

**РОЛЬ КОННЕКСИНОВ И НАТРИЕВОГО КАНАЛА  $Na_v 1.5$ , КОДИРУЕМОГО ГЕНОМ  $SCN5A$ , В НАРУШЕНИЯХ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПУЛЬСА В МИОКАРДЕ***Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева РАМН, Москва**Рассматривается роль межклеточных щелевых контактов в генезе нарушений ритма сердца, приводятся примеры мутаций, ассоциированных с фибрилляцией и асистолией предсердий.***Ключевые слова:** коннексины, коннексоны, межклеточные каналы, мутации, фибрилляция предсердий, асистолия предсердий, синдром Бругада.*The role of intercellular gap contacts in the pathogeny of cardiac arrhythmias are considered, examples of mutations associated with atrial fibrillation and atrial asystole are given.***Key words:** connexins, connexons, intercellular channels, mutations, atrial fibrillation, atrial asystole, Brugada syndrome.

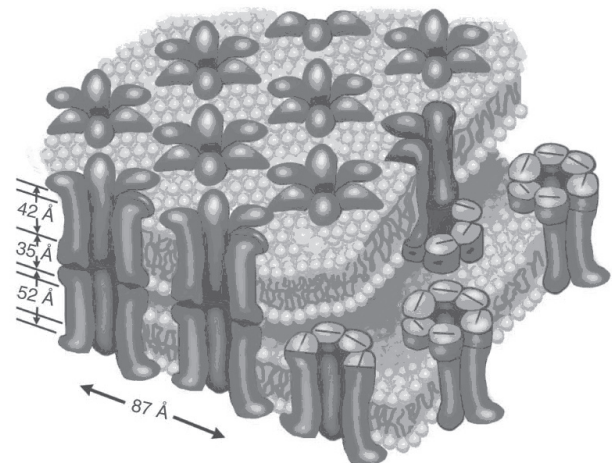
Существуют два фундаментально различных пути межклеточного взаимодействия: секреция молекул (гормоны, медиаторы) во внеклеточную среду и формирование непрерывных каналов, которые непосредственно соединяют цитоплазму двух клеток (щелевые соединения). Межклеточные каналы позволяют клеткам обмениваться небольшими молекулами и с помощью этого координировать широкий круг действий. Надо заметить, что хотя эти контакты осуществляют сходные функции во всех многоклеточных организмах, позвоночных и беспозвоночных, они используют неродственные семейства генов для кодирования этих каналов. С развитием генетических исследований мы получаем новую информацию о физиологической роли коннексинов позвоночных. Мутации в генах коннексинов могут лежать в основе различных болезней человека, включая глухоту, демиелинизирующую нейропатию, катаракту и др. [17].

Итак, в зоне межклеточного взаимодействия существуют специфические щелевые контакты или щелевые соединения, пронизывающие внешние мембраны контактирующих клеток. Щелевое соединение - это щель размером 2-4 нм, состоящая из белковых каналов, через которую передаются электрические сигналы и способны проходить неорганические ионы и небольшие регуляторные молекулы размером до 1 кДа, что обеспечивает метаболическую кооперацию соседних клеток.

Коннексоны - регулируемые каналы, состоят из 6 коннексинов, белковых субъединиц, кодируемых мультигенным семейством. Коннексины - полиопные интегральные мембранные крупные белки (25-28 кДа), 4 раза пересекающие мембрану, имеющие две внеклеточные петли (EL-1 и EL-2), цитоплазматическую петлю (CL) с N-концом (AT) и C-концом (CT), вдающимися в цитоплазму. Шесть белковых коннексиновых субъединиц, сгруппированных вокруг гидрофильной поры, пронизывающей мембрану, образуют коннексон. Два полуканала соседних клеток, расположенные друг против друга, соединяются и образуют, таким образом, непрерывный межклеточный канал между двумя волокнами (рис. 1). Специфические N- и E-кадгеринины

обеспечивают адгезию клеток, что способствует образованию каналов между соседними клетками. Объединение шести коннексинов двух типов может образовывать 14 вариантов коннексонов, из которых может формироваться от 142 до 196 различных вариантов каналов! При этом коннексоны могут быть гомомерными, если содержат коннексин одного типа, и гетеромерными, если содержат множественные коннексины. Каждая клетка может давать коннексоны разных типов и тем самым давать гомотипические или гетеротипические (или гетеромерные) межклеточные каналы, которые образуют кластеры в определенных специализированных областях мембран.

Щелевые соединения представляют собой избирательные пути передачи сигналов, чьи свойства предопределяются молекулярным составом коннексонов [16]. Фактически коннексоны представляют собой код, базирующийся на размерах и ионной избирательности, на правилах совместимости доступных коннексонов и точно определенной чувствительности. С коннексонами способны взаимодействовать различные белки, например, киназы, фосфорилирующие коннексины и меняющие их свойства, что может регулировать работу



**Рис. 1. Модель структуры поровых межклеточных контактов кардиомиоцитов, образованных коннексинами. (from Saffitz J.E.: Cell-to-cell communication in the heart. Cardiol Rev. 1995 Vol. P.86.)**

канала. С коннексином 43 взаимодействуют следующие белки: v-, c-src киназы, киназа C, MAP киназа, Cdc2 киназа, казеин киназа 1, киназа A, ZO-2, ZO-1, b-катенин, дребрин, a-, b-тубулин, кавеолин-1, NOV, CIP85. Белок дребрин взаимодействует с коннексинами и с микрофиламентами, что указывает на взаимосвязь каналов и организации цитоскелета клетки. С коннексами так же взаимодействуют тубулины (белки микротрубочек), что может способствовать транспорту различных веществ вдоль микротрубочек непосредственно к каналу. Коннексоны могут закрываться при действии тока, pH, напряжения мембраны, Ca<sup>2+</sup>. Нарушение межклеточных коммуникаций вызывает «глухоту» клеток к регулирующим сигналам.

Коннексины - нестабильные белки, живущие несколько часов. Присутствуют практически во всех клетках. В общей сложности у человека имеется 21 различных коннексин. У мыши 20 коннексинов. Многие клетки образуют несколько видов коннексинов, которые способны полимеризоваться в различных комбинациях. Например, кератиноциты экспрессируют Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1 и Cx43; гепатоциты - Cx26 и Cx32. В сердце млекопитающих экспрессируется 5 разных коннексинов (Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 и Cx46).

Некоторые коннексины могут заменять другие в случае мутаций. В частности, у мышей кардиальные нарушения вследствие дефектов Cx43, оказывались скорректированными при замещении Cx43 на Cx32 (Cx43KI32) или Cx40 (Cx43KI40). В эксперименте Cx43KI32 животные имели некоторые кардиальные нарушения, сходные с теми, что наблюдались у мышей с дефектами Cx43, но эти нарушения были менее выраженными в случае мышей Cx43KI40, у которых сердце развивалось нормально. Проводимость Cx32 канальцев ниже, чем Cx43, напротив проводимость Cx40 канальцев выше, чем Cx43. Cx40 в основном экспрессируется в проводящем миокарде и неспособен давать гетеротипические каналы с Cx43, который экспрессируется в работающем миокарде. Это предупреждает растекание электрических стимулов между двумя компартментами. Не обнаружено признаков аббератного распространения вентрикулярного возбуждения у Cx43KI40 мышей.

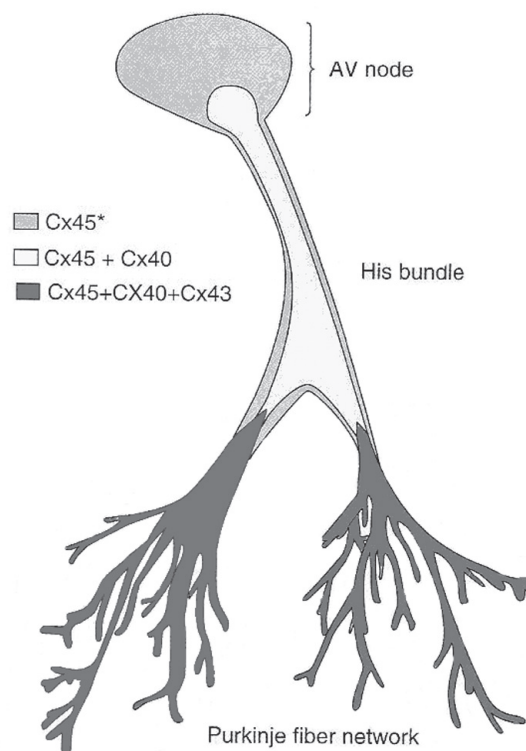
Таким образом, замещенные коннексины неспособны формировать гетеротипические каналы, что нарушает общение клеток с их соседями. Или, наоборот возникают сообщения между обычно сегрегированными типами клеток. Наконец, в третьих, пропускные свойства вновь образуемых канальцев существенно отличаются от должных [13].

В основе нарушений ритма сердца, связанных с проведением импульса, в большинстве случаев лежат врожденные структурные аномалии проводящих путей. Однако, помимо чисто анатомических особенностей строения проводящей системы миокарда, в развитии нарушений ритма имеет значение и изменение ее функциональных свойств. В качестве одного из ключевых молекулярных субстратов межклеточного проведения импульсов рассматриваются белки коннексины, участвующие в формировании специализированных

мембранных структур, обеспечивающих прямую связь между клетками.

В раннем миокарде число и размеры щелевых соединений незначительны, но их количество возрастает в ходе развития. Однако количество их в развивающихся синусопредсердном и атриовентрикулярном узлах остается незначительным, что сопровождается слабой экспрессией Cx40 и Cx45. Это согласуется с малой скоростью проводимости в них и отсутствием быстрых натриевых токов. Слабое купирование нодальных клеток, по-видимому, необходимо для защиты молчащих нодальных миоцитов от работающего миокарда предсердий и желудочков. Cx43 и промежуточные филаменты обладают почти исключительным паттерном экспрессии в атриальном и нодальном миокарде, соответственно, что отражается в довольно резком увеличении щелевых соединений при переходе от ткани синусопредсердного узла к предсердию. Обнаруживаемый в месте перехода электрический градиент, по-видимому, является результатом постепенного изменения морфологии нодальных клеток в направлении периферии и уменьшения числа нодальных клеток в направлении работающего миокарда, чем результатом градиентного изменения молекулярного фенотипа.

В миокарде коннексины отвечают за межклеточный перенос деполяризирующего потенциала действия. В клетках системы Гиса-Пуркинье человека наибольшую роль отводят коннексину 40, который обеспечивает высокую скорость проведения импульса к кардиомиоцитам (рис. 2) [5]. В экспериментах на модели «нокаутированных» мышей показано, что существен-



**Рис. 2. Распределение семейств коннексинов в АВ-узле и системе Гис-Пуркинье. (from Corpen S. Connexin 45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ. Res.* 1998. Vol. 82. P. 241)**

ное снижение уровня Sx40 с нарушением его внутрисердечной локализации, обусловленное введением инактивирующей мутации в ген его транскрипционного фактора HF-1b, значительно увеличивает смертность животных, связанную с желудочковыми тахикардиями и атриовентрикулярными блокадами при отсутствии морфологических изменений в сердце [12].

В последние годы накапливаются сведения о том, что мутации в генах, кодирующих коннексины, могут лежать в основе возникновения нарушений ритма сердца. Недавно появились сведения об ассоциации локального снижения экспрессии Sx40 в различных отделах предсердий с риском развития такого известного нарушения сердечного ритма как фибрилляция предсердий. Было высказано предположение, что фибрилляция предсердий может иметь в своей основе соматические мутации в гене, кодирующем Sx40 (GJA5). «У значительной части пациентов нет очевидной причины для развития фибрилляции предсердий, и, возможно, что одна треть этих случаев фактически происходит из-за мутаций в гене GJA5», высказались авторы на основании исследования GJA5 в сердечной ткани и лимфоцитах, взятых у 15 пациентов с идиопатической фибрилляцией предсердий. Четверо из пациентов имели гетерозиготные мутации в GJA5. У троих пациентов мутации были найдены в сердечной ткани, но не в лимфоцитах, что свидетельствует о соматическом происхождении дефектов. У четвертого пациента мутация была обнаружена в клетках обоих типов, что предполагает эмбриональную мутацию [15].

В основе врожденной асистолии предсердий также могут лежать генетические нарушения. Под асистолией предсердий подразумевают отсутствие электрической и механической активности предсердий, которая связана с полным подавлением активности синусового узла или с синоаурикулярной блокадой, отсутствием в миокарде предсердий гетеротопных очагов возбуждения и отсутствием ретроградной проводимости из желудочков в предсердия. Электрокардиографически асистолия предсердий характеризуется брадикардией, отсутствием P-волны и АВ-узловыми сокращениями. Около половины пациентов с эти заболеванием имеют синкопальные состояния.

До настоящего времени более известна была вторичная асистолия предсердий, связанная с такими заболеваниями, как аномалия Эбштейна, миодистрофия Эмери-Дрейфуса, синдром Кюгельберга-Веландера или ювенильная форма прогрессирующей мышечной атрофии, амилоидоз. Накопление данных об изолированной асистолии предсердий, которую не удается удовлетворительно объяснить существующим воспалительным или дегенеративным поражением миокарда, заставляет искать генетические причины этой аритмии. Одной из возможных генетических причин врожденной асистолии предсердий являются мутации в гене натриевого канала SCN5A.

Нарушения ритма сердца, обусловленные мутациями в гене натриевого канала SCN5A, могут сопровождаться нарушениями проводимости различной степени выраженности. Обычно мутации в гене SCN5A, приводящие к синдрому Бругада, реализуются через

снижение функции натриевого канала  $I_{Na}$ , т.е. приводят к снижению входящего натриевого тока  $I_{Na}$  [2]. Снижение натриевого тока может быть результатом действия нескольких возможных патологических механизмов [4]. Описаны мутации, как приводящие к прямому нарушению функции канала, со снижением его проницаемости для ионов натрия, времени его активации, инактивации и реактивации, так и снижение плотности нормальных субъединиц (вследствие нарушения стабильности мРНК при гаплонедостаточности, или вследствие нарушения транспорта белка к поверхности клетки) [3, 4]. Как правило, такие мутации приводят к преждевременному появлению стоп-кодона и синтезу укороченной мРНК. Такие мРНК часто не транслируются, а преждевременно деградируют по механизму NMD (nonsense-mediated RNA decay) и мутации такого рода в SCN5A будут реализовываться по механизму гаплонедостаточности [7]. В результате, несмотря на то, что мутантный белок с аномальными свойствами не транслируется, снижение плотности нормальных  $\alpha$ -субъединиц натриевого канала будет приводить к снижению суммарного натриевого тока.

Недавно был описан принципиально новый механизм реализации мутаций в гене SCN5A, являющихся причиной синдрома Бругада. Было показано, что нарушение взаимодействия белка  $Na_v1.5$  с анкирином G также может приводить к появлению признаков синдрома Бругада и развитию жизнеугрожающих аритмий [10]. Анкирины - белки, вовлеченные в фиксацию и стабилизацию мембранных белков, включая ионные каналы, транспортные белки и молекулы клеточной адгезии в различных тканях, включая сердце, мозг, эритроциты, почки и легкие. Анкирин G входит в состав сложного белкового комплекса, частью которого является и белок  $Na_v1.5$ , кодируемый геном SCN5A, а также является внутриклеточным регулятором токов  $Ca^{++}$  через взаимодействие с рецептором к инозитол-1,4,5-трифосфату на мембране эндоплазматического ретикула [10].

В литературе описан случай верификации мутации E1053K в анкирин-связывающем домене белка  $Na_v1.5$ , которая была выявлена у больного с синдромом Бругада [11]. При исследовании свойств мутантного белка было показано, что эта мутация нарушает связывание  $Na_v1.5$  и анкирина G. В результате нарушается транспорт белка  $Na_v1.5$  к поверхностной мембране Т-трубочек и вставочных дисков, включение его в белковый комплекс и достаточный уровень представленности натриевых каналов на поверхностной мембране кардиомиоцитов.

У части больных со снижением функции натриевых каналов наблюдается постепенная деградация волокон проводящей системы, что приводит к нарушению проведения импульса [9]. Прогрессирующее нарушение проводимости может быть следствием нарушения интеграции мутантного белка  $Na_v1.5$  в сложный белковый сигнальный комплекс, компонентами которого являются не только анкирин-G, N-кадгерин и минорные  $\beta$ -субъединицы, но и коннексины, функцией которых является обеспечение межклеточных щелевых контактов, которые позволяют электрическому

импульсу распространяться практически без задержек. Нарушение взаимодействия белка натриевого канала и молекул клеточной адгезии ведет к прогрессирующей дезорганизации клеточных контактов и нарушению путей распространения импульса.

В литературе описан случай верификации миссенс мутации (R367H) в гене SCN5A, которая детерминировала синдром Бругада. На ЭКГ у пациента были отмечены типичные изменения в виде элевации сегмента ST в правых грудных отведениях, которые сопровождалась асистолией предсердий и спонтанной фибрилляцией предсердий. Авторы указывают на ассоциацию генетических дефектов в гене SCN5A с асистолией предсердий [14].

Помимо мутаций в гене SCN5A, в качестве еще одной потенциальной причины асистолии предсердий рассматривают снижение экспрессии коннексинов в предсердиях, которая может привести к изменению электрической деятельности последних. Описан случай верификации мутации L212P в гене SCN5A у сына и его отца. У отца отмечен нормальный синусовый ритм, в то время как у сына отсутствовала P-волна на ЭКГ и правое предсердие не отвечало на электрическую стимуляцию. При дальнейшем генетическом картировании генов, отвечающих за функциональное состояние миокарда предсердий, у сына была выявлена мутация в гене Sx40, которая затем была выявлена у его клинически бессимптомной матери, от которой он ее и унаследовал. Авторы предполагают, что неполная пенетрантность, наблюдаемая

у больных с асистолией предсердий, частично может объясняться дигенным наследованием полиморфизма в предсердном коннексине 40 в сочетании с мутацией в гене SCN5A [8].

Также имеется наблюдение трех больных с асистолией предсердий, у которых было выявлено совместное наследование редкого генотипа Sx40 и мутации D1275N в гене SCN5A. Мутация D1275N приводит к небольшому деполяризующему сдвигу активации мутантного канала Nav1.5 по сравнению с белком дикого типа [6]. Таким образом, в основе асистолии предсердий могут лежать не только генетические дефекты в гене SCN5A, но и полиморфизм Sx40 также является возможным генетическим фактором в клинической манифестации этой наследственной аритмии.

Молекулярно-генетические исследования находятся на стадии стремительного развития. Все большее количество заболеваний, ранее считавшихся идиопатическими, раскрывают свою генетическую основу. За сравнительно небольшой период сделано множество удивительных открытий. Особенно важны эти открытия в области аритмологии, где знания о возможных механизмах патогенеза заболевания способствуют разработке наиболее оптимальных лечебно-профилактических мероприятий. Именно поэтому широкое исследование полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющих структурное и функциональное состояние проводящей системы и изучение его связи с различными нарушениями ритма представляет значительный интерес.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Заклязьминская Е.В. Генетические основы нарушений сердечного ритма, М., 2007.
2. Antzelevitch C., Brugada P., Brugada J., Brugada R. Brugada Syndrome: from cell to bedside // *Curr. Probl. Cardiol.* - 2005 - 30 (1) - P. 9-54.
3. Antzelevitch C., Brugada P., Brugada J. et al. Brugada Syndrome. A decade of progress // *Circulation Research.* - 2002 - Vol. 91. - P. 1114.
4. Chien K.R. Molecular basis of cardiovascular disease. A Companion to Braunwald's HEART DISEASE. - 2<sup>nd</sup> Ed. SAUNDERS, USA, 2004, P. 713.
5. Coppen S., Dupont E., Rothery S. et al. Connexin 45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart // *Circulation Research.* - 1998. - Vol. 82. - P. 232-243.
6. Groenewegen W. A., Firouzi M., Bezzina C.R. et al. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill circulation research // *Circ Res.* - 2006. 10/24 - Vol. 92. - P.14-22.
7. Khajavi M., Inoue K., Lupski J.R. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease // *Human Genetics advance online publication*, 7 June 2006; doi:10.1038/sj.ejhg.5201649.
8. Makita Naomasa, Sasaki Koji, Groenewegen W. A. et al. Congenital atrial standstill associated with coinheritance of a novel SCN5A mutation and connexin 40 polymorphisms // *Heart Rhythm.* - 2005. - Vol. 2. - P. 10.
9. Merigalli G.G., Wilde A.M., Tan H.L. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? // *Cardiovasc. Res.* - 2003 - Vol. 57. - P. 367-378.
10. Mohler P.J., Bennett V. Ankyrin-based cardiac arrhythmias: a new class of channelopathies due to loss of cellular targeting // *Curr. Opin. Cardiol.* - 2005 - Vol. 20. - P.189-193.
11. Mohler P.J., Rivolta I., Napolitano C. et al. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2008 - Vol. 101. - P.17533-17538.
12. Nguyen-Tran V.T.D., Kubalak S.W., Minamisawa S. et al. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages // *Cell.* - 2000. - Vol. 102. - P. 671-682.
13. Plum A., Hallas G., Magin T. et al. Unique and shared functions of different connexins in mice // *Curr.Biol.* - 2000. - Vol. 10. - P.1083-1091.
14. Takehara N., Makita N., Kawabe J. et al. A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill // *Journal of Internal Medicine* - 2004. Vol. 255 - P. 137-142.
15. Van der Welden. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat // *Cardiovasc. Res.* - 2000. - Vol. 46 - P. 476-486.
16. White T.W. and Bruzzone R. Gap junctions: fates worse than death // *Curr.Biol.* - 2000 - Vol.10. № 18. - P.685-688.
17. White T.W., Paul D.L. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions // *Annu. Rev. Physiol.* 1999. 61:283-310.