiau vyksta lėtoji nuo CaMKII priklausoma fasilitacija, o tokie duomenys patvirtina esant skirtingus I_{Ca} fasilitacijos tipus (12).

L-tipo Ca^{2+} kanalai, I_{Ca} ir širdies nepakankamumas

Širdies ląstelių L-tipo Ca^{2+} kanalai yra pagrindinis Ca^{2+} jonų patekimo kelias į ląstelės vidų ir lemia visos širdies darbą (11–13), todėl šių kanalų ekspresijos ir reguliacijos pokyčiai gali keisti širdies darbą ir turėti nepageidaujamų pasekmių širdies ir viso organizmo funkcijoms. Dauguma tyrėjų teigia, kad, esant širdies nepakankamumui, L-tipo Ca^{2+} kanalų tankis ir I_{Ca} nekinta arba sumažėja (6, 13), tačiau yra duomenų, kad hipertrofuotose ir širdies nepakankamumo pažeistose širdyse L-tipo Ca^{2+} kanalų tankis yra padidėjęs (6). Bet kokių atveju aišku, kad viduląstelinės Ca^{2+} jonų apykaitos pokyčiai yra tiesiogiai susiję su žmogaus ir gyvūnų širdies ligomis (6). Esant širdies nepakankamumui, vyksta ne tik pačios širdies remodeliavimas – širdies funkcijos bei struktūros persitvarkymas (51), bet kinta ir sistemų, reguliuojančių širdies darbą, veikla. Išemijos metu, esant širdies nepakankamumui, suaktyvėja simpatinė nervų sistema ir padidėja katecholaminų kiekis kraujyje (52). Dėl to yra aktyvinami β -adrenerginiai receptoriai ir per cAMF stimuliuojami L-tipo Ca^{2+} kanalai. Toks padidėjęs simpatinės nervų sistemos aktyvumas, esant širdies nepakankamumui, yra atvirkščiai proporcingas pacientų išgyvenamumui (52). Be to, tokių pacientų širdyse β -AR (daugiausia β_1 -AR) ekspresija yra sumažėjusi, o likusių β -AR ryšys su G_s baltymais yra susilpnėjęs (52). β -AR blokavimas yra plačiai naudojamas širdies ligų gydymo metodas (53), kai širdies darbas reguliuojamas slopinant nuo cAMF priklausomą signalizacijos kaskadą.

Metabolizmo slopinimas yra išeminės širdies ligos ir širdies nepakankamumo ypatybė. Nepaisant to, kad šis reiškinys širdies audiniuose yra seniai tyrinėjamas, jo poveikis ląstelių Ca^{2+} kanalų veiklai iki šiol nėra visiškai aiškus. Teigiama, kad oksidacinio fosforilinimo blokavimas sukelia ATF trūkumą ląstelėje, tačiau per kokį mechanizmą tai veikia Ca^{2+} kanalų veiklą, tiksliai nežinoma. Mūsų laboratorijoje gauti rezultatai rodo, kad L-tipo Ca^{2+} kanalų slopinimas

metabolinės inhibicijos metu priklauso nuo intensyvios ATF hidrolizės, tačiau nesusijęs su sumažėjusiu baltymų fosforiliniu (54). Manome, kad toks Ca^{2+} kanalų slopinimas gali būti susijęs su padidėjusiu viduląstelinės terpės rūgštingumu (acidoze) vykstant metabolizmo slopinimui. Neseniai mūsų laboratorijoje gauti rezultatai (neskelbti duomenys) rodo, kad žmogaus širdies ląstelių I_{Ca} fasilitacija vyko silpniau nei žiurkės širdies ląstelių, o metabolinis slopinimas sukėlė mažesnius žmogaus kardiomiocitų I_{Ca} pokyčius palyginus su žiurkės kardiomiocitų I_{Ca} . Tai rodo, kad pažeistame miokarde L-tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumo reguliacija yra pakitusi, nes žmogaus širdies miocitai buvo fermentais izoliuoti iš kardiokirurginių opera-

cijų metu paimtų širdies biopsijų bei eksplantų, t. y. žmogaus širdies ląstelės buvo išskirtos iš daugiau ar mažiau pažeistų ir farmakologinėmis medžiagomis paveiktų širdies audinių. Tokie tyrimų rezultatai sutampa su kitų tyrėjų analogiškais duomenimis: esant vėlyvos stadijos širdies nepakankamumui, vienetinių širdies ląstelių I_{Ca} fasilitacija vyksta silpnai arba visiškai nevyksta, o I_{Ca} inaktyvacija yra daug lėtesnė nei normalių širdies ląstelių (50). Tokie I_{Ca} pokyčiai susiję su sarkoplazminio tinklo RyR2 kanalų pakitimais ir Ca^{2+} jonų koncentracijos pokyčiais, esant širdies nepakankamumui (13), o RyR2 kanalų disfunkcija yra susijusi su širdies ritmo sutrikimais ir kardiomiopatija (12).

L-type Ca^{2+} channels in the heart: structure and regulation

Rimantas Treinys, Jonas Jurevičius

Laboratory of Membrane Biophysics, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: Ca^{2+} channels; kinases; phosphorylation; inactivation; facilitation.

Summary. This review analyzes the structure and regulation mechanisms of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channel in the heart. L-type Ca^{2+} channels in the heart are composed of four different polypeptide subunits, and the pore-forming subunit α_1 is the most important part of the channel. In cardiac myocytes, Ca^{2+} enter cell cytoplasm from extracellular space mainly through L-type Ca^{2+} channels; these channels are very important system in heart Ca^{2+} uptake regulation. L-type Ca^{2+} channels are responsible for the activation of sarcoplasmic reticulum channels (RyR2) and force of muscle contraction generation in heart; hence, activity of the heart depends on L-type Ca^{2+} channels. Phosphorylation of channel-forming subunits by different kinases is one of the most important ways to change the activity of L-type Ca^{2+} channel. Additionally, the activity of L-type Ca^{2+} channels depends on Ca^{2+} concentration in cytoplasm. Ca^{2+} current in cardiac cells can facilitate, and this process is regulated by phosphorylation of L-type Ca^{2+} channels and intracellular Ca^{2+} concentration. Disturbances in cellular Ca^{2+} transport and regulation of L-type Ca^{2+} channels are directly related to heart diseases, life quality, and life span.

Correspondence to J. Jurevičius, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, 50161 Kaunas, Lithuania. E-mail: jojur@kmu.lt

Literatūra

1. Fatt P, Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol* 1953;120:171-204.
2. Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 1975;65:617-44.
3. De Waard M, Gurnett CA, Cambell KP. Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. *Ion Channels* 1996;4:41-87.
4. Yamakage M, Namiki A. Calcium channels – basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels – a review. *Can J Anesth* 2002;49:(2)151-64.
5. Wang M-C, Dolphin A, Kitmitto A. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Letters* 2004;564:245-50.
6. Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;115:3306-17.
7. Striessnig J. Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;9:242-69.
8. Abernethy DR, Soldatov NM. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:724-8.
9. Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels ($\text{Ca}_v1.2a,b$) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(6):C1743-56.
10. Serysheva II, Ludtke SJ, Baker MR, Chiu W, Hamilton SL. Structure of the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(16):10370-5.
11. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205.
12. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez

- AM, et al. 'Ca²⁺-induced Ca²⁺ entry' or how the L-type Ca²⁺ channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:118-35.
13. Bers DM, Despa S. Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* 2006;100:315-22.
 14. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 2000;87(12):1095-102.
 15. Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(1):295-9.
 16. Lindegger N, Niggli E. Paradoxical SR Ca²⁺ release in guinea-pig cardiac myocytes after β -adrenergic stimulation revealed by two-photon photolysis of caged Ca²⁺. *J Physiol* 2005; 565(3):801-13.
 17. Hove-Madsen L, Mery P-F, Jurevicius J, Skeberdis AV, Fischmeister R. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res Cardiol* 1996;91(Suppl 2):1-8.
 18. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, et al. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006;99(8):816-28.
 19. Skeberdis VA, Jurevicius J, Fischmeister R. Beta-2 adrenergic activation of L-type Ca²⁺ current in cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(2):452-61.
 20. Shimoni Y. Hormonal control of cardiac ion channels and transporters. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;72(1):67-108.
 21. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 2006;100:323-37.
 22. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Lemarec H. Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996;98:556-62.
 23. De Matteis R, Arch JR, Petroni ML, Ferrari D, Cinti S, Stock MJ. Immunohistochemical identification of the β_3 -adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1442-50.
 24. De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA. Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the α_1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 1996;35:10392-402.
 25. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the β_2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 1999;38:10361-70.
 26. Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, et al. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 1997;19:185-96.
 27. Mery PF, Abi-Gerges N, Vandecasteele G, Jurevicius J, Eschenhagen T, Fischmeister R. Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes. *Life Sci* 1997;60:1113-20.
 28. Vandecasteele G, Eschenhagen T, Scholz H, Stein B, Verde I, Fischmeister R. Muscarinic and β -adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 1999;5:331-4.
 29. Mackay K, Mochly-Rosen D. Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(7):1301-7.
 30. Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(6):317-23.
 31. Alden KJ, Goldspink PH, Ruch SW, Buttrick PM, Garcia J. Enhancement of L-type Ca²⁺ current from neonatal mouse ventricular myocytes by constitutively active PKC-betaII. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(4):C768-74.
 32. Yue Y, Qu Y, Boutjdir M. Beta- and alpha-adrenergic cross-signaling for L-type Ca current is impaired in transgenic mice with constitutive activation of epsilon PKC. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(3):749-54.
 33. Weiss S, Doan T, Bernstein KE, Dascal N. Modulation of cardiac Ca²⁺ channel by Gq-activating neurotransmitters reconstituted in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 2004;279(13): 12503-10.
 34. McHugh D, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12334-8.
 35. Schroder F, Klein G, Fiedler B, Bastein M, Schnasse N, Hillmer A, et al. Single L-type Ca²⁺ channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2003;60(2):268-77.
 36. Wang Y, Wagner MB, Joyner RW, Kumar R. cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovasc Res* 2000;48(2): 310-22.
 37. Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, Rochais F, Vandecasteele G. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;142(2):136-43.
 38. Maier S, Aulbach F, Simm A, Lange V, Langenfeld H, Behre H, et al. Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res* 1999;44(2):390-7.
 39. Yagi T, Boyden PA. Protein tyrosine kinases and L-type Ca²⁺ currents in cells that have survived in epicardial border zone of canine infarcted heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(5):669-77.
 40. Kanaporis G, Skeberdis AV, Gendvilienė V, Jurevicius J. Effect of genistein, tyrosine kinase inhibitor, on L-type calcium current in human atrial myocytes. *Acta Medica Lituanica* 2001;8(2):98-104.
 41. van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res* 2005;65(1):28-39.
 42. Brette F, Salle L, Orchard CH. Differential modulation of L-type Ca²⁺ current by SR Ca²⁺ release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2004;95:1-7.
 43. Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P, Charmet P. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca²⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:104-17.
 44. Delgado C, Artiles A, Gomez AM, Vassort G. Frequency-dependent increase in cardiac Ca²⁺ current is due to reduced Ca²⁺ release by the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1783-93.
 45. Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pfluegers Arch* 2000; 439:588-99.
 46. Noble S, Shimoni Y. The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium. *J Physiol*

- 1981;310:57-75.
47. Lemaire S, Piot C, Leclercq F, Leuranguer V, Nargeot J, Richard S. Heart rate as a determinant of L-type Ca^{2+} channel activity: mechanisms and implication in force-frequency relation. *Basic Res Cardiol* 1998;93(1):51-9.
48. Yuan W, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994;267:H982-93.
49. Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. CaMKII tethers to L-type Ca^{2+} channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca^{2+} signals for facilitation. *J Cell Biol* 2005;171(3):537-47.
50. Barrere-Lemaire S, Piot C, Leclercq F, Nargeot J, Richard S. Facilitation of L-type calcium currents by diastolic depolarization in cardiac cells: impairment in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000;47:336-49.
51. Pangonytė D, Stalioraitytė E, Kazlauskaitė D, Žiuraitienė R, Stanionienė Z, Kerpauskienė S. Sergančiųjų išemine širdies liga širdies geometrijos pokyčiai. (Changes of heart geometry in patients with ischemic heart disease.) *Medicina (Kaunas)* 2008;44(1):8-14.
52. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003;93:896-906.
53. Milvidaitė I, Lukšienė D, Šlapikienė B, Babarskienė MR, Liukaitis V, Mačiulaitis R, et al. Antrinė išeminės širdies ligos profilaktika persirgus miokardo infarktu (medikamentinio gydymo įvertinimas remiantis anketinės apklausos duomenimis). (Secondary prevention of ischemic heart disease: pharmacological treatment after myocardial infarction according to follow-up protocol.) *Medicina (Kaunas)* 2007;43(2):131-6.
54. Kanaporis G, Treinys R, Jurevičius J, Fischmeister R. Effect of metabolic inhibition on the activity of L-type Ca^{2+} channels in the presence of non-hydrolysable ATP analogs. *Biologija* 2004;2(2 Suppl):36-9.

Straipsnis gautas 2008 04 22, priimtas 2008 07 04
Received 22 April 2008, accepted 4 July 2008