

Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура

О.А. Котик*, А.Б. Котлярова*, С.М. Марченко

*Вклад авторів рівний

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: kotuk.lena@gmail.com

Оптимізовано умови ізолювання ядер кардіоміоцитів, придатних для електрофізіологічних досліджень іонних каналів нативної ядерної мембрани. Визначальним критерієм результативності вивчення біофізичних властивостей транспортувальних систем нативної ядерної мембрани є збереження структурної та функціональної інтактності ізолюваних ядер. Оцінювання якості отриманих зразків здійснювали, реструючи іонні струми крізь ядерну мембрану методом patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patch у режимі фіксації потенціалу. В наших експериментах протестовано розчини різного складу та порівняно якість зразків, отриманих із застосуванням відмінних способів гомогенізації міокарда. Встановлено, що найчастіше зареєструвати активність іонних каналів ядерної мембрани вдавалося за умов ізолювання ядер у розчині такого складу (ммоль/л): цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2) з додаванням суміші інгібіторів протеаз, DL-дитіотриетолу (1 ммоль/л) та гліцерину, застосовуючи скляний гомогенізатор (Dounce).

Ключові слова: ядерна мембрана; кардіоміоцити; виділення ядерної фракції; нативна мембрана; patch-clamp; іонні канали.

ВСТУП

Ядра еукаріотів мають досить великі розміри порівняно з іншими клітинними органелами, що робить їх вдалим об'єктом для електрофізіологічних досліджень. Ядерна оболонка утворена двома функціонально відмінними мембранами [1]. Зовнішня мембрана є продовженням мембран ендоплазматичного ретикула [2], тому її можна використовувати для дослідження властивостей каналів, які в ньому експресовані. Із застосуванням таких методів, як флуоресцентна мікроскопія [3, 4], імуноблотинг [5], patch-clamp [5-7] тощо, було показано наявність іонних каналів у ядерній мембрані. Згідно з даними різних авторів, ядерна мембрана містить декілька типів каналів селективних для іонів калію [6], хлору [7, 8] та інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори [5, 6].

Вчені давно намагаються підібрати оптимальні умови для виділення ядер із різних типів тканин. Перші протоколи ізолювання ядер із застосуванням центрифугування в градієнті цукрози розробив Svedberg і співавт. ще у 40-х роках ХХ ст. Пізніше Potter (1946), Schneider (1948) та інші дослідники вдосконалили цей метод, застосовавши гіпертонічні розчини цукрози. Проте виділити цілісні ядра на той час ще не вдавалося (див. [9]). Визначальним критерієм якості об'єкту (ядра) для електрофізіологічних експериментів є збереження цілісності його мембран і функціональної активності іонних каналів, котрі в них експресовані.

Ядра придатні для такого типу досліджень уперше вдалось ізолювати з клітин печінки [7], згодом почали виділяти ядра з нейронів [6, 10], кардіоміоцитів [4, 11], культури

© О.А. Котик, А.Б. Котлярова, С.М. Марченко

клітин DT40-3КО [12]. Однак методичний підхід, який застосовують для ізолювання ядер із тканин одного типу, може виявитися непридатним для їх виділення з тканин інших типів через різницю в структурі клітин і тканин [9]. Наприклад, м'язова тканина є набагато жорсткішою порівняно з нервовою завдяки наявності міофіламентів та щільних контактів між клітинами. Попри велику кількість розроблених протоколів ізолювання ядер кардіоміоцитів [4, 11], відокремити їх в неушкоджену стані залишається доволі складним завданням. Запропоновані методи здебільшого є трудомісткими і тривалими в часі, що може призвести до модифікації білкової фракції та істотно вплинути на функціонування іонних каналів.

Найчастіше для вивчення властивостей внутрішньоклітинних іонних каналів методом patch-clamp використовують мікросоми або біліпідні шари [5, 13], однак за цих умов порушується природне оточення каналу та вплив на нього внутрішньоклітинних чинників. Тому важливим аспектом розуміння природи їх функціонування є дослідження в нативному стані, що стає можливим у разі ізолювання інтактних органел.

Метою цієї роботи було оптимізувати умови ізолювання ядер кардіоміоцитів, які були б придатними для електрофізіологічних досліджень іонних каналів у нативній ядерній мембрані.

МЕТОДИКА

Виділення ядер кардіоміоцитів. Дослідження проводили на щурах ліній Вістар та Фішер віком від 3 днів до 2 міс. Усі експериментальні процедури виконували відповідно до положень Європейської Конвенції із захисту тварин, яких використовують в експериментах (Страсбург, 1986). Після декапітації тварини швидко виділяли серце й поміщали в оксигенований розчин Кребса-Хенке такого складу (ммоль/л): NaCl – 118,1; NaHCO₃ – 25; KCl – 4,7; NaH₂PO₄ – 1,4; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 1;

глюкоза – 11,1 (pH 7,4) або розчин на основі NaCl, який містив (ммоль/л): NaCl – 150; HEPES – 10; EDTA – 1 (pH 7,4).

Після відмивання від крові серце переносили в розчин для гомогенізації, в якому його подрібнювали за допомогою скальпеля або мікрохірургічних ножиць. Для досліджень використовували як свіжовиготовлені, так і заморожені зразки. Перші відразу гомогенізували та проводили на них експеримент. Решту зразків заморожували в епендорфах у 1 мл розчину для гомогенізації, який виготовляли на основі калію глюконату (ммоль/л): калію глюконат – 150; EDTA – 1; HEPES – 10; HEPES-калієва сіль – 10 (pH 7,2) або цукрози різної концентрації (ммоль/л): 1) цукроза – 300; KCl – 60; HEPES – 10; EDTA – 2; EGTA – 0,5; 2) цукроза – 150; KCl – 60; HEPES – 10; EDTA – 1; 3) цукроза – 300; KCl – 60; HEPES – 10; 4) цукроза – 250; tris-HCl – 50; MgCl₂ – 5 (pH 7,2). Також у розчин для гомогенізації додавали інгібітор трипсину – соєвий (type I-S; 0,1 мг/мл) або з курячого яєчного білка (type II-O; 0,1-2 мг/мл) («Sigma», США) або суміш інгібіторів протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail tablets, «Roche», Німеччина) у концентрації зазначеній виробником та 1 ммоль/л DL-дитіотриетолу. Всі процедури виконували на охолодженій підставці. Розчини виготовляли на деіонізованій воді, використовуючи реагенти фірми «Sigma» (США) або «Roche» (Німеччина).

Гомогенізацію тканини проводили при 1-4°C із застосуванням скляного гомогенізатора об'ємом 2 мл (Dounce «Bellco Glass», США) або скляного гомогенізатора з тефлоновим поршнем. Отриманий гомогенат поміщали у центрифугу (miniSpin «Eppendorf AG», Гамбург, Німеччина) на 10 хв при 1000 g (4°C). Супернатант зливали, а осад ресуспендували розчином, що містив (ммоль/л): KCl – 150; HEPES – 8; HEPES-калієва сіль – 12; EGTA – 1 (pH 7,2) – далі робочий розчин KCl.

Суспензію поміщали в робочу камеру об'ємом 200 мкл (зі скляним дном) і залишали

на 5-7 хв для осідання ядер. Потім препарат відмивали від залишків інших органел робочим розчином KCl, яким заповнювали також і patch-піпетки. Докладніше про пристосування методичного підходу виділення ядер описано у розділі результати та їх обговорення. Візуалізацію ядер кардіоміоцитів проводили із використанням інвертованого мікроскопа («LEICA DM IRB», Німеччина).

Електрофізіологічні дослідження. Поодинокі іонні струми реєстрували, використовуючи метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patch у режимі фіксації потенціалу. Значення показників отримували за допомогою підсилювача Visual-Patch 500 («Bio-Logic», Франція). Patch-піпетки з опором від 9 до 14 МОм виготовляли з боросилікатного скла («Shutter Instruments», США). Індиферентний електрод Ag-AgCl був сполучений із робочою камерою через агаровий місток.

Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми Clampfit 10.3 («Axon Instruments», США). Для графічного зображення результатів використовували OriginPro 9.0 («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Властивості, а також функціональна роль іонних каналів ядерної мембрани до кінця не з'ясовані, очевидно, через труднощі пов'язані з виділенням ядер, котрі були б придатними для електрофізіологічних досліджень. Є припущення, що іонні канали ядерної мембрани беруть участь у підтриманні іонного балансу між цитоплазмою / нуклеоплазмою й люменом ядра [14, 15].

Структурна та функціональна інтактність ізолюваних ядер є визначальною у разі дослідження біофізичних властивостей транспортувальних систем нативної ядерної мембрани. При оптимізації протоколу ізолювання ядер слід враховувати мету дослідження, оскільки, наприклад, застосування імунологічних методів передбачає виділення

чистої фракції ядер без залишків органел, а для електрофізіологічних досліджень чистота фракції не є визначальною.

Відомо, що склад розчину для гомогенізації слід пристосовувати до різних типів тканин залежно від їх структури й жорсткості. Тому першим етапом роботи став підбір середовища оптимального складу для гомогенізації міокарда. Після виділення серця та відмивання від крові розчином Кребса-Хенке або на основі NaCl, його переносили в середовище для гомогенізації, подрібнювали та використовували в експериментах одразу або заморожували для подальшого використання.

Найчастіше для гомогенізації тканин використовують розчини на основі калію глюконату [6, 10] та цукрози різної концентрації [16, 17]. Ми тестували середовища різного складу узагальнені з кількох протоколів [5-7]. Спочатку тканину подрібнювали в розчині ($n = 8$), який раніше пристосовано для виділення ядер нейронів [6]. Однак, м'язова тканина є більш жорсткою, тому з метою збільшення густини середовища його виготовляли на основі цукрози (150 ммоль/л – 2 моль/л).

Наші результати засвідчують, що найкраще для виділення ядер підходить розчин, що містив (ммоль/л): цукроза – 300; KCl – 60; HEPES – 10; pH 7,2. На противагу цьому, середовища з цукрозою в концентрації менше ніж 300 ммоль/л (див. Методика) виявилися недостатньо густими, щоби повноцінно гомогенізувати тканину. У виділеній в ньому суспензії містилося мало інтактних ядер (3-4 ядра на камеру) і на них були залишки ендоплазматичного ретикулума ($n = 60$). Цукрозу також пробували застосовувати в концентрації 1-2 моль/л. У свіжовиділених в такому середовищі зразках ($n = 2$) вдалося зареєструвати іонні струми крізь ядерну мембрану, але при заморожуванні зразків, внаслідок меншої густини, вони піднімалися на поверхню і висихали, що робило їх непридатними для дослідження ($n = 1$).

Щоб збільшити густину, досить часто до розчину для гомогенізації тканин додають

гліцерин [9, 18]. Поверхня ядер, ізольованих у середовищі з додаванням гліцерину (200 мкл/мл) була достатньо очищена від залишків ендоплазматичного ретикулула. Відмінностей у якості зразків за додавання гліцерину перед або після заморожування не спостерігали.

Для запобігання активації протеаз до розчину для гомогенізації зразків додавали їх інгібітори. У ядрах зі зразків, виготовлених із додаванням інгібітора трипсину Type II-O ($n = 31$) в різних концентраціях, а також Type I-S ($n = 15$) активність іонних каналів спостерігали вкрай рідко, що може свідчити про ушкодження білкової фракції ядерної мембрани. Ядра, крізь внутрішню мембрану яких нам вдавалося систематично реєструвати іонні струми, виділяли з використанням суміші інгібіторів протеаз («Roche», Німеччина) та 1 ммоль/л DL-дитіотриетолу («Sigma», США) [5, 10], який відновлює дисульфідні зв'язки в молекулах білка.

Надалі ми підбирали оптимальний спосіб гомогенізації міокарда. Найбільш поширені процедури ізолювання ядер із кардіоміоцитів передбачають використання скляного гомогенізатора з тефлоновим поршнем [7], T-25 Ultra-Turrax probe (ІКА) [11], Dounce (скляний 2 мл із поршнем В) [6, 19] або Duall (скляний 1 мл із поршнем PTFE) [19]. До того ж, Мак і співавт. [19] наголошують, що потрібно спробувати кілька екземплярів тієї самої моделі, оскільки навіть серед них можуть бути значні відмінності. Для ізолювання ядер з нейронів застосовують металеву голку [10], однак для кардіоміоцитів такий метод не підходить через щільні контакти між клітинами міокарда та наявність міофіламентів, що робить тканину жорсткою.

Спочатку ми застосовували скляний гомогенізатор із тефлоновим поршнем і гомогенізували ним до отримання однорідної суспензії вручну (10-12 ходів поршня) або з використанням двигунного приводу (4-7 ходів). Потім гомогенат фільтрували крізь нейлонову тканину та центрифугували при 1000 g (4°C) упродовж 10 хв. Після

цього надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували в 1 мл робочого розчину КСІ. В ядер отриманих у такий спосіб мембрана була ушкодженою, гігаомні контакти не були стабільними, а в поодиноких випадках, коли вдавалося здійснити реєстрації, отримані записи містили багато артефактів.

Тому в наступних серіях експериментів ми використовували скляний ручний гомогенізатор Dounce (4-6 ходів поршня до утворення однорідної суспензії). Подальші процедури виконані згідно протоколу як і з застосуванням тефлонового гомогенізатора. У разі застосування скляного гомогенізатора, мембрана ядер була очищена від залишків ендоплазматичного ретикулула, легко утворювалися гігаомні контакти та вдавалося зареєструвати іонні струми через канали ядерної мембрани.

В описаних раніше протоколах ізолювання ядер для отримання максимально очищеної фракції застосовують багатоетапне диференційне центрифугування, яке займає від 25 хв до кількох годин [5, 7]. Для електрофізіологічних досліджень чистота виділеної фракції не є визначальною, оскільки після осідання ядер на дно камери, ми відмиваємо залишки інших органел великою кількістю (8-10 мл) робочого розчину КСІ. Завдяки цьому можна обмежитись одним центрифугуванням та скоротити його тривалість до 10 хв. Менша тривалість процедури ізолювання ядер зменшує ймовірність порушення функціональної інтактності каналів до початку експерименту. Такий спосіб виділення дав змогу отримати цілісні ядра кардіоміоцитів, очищені від залишків ендоплазматичного ретикулула (рис. 1). Помітної різниці між якістю ядер, виділених з кардіоміоцитів шурів ліній Вістар і Фішер не спостерігали. В обох випадках вдавалося реєструвати іонні струми через канали, зокрема калій-селективні катіонні канали великої провідності – LCC-канали (рис. 2).

Важливим етапом досліджень було встановлення оптимального віку тварин для

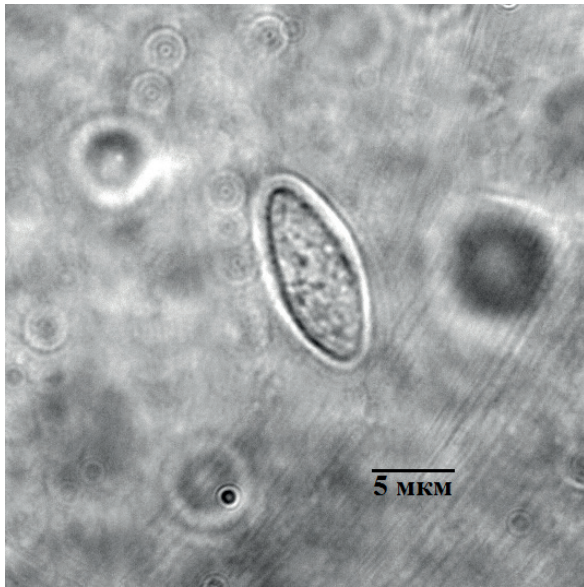


Рис. 1. Ізольоване ядро кардіоміоцита у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; рН 7,2

отримання достатньої кількості неушкоджених ядер кардіоміоцитів. Експериментальні процедури проводили на щурах віком від 3 діб до 2 міс. Активність іонних каналів вдавалося зареєструвати в ядерній мембрані кардіоміоцитів щурів усіх вікових груп. Тим не менше у тварин від 3 до 14 діб ($n = 19$)

міокард є невеликим і серцевої тканини недостатньо для виготовлення необхідної кількості заморожених зразків. Заморожування зразків дає змогу використовувати їх упродовж кількох днів з моменту виділення міокарда, що значно зменшує загальну тривалість проведення експериментів та кількість піддослідних тварин [10]. З'ясувалося, що виділяти ядра найкраще з міокарду щурів віком 3-4 тиж ($n = 200$). У тварин старшого віку (1,5-2 міс) кількість фіброblastів та ендотеліальних клітин у складі міокарда суттєво перевищує кількість кардіоміоцитів [20-22], що позначається, відповідно, і на відсотковому співвідношенні ізольованих ядер ($n = 16$).

Запропонована нами оптимізація методу ізолювання ядер кардіоміоцитів є простою в застосуванні завдяки відсутності таких детергентів, як NP-40 або Triton X-100, які зазвичай використовують для руйнування мембрани. Крім цього, вона дає змогу значно скороти тривалість процедури виділення ядер, що зменшує ймовірність ушкодження білків. Узагальнена схема виділення ядер кардіоміоцитів щура для реєстрації іонних струмів методом patch-clamp представлена на рис. 3.

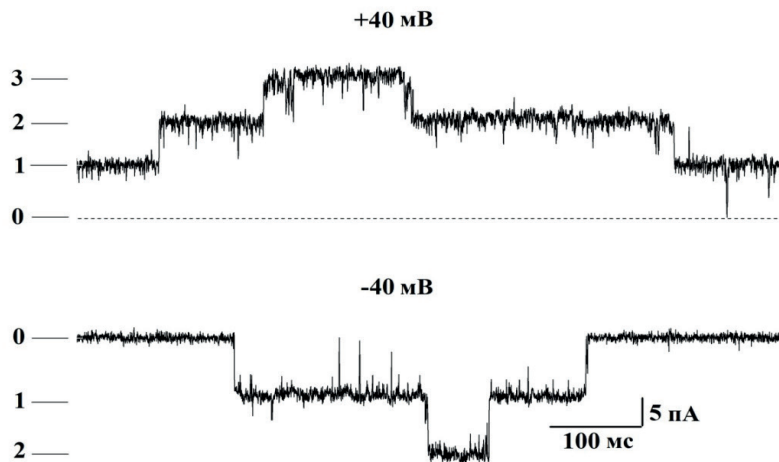


Рис. 2. Оригінальна реєстрація іонних струмів через катіонні канали великої провідності у внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів при потенціалах +40 мВ і -40 мВ; 0 – нульовий рівень (всі канали закриті), 1, 2, 3 – рівні відкривання одного, двох та трьох каналів відповідно; реєстрація в симетричному середовищі (ммоль/л): KCl – 150; HEPES – 8; HEPES-калієва сіль – 12; EGTA – 1 (рН 7,2)

Отже, нам вдалося оптимізувати умови ізолювання ядер кардіоміоцитів, які є придатними для patch-clamp реєстрації іонних струмів через внутрішню ядерну мембрану кардіоміоцитів. Для цього ядра найкраще ізолювати з міокарда щурів віком 3-4 тиж. Для виділення серця та відмивання його від крові підходять як оксигенований розчин Кребса-Хенке, так і на основі NaCl. Найбільш оптимальним складом розчину для гомогенізації виявився (ммоль/л): цукроза –

300; KCl – 60; HEPES – 10 (pH 7,2). Реєстрації активності іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани найчастіше вдавалося здійснити використовуючи для виділення ядер тканинний гомогенізатор Dounce і додаючи до розчину для гомогенізації суміш інгібіторів протеаз («Roche» Німеччина), гліцерин (200 мкл/мл) та DL-дитіотриетол (1 ммоль/л). Іонні струми через канали реєстрували як на свіжоізолюваних, так і на заморожених зразках.

Виділення серця та відмивання від крові

оксигенованим розчином Кребса-Хенке (ммоль/л): NaCl – 118,1; NaHCO₃ – 25; KCl – 4,7; NaH₂PO₄ – 1,36; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 1; глюкоза – 11,1 (pH 7,4), або розчином на основі NaCl (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 10, EDTA – 1 (pH 7,4)



Подрібнення міокарда

скальпелем або мікрохірургічними ножицями



Гомогенізація тканини

в розчині такого складу (ммоль/л): цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2) з додаванням 200 мкл/мл гліцерину та суміші інгібіторів протеаз «Roche». Використовуючи ручний гомогенізатор (Dounce) (4-6 ходів поршня)



Фільтрування отриманого гомогенату через нейлонову тканину



Центрифугування гомогенату

при 1000 g (4°C) упродовж 10 хв



Відбирання надосадової рідини та ресуспендування осаду

розчином KCl (ммоль/л): KCl – 150; HEPES – 8; HEPES-калієва сіль – 12; EDTA – 1 (pH 7,2)



Електрофізіологічне дослідження

Рис. 3. Узагальнена схема виділення ядер кардіоміоцитів щура для реєстрації іонних струмів методом patch-clamp

Подяка. Автори висловлюють вдячність м.н.с. Якубенко О.Б. за допомогу у виконанні досліджень та провідному науковому співробітнику, д.б.н. Ісаєвій О.В. за участь в обговоренні статті та корисні поради. Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом (17884) Державного фонду фундаментальних досліджень, а також за підтримки гранту «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів – 2017-2021» НАН України 0116U004470.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

О.А. Kotyk, А.В. Kotliarova, S.M. Marchenko

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF NUCLEI ISOLATION FOR ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDIES OF ION CHANNELS IN THE NUCLEAR MEMBRANE OF THE RAT CARDIOMYOCYTES

The conditions for the nuclei isolation from cardiomyocytes for electrophysiological studies of ion channels in the native nuclear membrane were optimized. The structural and functional intactness of isolated nuclei is crucial for investigation of the biophysical properties of the transport systems in the native nuclear membrane. The quality of the obtained sample was evaluated by ion currents recording through the nuclear membrane in nucleus-attached or excised patch configuration at voltage-clamp mode of patch-clamp technique. In our study the solutions with different compositions were tested and the quality of the samples obtained using different methods of myocardium homogenization were compared. We found that the activity of ion channels in the nuclear membrane were most often registered when myocardium was homogenized in solution with the next composition (mmol/l): sucrose – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2) with protease inhibitors cocktail, DL-dithiothreitol (1 mmol/l) and glycerol, using glass homogenizer (Dounce).

Key words: nuclear envelope; cardiomyocytes; nuclear frac-

tion isolation; native membrane; patch-clamp; ion channels.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Е.А. Котик, А.В. Котлярова, S.M. Марченко

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИЗОЛИРОВАНИЯ ЯДЕР ДЛЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

Оптимизировано условия изолирования ядер кардиомиоцитов пригодных для электрофизиологических исследований ионных каналов нативной ядерной мембраны. Определяющим критерием результативности изучения биофизических свойств транспортировочных систем нативной ядерной мембраны является сохранение структурной и функциональной интактности изолированных ядер. Оценку качества полученных образцов осуществляли путем регистрации ионных токов через ядерную мембрану с помощью метода patch-clamp в конфигурации nucleus-attached или excised patch в режиме фиксации потенциала. В наших экспериментах протестированы растворы различного состава, а также сравнивали качество образцов, полученных с применением различных способов гомогенизации миокарда. Установлено, что чаще всего зарегистрировать активность ионных каналов ядерной мембраны удавалось в условиях изолирования ядер в растворе такого состава (ммоль/л): сахараза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2) при добавлении смеси ингибиторов протеаз, DL-дитиотриетол (1 ммоль/л) и глицерина, применяя стеклянный гомогенизатор (Dounce).

Ключевые слова: ядерная мембрана; кардиомиоциты; выделение ядерной фракции; нативная мембрана; patch-clamp; ионные каналы.

REFERENCES

1. Mazzanti M, Bustamante JO, Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol Rev.* 2001; 81 (1): 1-19. doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.1.
2. Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 2001; 205: 149-214.
3. Arantes LAM, Aguiar CJ, Amaya MJ, Figueiro NCG, Andrade LM, Rocha-Resende C, et al. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 53 (4): 475-86. doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.06.017.
4. Zima AV, Bare DJ, Mignery GA, Blatter LA. IP₃-dependent nuclear Ca²⁺ signalling in the mammalian heart. *J Physiol.* 2007; 584 (2): 601-11. doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140731.

5. Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor - Interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 2005; 280 (16): 15912-20. doi.org/10.1074/jbc.M414212200.
6. Marchenko SM, Yarotsky VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC. Spontaneously active and InsP₃-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol.* 2005; 565 (3): 897-910. doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081299.
7. Tabares L, Mazzanti M, Clapham DE. Chloride channels in the nuclear membrane. *J Membr Biol.* 1991; 123 (1): 49-54.
8. Valenzuela SM, Martin DK, Por SB, Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, et al. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem.* 1997; 272 (19): 12575-82.
9. Nabbi A, Riabowol K. Isolation of Nuclei. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015; (8): 731-4. doi:10.1101/pdb.top074583.
10. Fedorenko OA, Marchenko SM. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus.* 2014; 24 (7): 869-76. doi.org/10.1002/hipo.22276.
11. Bergmann O, Jovinge S. Isolation of cardiomyocyte nuclei from post-mortem tissue. *J Vis Exp.* 2012 (65): 6. doi.org/10.3791/4205.
12. Betzenhauser MJ, Wagner LE, II, Park HS, Yule DI. ATP regulation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activity does not require walker A-type ATP-binding motifs. *J Biol Chem.* 2009; 284 (24): 16156-63. doi.org/10.1074%2Fjbc.M109.006452.
13. Matzke AJM, Weiger TM, Matzke M. Ion channels at the nucleus: electrophysiology meets the genome. *Mol Plant.* 2010; 3 (4): 642-52. doi.org/10.1093/mp/ssq013.
14. Marchenko SM, Thomas RC. Nuclear Ca²⁺ signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Cerebellum.* 2006; 5 (1): 36-42. doi.org/10.1080/14734220600554438.
15. Fedorenko OA, Marchenko SM. Spontaneously active ion channels of the nuclear envelope membrane. *Fiziol Zh.* 2010; 56 (5): 95-105 [Ukrainian].
16. Wilkie GS, Schirmer EC. Purification of nuclei and preparation of nuclear envelopes from skeletal muscle. *Methods Mol Biol.* 2008; 463: 23-41. doi.org/10.1007/978-1-59745-406-3_2.
17. Brewer O. Isolation of myogenic nuclei from whole muscle tissue. Undergraduate Honors Theses. 2015; 954.
18. Ikeda Y, Nakamura T, Takano H, Kimura H, Obata JE, Takeda S, et al. Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 2000; 135 (4): 353-9. doi.org/10.1067/mlc.2000.105617.
19. Mak D-OD, Vais H, Cheung K-H, Foskett JK. Isolating nuclei from cultured cells for patch-clamp electrophysiology of intracellular Ca²⁺ channels. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013; (9): 880-4. doi.org/10.1101%2Fpdb.prot073056.
20. Tirziu D, Giordano FJ, Simons M. Cell communications in the heart. *Circulation.* 2010; 122 (9): 928-37. doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847731.
21. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293 (3): H1883-H91. doi.org/10.1152/ajpheart.00514.2007.
22. Zhou PZ, Pu WT. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circulation Research.* 2016; 118(3):368-70.

Матеріал надійшов до редакції 28.11.2017