

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Бутовой Ксении Андреевны**  
**на тему: «Механизмы сократительной дисфункции левого и правого**  
**предсердий крыс при пароксизмальной фибрилляции предсердий**  
**вегетативного генеза»**  
**по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»**

**Актуальность избранной темы**

Диссертационная работа Бутовой Ксении Андреевны посвящена комплексному исследованию характеристик сократительной дисфункции предсердий, а также механизмов её развития в левом и правом предсердиях крысы при развитии предсердной фибрилляции, вызванной внутривенной инъекцией ацетилхолина- $\text{CaCl}_2$ . Фибрилляция предсердий является одним из наиболее распространенных типов сердечных аритмий, приводящих к развитию таких осложнений как инфаркт миокарда и сердечная недостаточность. Молекулярные механизмы развития фибрилляции предсердий до конца не ясны. Пароксизмальная (эпизодическая) форма предсердной фибрилляции является наименее исследованной. Принципиально новым аспектом данной диссертационной работы является оценка сократительной функции предсердий как при отсутствии внешней механической нагрузки, так и в условиях механического нагружения. Таким образом, актуальность цели, заключающаяся в оценке нарушения сократительной активности левого, и правого предсердий крысы, а также в раскрытии механизмов развития сократительной дисфункции предсердий при развитии их фибрилляции, не вызывает сомнений.

**Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 155 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, а также заключения, выводов, списков сокращений и литературы, цитируемой в исследовании. Список литературы включает 240 источников. Работа проиллюстрирована 37 рисунками, содержит 2 таблицы.

Обзор литературы демонстрирует достаточно обширные литературные данные о патогенезе фибрилляции предсердий. В нём представлены данные об эпидемиологии, факторах риска и клинических последствиях фибрилляции предсердий. Представлены современные концепции патогенеза фибрилляции предсердий, проведен обзор экспериментальных моделей инициации фибрилляции предсердий на лабораторных животных, а также описаны различия в структуре и функциях предсердий в норме и при развитии фибрилляции предсердий у лабораторных животных. Завершается литературный обзор главой, посвященной роли механической нагрузки в регуляции работы миокарда.

В главе «Материалы и методы» представлено подробное описание, а также иллюстрация проводимых экспериментов. Эксперименты выполнены на самцах крыс Вистар возрастом 10 недель. Инициация пароксизмальной формы фибрилляции предсердий вегетативного генеза была реализована при помощи модели внутривенной инъекции (в хвостовую вену в течение 7 суток) ацетилхолина- $\text{CaCl}_2$ . Подробно описана процедура изоляции одиночных кардиомиоцитов предсердий крысы по методу, разработанному диссертантом, с последующим проведением измерения и анализа характеристик изменения длины саркомеров в кардиомиоцитах предсердий при их механически ненагруженных укорочениях. Измерение динамики концентрации ионов кальция в цитозоле клетки ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) в сокращающихся кардиомиоцитах предсердий при их стимуляции электрическим полем выполнялось при помощи системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии LSM 710 и программного обеспечения Zen 2009 (Carl Zeiss, Германия). Для визуализации сигнала динамического изменения концентрации цитозольного кальция  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  использовали  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный флюорофор Fluo-8AM. Регистрация силы изолированных кардиомиоцитов выполнялась при их аутокотоническом режиме сокращения (т.е. при произвольном укорочении кардиомиоцита под механической нагрузкой) с использованием метода четырёх карбоновых волокон. Измерения механической активности изолированных полосок предсердий проводились с использованием двухканального аппаратно-программного комплекса, разработанного в лаборатории биологической подвижности ИИФ УрО РАН. Представлено подробное описание измерений прямого действия ацетилхолина на характеристики сократительной функции одиночных кардиомиоцитов крысы, измерений содержания активных форм кислорода и NO

в одиночных кардиомиоцитах предсердий, оценки степени фосфорилирования саркомерных белков, а также гистологической оценки структуры миокарда предсердий.

Имеется **вопрос** к методической части работы, в частности, к методике определения степени фосфорилирования саркомерных белков с использованием флуоресцентного красителя Pro-Q Diamond, выявляющего фосфатные группы белков в геле. При оценке степени фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С, лёгких регуляторных цепей миозина и ряда других саркомерных белков, учитывался ли возможный вклад степени фосфорилирования других мышечных белков, имеющих такую же или очень близкую электрофоретическую подвижность в геле?

#### **Научная новизна результатов и обоснованность основных положений диссертации, выносимых на защиту**

Первый и необходимый для выполнения последующих задач этап исследовательской работы заключался в выяснении отличительных особенностей сократительной функции левого и правого предсердий крысы в норме. В исследованиях, проведенных на уровне одиночных кардиомиоцитов, выделенных из левого или правого предсердий, не было выявлено различий в амплитудных и временных параметрах укорочения саркомеров при механически ненагруженных укорочениях кардиомиоцита, а также различий механического напряжения кардиомиоцита и концентрации ионов кальция в цитозоле в ходе цикла сокращения кардиомиоцита. Не было обнаружено достоверных различий по всем анализируемым параметрам аутокотонического напряжения кардиомиоцитов, выделенных из левого и правого предсердий. Не было выявлено различий в степени фосфорилирования миозин-связывающего белка С, лёгких регуляторных цепей миозина, тропомиозина и тропонина I в кардиомиоцитах, выделенных из левого и правого предсердий, однако обнаружен повышенный (в ~2 раза) уровень фосфорилирования тропонина T в кардиомиоцитах левого предсердия крысы. **Вопрос:** чем могут быть вызваны подобные различия?

В исследованиях на тканевом уровне организации миокарда (с использованием многоклеточных препаратов, выделенных из левого и правого предсердий) также наблюдалась однородность основных характеристик

сократительной функции. Однако в препаратах правого предсердия крысы были зарегистрированы меньшие величины пассивного напряжения (пассивной жёсткости) при более выраженной зависимости «длина-сила» по сравнению с препаратами левого предсердия.

Второй этап исследовательской работы был посвящен выполнению ряда задач, сгруппированных в два смысловых блока: (1) Оценка ремоделирования сократительной функции предсердий и определение паттерна различий в характеристиках жёсткости и сократимости левого и правого предсердий крысы при индуцированной пароксизмальной фибрилляции предсердий; (2) Анализ молекулярных механизмов, участвующих в изменении сократительной функции левого и правого предсердий крысы при индуцированной пароксизмальной фибрилляции предсердий. При выполнении этого этапа научно-исследовательской работы диссертантом получены следующие результаты:

- При исследовании сократительной функции механически ненагруженных кардиомиоцитов при развитии индуцированной фибрилляции предсердий выявлено, что в миоцитах левого предсердия фибрилляция приводила к уменьшению амплитуды укорочения саркомеров и уменьшению максимальной скорости расслабления в сравнении с этими параметрами для кардиомиоцитов правого предсердия. В кардиомиоцитах левого предсердия крысы обнаружено также уменьшение конечно-диастолической длины саркомеров, тогда как в правом предсердии наблюдалось увеличение этого показателя. Полученные результаты позволили автору сделать **обоснованный** вывод, что индуцированная пароксизмальная фибрилляция предсердий приводит к нарушению сократительной функции механически ненагруженных кардиомиоцитов только левого предсердия.

- При исследовании сократительной функции кардиомиоцитов при действии механической нагрузки, обнаружено, что ацетилхолин- $\text{CaCl}_2$ -индуцированная фибрилляция предсердий приводила к выраженным нарушениям параметров аукотонического напряжения только в кардиомиоцитах правого предсердия (наблюдалось снижение амплитуды аукотонического напряжения и максимальной скорости расслабления кардиомиоцитов).

- При исследовании сократительной функции на тканевом уровне организации миокарда было показано, что пароксизмальная фибрилляция предсердий приводила к изменению характера длинозависимой регуляции силы.

В частности, наблюдалось увеличение коэффициента наклона зависимости «длина-активная сила» изометрического сокращения на ~39% в левом предсердии и на 26% в правом предсердии. Однако достоверного изменения величин активного и пассивного напряжения во всём диапазоне диастолических растяжений в предсердиях не наблюдалось. Резюмируя последних два результата, диссертантом сделано обоснованное заключение, что с увеличением уровня организации миокарда наблюдаются менее выраженные различия в параметрах сократительной функции между левым и правым предсердиями. Однако при действии механической нагрузки нарушения сократительной функции более выражены в правом, а не левом предсердиях.

- При исследовании вклада холинергического компонента вегетативной нервной системы в ремоделирование параметров сократительной функции миокарда левого и правого предсердий крысы как в норме, так и при развитии ацетилхолин- $\text{CaCl}_2$ -индуцированной фибрилляции предсердий была выполнена серия экспериментов с прямым влиянием ацетилхолина на суспензию кардиомиоцитов. Полученные результаты показали, что гиперактивация холинергического звена вегетативной нервной системы в незначительной степени влияет на сократительную функцию кардиомиоцитов предсердий при развитии пароксизмальной фибрилляции предсердий.

- При исследовании изменений содержания активных форм кислорода (АФК) и NO в одиночных кардиомиоцитах предсердий крысы при развитии пароксизмальной фибрилляции предсердий, выявлено, что содержание АФК увеличивалось в ~2.6 раза и в ~2.8 раза в кардиомиоцитах левого и правого предсердий, соответственно. При этом наблюдалось значительное уменьшение содержания NO в кардиомиоцитах левого предсердия (в ~39 раз) и в правого предсердия (в ~26 раз). Высказано предположение, что выявленные изменения могут оказывать негативное влияние на сократительную функцию предсердий крысы при развитии ацетилхолин- $\text{CaCl}_2$ -индуцированной фибрилляции предсердий.

- При исследовании изменений степени фосфорилирования саркомерных белков в предсердиях крысы при развитии пароксизмальной фибрилляции предсердий обнаружено статистически значимое уменьшение уровня фосфорилирования миозин-связывающего белка С на ~56% и тропонина I на ~42% в левом предсердии. Обсуждается негативная роль этих изменений в

ухудшении сократительной способности кардиомиоцитов левого предсердия при развитии фибрилляции предсердий. В правом предсердии статистически значимых изменений уровня фосфорилирования ряда саркомерных белков при развитии фибрилляции предсердий не выявлено. Наблюдалась только тенденция к увеличению уровня фосфорилирования регуляторных цепей миозина в правом предсердии крыс. **Вопрос:** какие, предположительно, молекулярные механизмы ответственны за выявленные изменения степени фосфорилирования саркомерных белков в предсердиях крысы?

- При анализе морфологических параметров кардиомиоцитов и ткани предсердий при развитии пароксизмальной ацетилхолин- $\text{CaCl}_2$ -индуцированной фибрилляции предсердий обнаружено статистически значимое увеличение длины кардиомиоцитов (на ~12%), увеличение содержания коллагена (на 33%) и уменьшение объёма миофибрилл (в 1.2 раза) в левом предсердии крысы. Подобные изменения в правом предсердии (кроме чуть менее выраженного уменьшения числа миофибрилл) не наблюдались.

Имеется еще один **вопрос** к результатам данного исследования. На стр. 109 автор пишет, что по количеству параметров сократительной функции, подвергшихся изменению, можно сделать вывод, что в механически нагруженных условиях именно правое предсердие становится более уязвимым при развитии фибрилляции предсердий. И что это не согласуется с данными предшествовавших исследований, указывающих на бóльшую уязвимость электрофизиологических параметров в левом предсердии при развитии фибрилляции предсердий. **Вопрос:** чем можно объяснить выявленные несоответствия в результатах?

В главе «Обсуждение результатов» диссертант обобщает и обсуждает результаты своих исследований, делая ряд обоснованных заключений, а также высказывая ряд предположений. Так, сделано предположение, что в основе неодинаковой пассивной жёсткости миокарда левого и правого предсердий крысы в норме лежат различия в уровнях фосфорилирования разных изоформ титина и, в частности, – гиперфосфорилирование N2B-участка молекулы этого белка в правом предсердии. Однако эксперименты в этом направлении автором проведены не были, несмотря на то что имелась техническая возможность оценить с помощью Pro-Q Diamond общий уровень фосфорилирования изоформ титина в предсердиях крысы. В связи с этим, высказанное выше предположение

выглядит в некоторой мере спекулятивным. Однако данное **замечание** не носит принципиального характера, а является сугубо субъективным замечанием, указывающим направления будущих исследований.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты, полученные Бутовой К.А., показывающие, что ацетилхолин- $\text{CaCl}_2$ -индуцируемая фибрилляция предсердий приводит к нарушению сократительной функции обоих предсердий миокарда крысы, несомненно, имеют большое теоретическое значение, поскольку расширяют представления о молекулярно-клеточных механизмах развития фибрилляции предсердий, а также прогрессирования сократительной дисфункции сердечной мышцы в целом. Одним из важных фундаментальных результатов, на котором следует акцентировать внимание, является следующий: выявлена однородность параметров сократительной функции кардиомиоцитов левого и правого предсердий наряду с неоднородностью пассивной жёсткости этих отделов сердца на тканевом уровне в норме, тогда как при развитии фибрилляции предсердий наблюдается однородность пассивной жёсткости предсердий на тканевом уровне и неоднородность характеристик сокращения на клеточном уровне организации. Дальнейший поиск ответов на вопрос о том, что лежит в основе вышеуказанных изменений является перспективным и актуальным направлением научных исследований.

С прикладной точки зрения результаты работы Бутовой К.А. могут быть использованы как для разработки новых животных моделей предсердной аритмии, так и для поиска новых подходов коррекции нарушений ритма сердца.

### **Достоверность результатов исследования**

Достоверность представленных в диссертации результатов обусловлена использованием современных и адекватных для решения поставленных задач методов, а также грамотным применением методов статистического анализа данных. Научные положения и выводы соответствуют поставленным задачам и согласуются с современными представлениями о молекулярно-клеточных основах электрофизиологических свойств кардиомиоцитов. Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями статей в рецензируемых

высокорейтинговых научных журналах (5 статей, из которых одна с импакт-фактором 7,6), а также выступлениями на научных конференциях.

### **Замечания**

Обнаружен ряд опечаток/орфографических ошибок, в частности:

- стр. 25, во фразе «...может вызывать CaMK II через...» пропущено, по всей вероятности, слово «активацию».
- стр. 25, опечатка в слове «тика», должно быть, по всей вероятности, «типа».
- стр. 37, последовательный повтор фразы «к возникновению».
- стр. 44, вместо «пути» должно быть «путей».
- стр. 112, лишнее слово во фразе «...были предполагаются другие...».

Вопросы, заданные выше, имеют дискуссионный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертации. Диссертационную работу Бутовой К.А. безусловно можно квалифицировать как исследование, внёсшее большой вклад в решение современной научной проблемы, посвящённой раскрытию механизмов развития фибрилляции предсердий у млекопитающих. В частности, впервые получены данные, позволяющие в комплексе оценить сократительную функцию миокарда предсердий на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях организации в норме и при пароксизмальной форме фибрилляций предсердий вегетативного генеза.

### **Заключение**

Диссертационная работа Бутовой К.А. является актуальным исследованием в области физиологии человека и животных, в частности, в области электрофизиологии сердца. Новые данные, полученные в исследовании Бутовой К.А., вносят существенный вклад в фундаментальную физиологию сердца и дают новые представления о природе развития фибрилляции предсердий. Диссертация Бутовой К.А. на тему «Механизмы сократительной дисфункции левого и правого предсердий крыс при пароксизмальной фибрилляции предсердий вегетативного генеза» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных» по биологическим наукам, а именно

следующим направлениям «Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации» и «Исследование закономерностей физиологических процессов и функций отдельных систем и органов организма человека и животных разных таксонов в норме и эксперименте». Диссертационное исследование Бутовой К.А. соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова». Диссертация оформлена, согласно приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова». Считаю, что соискатель Бутова Ксения Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

Главный научный сотрудник с возложением  
обязанностей заведующего лабораторией  
структуры и функций мышечных белков  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук (ИТЭБ РАН)   
доктор биологических наук

Вихлянцев Иван Милентьевич

22 апреля 2024 года

142290, Московская область, город Пущино, улица Институтская, 3, ИТЭБ РАН,  
тел.:  
e-mail:  
Специальность, по которой защищена докторская диссертация – 03 .01.02 –  
биофизика.