

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бутова Ксения Андреевна

**МЕХАНИЗМЫ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЛЕВОГО И
ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЙ КРЫС ПРИ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ
ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО ГЕНЕЗА**

Специальность – 1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на базе Федерального государственного учреждения науки «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук» (ИИФ УрО РАН) в лаборатории трансляционной медицины и биоинформатики и лаборатории биологической подвижности.

Научные руководители:

Проценко Юрий Леонидович – доктор биологических наук, доцент

Хохлова Анастасия Дмитриевна – кандидат физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Кузьмин Владислав Стефанович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, доцент.

Азаров Ян Эрнестович – доктор биологических наук, доцент, Институт физиологии Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН), лаборатория физиологии сердца; главный научный сотрудник.

Вихлянцев Иван Миленьевич – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», лаборатория структуры и функции мышечных белков; заведующий.

Защита диссертации состоится «13» мая 2024 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2944>

Автореферат разослан «12» апреля 2024 г

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.015.7,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности. Фибрилляция предсердий (ФП) является одним из самых распространенных (~3% в мировой популяции и ~1% в РФ по данным Европейского общества кардиологов (Hindricks et al., 2020; Li et al., 2022) нарушением ритма, представляя тем самым важнейшую кардиологическую проблему.

ФП представляет собой быстрые, хаотичные и дезорганизованные сокращения предсердного миокарда, вызванные возникновением неупорядоченного фронта деполяризации предсердных камер (Ladwig et al., 2020). ФП связана с ~1.5–3.5-кратным повышением риска смертельного исхода и инвалидизации вследствие развития тяжёлых осложнений (Hindricks et al., 2020). В число наиболее опасных осложнений ФП входят вызванные тромбоэмболическим синдромом инсульт и инфаркт миокарда, а также сердечная недостаточность – синдром, проявляющийся в виде нарушения способности сердца к наполнению желудочков и/или к генерации нормальной фракции выброса в сердечном цикле (Терещенко и соавт., 2020, Аракелян и соавт., 2021). Дезорганизованные сокращения предсердных камер могут приводить к сердечной недостаточности. Так, в норме в сердце анатомически сопряжённые с желудочками предсердия модулируют их работу, выполняя резервуарную функцию для венозного возврата во время систолы желудочков, проводниковую функцию во время ранней диастолы желудочков и насосную функцию для увеличения наполнения желудочков в конце диастолы (Habibi et al., 2017; Кобалава и соавт., 2017). Следовательно, неупорядоченные сокращения предсердных камер при ФП будут приводить к нарушению наполнения желудочков вследствие изменения предсердно-желудочкового взаимодействия (Lau et al., 2016; Кобалава et al., 2017; Hiram et al., 2019).

В российских и зарубежных клинических рекомендациях на основании тяжести течения и длительности аритмии приводят следующую классификацию ФП (Hindricks et al., 2020; Аракелян и соавт., 2021):

1. Впервые диагностированная ФП (независимо от тяжести аритмии);
2. Эпизодическая, или пароксизмальная ФП (купируется самостоятельно и/или в результате вмешательства в течение 7 суток после ее начала);
3. Персистирующая ФП (длительность эпизодов ФП более 7 суток, включая эпизоды, купированные медикаментозной или электрической кардиоверсией спустя 7 суток и более после её начала);
4. Длительно персистирующая ФП (длительность эпизодов ФП более 1 года при условии выбора стратегии контроля предсердного ритма);

5. Постоянная ФП (форма длительной ФП, при которой врачом и пациентом принимается согласованное решение не предпринимать попытки восстановления и/или поддержания синусового ритма).

Длительные формы ФП стойко ассоциированы с развитием перечисленных выше тромбоэмболических осложнений, нарушением предсердно-желудочкового взаимодействия и сократительной дисфункции сердца (Hindricks et al., 2020; Reddy et al., 2020; Терещенко и соавт., 2020). Однако, функциональные последствия, возникающие при пароксизмальной форме ФП, неочевидны ввиду краткой длительности и возможности спонтанного прекращения нарушения ритма.

В здоровом сердце структурные и молекулярно-клеточные характеристики сократительной функции левого (ЛП) и правого (ПП) предсердий отличаются друг от друга (Kahr et al., 2011; Aroga et al., 2017), что необходимо для их пространственно-временной координации в сердечном цикле. Данные отличия могут приводить к различной степени изменения параметров сократительной функции ЛП и ПП при действии патологических факторов (D'Ascenzi et al., 2014; Hiram et al., 2019) и к межпредсердным особенностям механизмов ремоделирования миокарда. Ранее было показано, что роль ЛП и ПП в возникновении и поддержании ФП отличаются (Schotten et al., 2003; Chen et al., 2014; Linz et al., 2019), что обусловлено их различиями в плотности ионных токов (Schram, et al., 2002), иннервации и их чувствительности к медиаторам нервной системы, вовлекаемым в формирование субстрата ФП (Sarmast et al., 2003; Huang et al., 2006; Linz et al., 2014). Изменения сократительной функции при ФП было исследовано только на примере ПП (Wakili et al., 2010), а, как следует из вышесказанного, оценка сократительной дисфункции предсердий при ФП должна быть представлена анализом как левых, так и правых отделов сердца.

Особый интерес при развитии ФП представляет структурно-функциональное ремоделирование ЛП и ПП на разных уровнях организации миокарда. Исследование на уровне одиночных кардиомиоцитов дает возможность проанализировать сократительные характеристики миокарда предсердий, исключив влияние соединительной ткани и соседних кардиомиоцитов друг на друга. Эксперименты на уровне многоклеточных препаратов позволяют подробно исследовать силогенерацию миокарда при задании различных механических условий сокращения, а также дать оценку работы сердечной мышцы в более физиологических условиях функционирования и установить вклад соединительнотканного компонента в сократимость миокарда предсердий. Исследование степени фосфорилирования сократительных белков саркомеров позволяет предположить молекулярные механизмы изменения сократительной функции миокарда при ФП.

Принципиально новым аспектом данного исследования является оценка сократительной функции миокарда предсердий при ФП как при отсутствии внешней механической нагрузки, так и в условиях механического нагружения (при изменении режима сокращения и при диастолическом растяжении препарата). С одной стороны, измерения в отсутствие механической нагрузки дают возможность выявить вызванные ФП нарушения сократимости предсердий *per se*, исключив влияние механозависимых путей регуляции. С другой стороны, механическая нагрузка является неотъемлемым фактором, определяющим сократительную функцию сердца. В контексте патогенеза ФП известно, что растяжение предсердных камер приводит к таким электрофизиологическим изменениям как генерация внеочередного потенциала действия в кардиомиоцитах предсердий, замедление скорости распространения импульса от синоатриального узла к атриовентрикулярному соединению и формирование неоднородного фронта распространения электрического возбуждения (Bode et al., 2000; Saygili et al., 2007; Ravelli et al., 2011; Walters et al., 2014). Следовательно, оценка влияния механической нагрузки на функцию миокарда предсердий важна для исследования формирования механического субстрата прогрессирования аритмии. Исследование зависимостей «длина-пассивная сила», «длина-активная сила» необходимо для анализа жесткости миокарда и длинозависимой регуляции силы сокращения (зависимость Франка–Старлинга) предсердных камер, что позволит сделать предположения о характере адаптационной способности миокарда предсердий при изменении объема притекающей крови.

Согласно современной концепции патофизиологии ФП, важнейшим компонентом инициации и прогрессирования нарушений ритма в предсердиях является активация вегетативной нервной системы (ВНС) (Chen et al., 2014; Lau et al., 2016). Сочетанная активация симпатических и парасимпатических звеньев ВНС приводит к аритмогенным изменениям внутриклеточной динамики Ca^{2+} и способствует формированию устойчивого субстрата для развития ФП за счёт формирования множественных циклов re-entry – повторного входа электрического возбуждения (Chen et al., 2014; Linz et al., 2019; Saljic et al., 2022). В связи с этим, в данной работе оценка межпредсердных особенностей сократительной дисфункции и механизмов ее развития рассматривается в модели ацетилхолин (АЦХ)- $CaCl_2$ -индуцированной ФП. Данная модель позволяет воспроизвести вегетативный генез суправентрикулярных нарушений ритма в лабораторных условиях за счёт активации парасимпатического звена ВНС медиатором АЦХ и активации симпатического звена за счет увеличения концентрации Ca^{2+} (Sharifov et al., 2004; Dianat et al., 2015). Дополнительные эксперименты по острому воздействию АЦХ на одиночные

кардиомиоциты предсердий позволяют проанализировать вклад увеличения концентрации АЦХ в нарушение сократительной функции кардиомиоцитов.

Таким образом, ***цель диссертационной работы*** – оценить нарушения сократительной активности ЛП и ПП, изменение функциональных различий между ними и камероспецифические механизмы развития сократительной дисфункции предсердий при пароксизмальной ФП вегетативного генеза.

Сократительную активность миокарда предсердий анализировали по совокупности характеристик, включающих: амплитудные и временные характеристики укорочения саркомеров, механического напряжения (нормированной силы) кардиомиоцитов, коэффициенты наклонов зависимостей «длина-пассивная сила» и «длина-активная сила». Для анализа электромеханического сопряжения оценивали амплитудные и временные характеристики изменения концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в цитозоле кардиомиоцитов в процессе их сокращения-расслабления и содержание Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (СР).

С учётом обозначенных характеристик для достижения цели были поставлены и выполнены следующие задачи:

1. Сравнить амплитудные и временные характеристики укорочения саркомеров, механического напряжения и изменения $[Ca^{2+}]_i$ в одиночных кардиомиоцитах, а также степень длинозависимой активации (коэффициенты наклонов «длина-сила») многоклеточных препаратов миокарда ЛП и ПП и установить степень межпредсердных различий в норме;

2. Исследовать изменение характеристик сократительной функции ЛП и ПП и выявить межпредсердные различия между ними при пароксизмальной ФП в зависимости от механической нагрузки:

2.1. Проанализировать амплитудные и временные характеристики укорочения саркомеров, изменения $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах ЛП и ПП в отсутствие их механического нагружения и выяснить степень межпредсердных различий по этим параметрам;

2.2. Проанализировать амплитудные и временные характеристики механического напряжения одиночных кардиомиоцитов в ауксотоническом режиме сокращения и выяснить степень межпредсердных различий по этим параметрам;

2.3. Проанализировать коэффициенты наклонов зависимости «длина-сила» и величины пассивного и активного напряжения многоклеточных препаратов миокарда ЛП и ПП в ауксотоническом и изометрическом режимах сокращения и выяснить степень межпредсердных различий по этим параметрам;

3. Исследовать изменение продукции АФК, NO и степени фосфорилирования сократительных белков саркомера как возможных участников молекулярно-клеточных механизмов сократительной дисфункции ЛП и ПП при пароксизмальной ФП и определить их камероспецифичность.

Научная новизна исследования. (1) Впервые дана интегративная оценка сократительной функции миокарда предсердий на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях организации миокарда в норме и при пароксизмальной форме ФП вегетативного генеза; (2) Впервые проведено сравнение межпредсердных особенностей динамики укорочения саркомеров, активного напряжения кардиомиоцитов и длинозависимого изменения силы полосок миокарда крыс в норме и при ФП; (3) Обнаружено, что в норме ЛП и ПП не отличаются по характеристикам сокращения и силогенерации миокарда, но отличаются по характеристикам пассивного напряжения. Полученные результаты не согласуются с данными предшествующих исследований, сообщающих об электрофизиологических различиях между ЛП и ПП; (4) Установлено, что камероспецифичное ремоделирование предсердий при пароксизмальной ФП приводит к появлению различий характеристик сократительной функции ЛП и ПП; (5) Проведена оценка сократительной функции миокарда предсердий при ФП в зависимости от действующей на миокард механической нагрузки. Показано, что механическая нагрузка может определять межпредсердные особенности сократительной дисфункции предсердий.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты являются актуальными и значимыми для физиологии сердца и трансляционной медицины и включают как фундаментальные, так и прикладные аспекты.

В работе проанализированы межпредсердные различия характеристик сократительной функции на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях организации миокарда. Полученные данные о биомеханической активности предсердий дополняют представления о сердце как функционально неоднородном органе. Также фундаментальная значимость исследования заключается в получении новых данных о механизмах ремоделирования сократительной функции миокарда предсердий при пароксизмальной ФП вегетативного генеза. Установлена камероспецифичность механизмов ремоделирования сократительной функции миокарда предсердий при пароксизмальной ФП.

Обнаружено, что при пароксизмальной ФП наиболее уязвимым отделом к развитию сократительной дисфункции является ПП ввиду его большей чувствительности к механической нагрузке. Однако более выраженные молекулярно-клеточные изменения в миокарде ЛП вносят вклад в изменение морфофункциональных различий между

предсердными камерами, что может лежать в основе формирования субстрата для перехода от пароксизмальной ФП к длительным формам аритмий.

Методология и методы исследования. Эксперименты выполнены на самцах крыс Вистар возрастом 10 недель в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU и заключения этического комитета Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (ИИФ УрО РАН) № 06/20. Нарушения ритма предсердий инициировали при помощи модели пароксизмальной АЦХ- CaCl_2 -индуцированной ФП (Zou et al., 2016). Одиночные кардиомиоциты получали ретроградной перфузией изолированного сердца с модификациями (Butova et al., 2021). Для исследования прямого влияния АЦХ на сократительную функцию кардиомиоцитов ЛП и ПП интактных животных суспензии клеток инкубировались в растворе Тирод, содержащем АЦХ в концентрациях 0, 1, 10 и 100 мкМ в течение 10 минут.

Анализ сократительной функции кардиомиоцитов проводили по амплитудным и временным/скоростным характеристикам изменения длины саркомеров и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле при механически ненагруженных сокращениях, а также по характеристикам активного напряжения при механическом нагружении клеток 4 карбоновыми волокнами (Iribe et al., 2014; Volzhaninov and Khokhlova, 2020). Измерения выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса MCSYS-02 (IonOptix, США). Динамические изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле оценивали с использованием Ca^{2+} -чувствительного флюорофора Fluo-8AM (ААТ Bioquest, США) на системе лазерной сканирующей конфокальной микроскопии LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Содержание Ca^{2+} в СР определяли по амплитуде изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванного воздействием кофеина в концентрации 10 мМ.

Характеристики зависимости «длина-сила» многоклеточных препаратов (изолированных полосок) ушек ЛП и ПП при их диастолическом растяжении исследовали при помощи аппаратно-программного комплекса лаборатории биологической подвижности ИИФ УрО РАН.

Внутриклеточное содержание активных форм кислорода ($[\text{АФК}]_i$) и оксида азота ($[\text{NO}]_i$) в изолированных кардиомиоцитах определяли с использованием флюорофоров DHE (Sigma Aldrich, США) и DAF-FM (ThermoFisher Scientific, США) при комнатной температуре в отсутствие электрической стимуляции.

Анализ степени фосфорилирования белков саркомера осуществляли методом гелелектрофореза с окрашиванием Pro-Q Diamond (Invitrogen, США) и SYPRO Ruby (Invitrogen, США).

Для определения толщины свободных стенок предсердий и плотности распределения ядер применялось стандартное окрашивание гематоксилином и эозином.

Для оценки соединительнотканного компонента срезы окрашивались с использованием 0.1% пикросириус красный (ab150681, Abscam, Великобритания). Для определения количества миофибрилл и гликогена использовалась периодическая кислота Шиффа с окрашиванием метиленовым синим.

Все эксперименты были проведены на базе ИИФ УрО РАН. Сбор и анализ данных выполнялся при помощи специального программного обеспечения IonWizard (IonOptix, США), Zen 2009 (Carl Zeiss, Германия), EqarAll версии 6 и 6.0 (ИИФ УрО РАН, Россия), FIJI ImageJ (US National Institutes of Health, США) и Excel 16 (Microsoft Corp, США). Статистический анализ полученных данных осуществлялся при помощи пробной версии программы GraphPad Prism 8.0 (Origin Lab, США) и R Studio (RStudio Team, Integrated Development for R., США).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В норме миокард ЛП и ПП крыс характеризуется однородностью характеристик сократительной функции на клеточном уровне и неоднородностью пассивных свойств миокарда на тканевом уровне – миокард ПП имеет меньшую величину пассивного напряжения и большую крутизну зависимости «длина-пассивная сила» по сравнению с ЛП.

2. Камероспецифичное ремоделирование ЛП и ПП при пароксизмальной ФП приводит к появлению межпредсердных различий в характеристиках сократительной функции на клеточном уровне организации миокарда.

3. В механически ненагруженных кардиомиоцитах пароксизмальная ФП приводит к уменьшению амплитуды укорочения и скорости расслабления саркомеров в кардиомиоцитах ЛП, но не в кардиомиоцитах ПП.

4. Механическая нагрузка может изменять межпредсердные особенности сократительной дисфункции предсердий при ФП. При механическом нагружении кардиомиоцитов уменьшается амплитуды активного напряжения и скорости расслабления кардиомиоцитов ПП, но не ЛП. В многоклеточных препаратах увеличиваются наклоны зависимости «длина-активная сила» обоих предсердий и уменьшается коэффициент крутизны зависимости «длина-пассивная сила» ПП.

5. Дисфункция саркомеров в миокарде ЛП при ФП обусловлена снижением числа саркомеров, увеличением продукции АФК и снижением степени фосфорилирования сМуВР-С и TnI. В миокарде ПП увеличение уровня АФК происходит в меньшей степени, чем в ЛП, а увеличение степени фосфорилирования RLC может вносить вклад в поддержание сократимости саркомеров при ФП.

Степень достоверности научных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментов, применением современных методов исследования, а также статистическим анализом полученных данных.

Публикации. По материалам работы опубликовано 5 работ из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах, входящих в базы данных SCOPUS и Web of Science.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на XXVII и XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, Россия, 2021 и 2023 год, отмечены дипломами I и II степени за лучший устный доклад), Российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» памяти члена-корреспондента РАН В.С. Мархасина (Екатеринбург, Россия, 2021), IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школе-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022» (Сыктывкар, Россия, 2022 год, отмечен дипломом II степени за лучший устный доклад), VII Съезде биофизиков России (Краснодар, Россия, 2023). В сентябре 2023 года результаты были представлены на XXIV съезде Российского Физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). По материалам выступлений опубликовано 9 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций.

Личный вклад автора. Автор внесла личный вклад в планирование и проведение представленных в работе измерений на одиночных кардиомиоцитах и многоклеточных препаратах миокарда предсердий, обработку, статистический анализ, интерпретацию полученных результатов, а также написание текстов статей и тезисов и представление результатов исследования на всероссийских и международных конференциях. Объём публикаций по теме диссертации составляет –4.88 п.л., вклад автора – 2.01 п.л.

Структура работы. Диссертация изложена на 155 листах, 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, 2 таблицами и 5 формулами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты были выполнены на самцах крыс Вистар в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU и заключения этического комитета ИИФ УрО РАН № 06/20.

В возрасте 9 недель крысы были случайным образом поделены на несколько групп:

1. АЦХ-СаСl₂-индуцированная пароксизмальная форма ФП (одиночные кардиомиоциты N=17 животных; многоклеточные препараты N=10 животных; измерения уровня фосфорилирования белков саркомера N=5; гистологические исследования N=6);

2. Контрольная группа – интактные животные, выводимые из эксперимента в возрасте 10 недель (одиночные кардиомиоциты N=21 животных; многоклеточные препараты N=7 животных; измерения уровня фосфорилирования белков саркомера N=5; гистологические исследования N=6);

3. Группа интактных животных для экспериментов по прямому влиянию АЦХ – интактные крысы, выводимые из эксперимента в возрасте 10 недель (N=13 животных).

Перед получением одиночных кардиомиоцитов и многоклеточных препаратов миокарда животные подвергались внутримышечной инъекции раствором гепарина натрия (5000 МЕ/кг) для предотвращения развития тромбоза коронарных артерий и анестезии Золетилом-100 (Virbac, Франция) в дозировке 0.3 мл/кг с премедикацией 2% Ксилазином (Alfasan, Нидерланды) или Рометаром в дозировке 1 мл/кг за 30 и за 15 минут до эвтаназии, соответственно. Изъятие сердец для экспериментов выполнялось во время глубокого наркоза животных, смерть животных наступала в результате обескровливания.

(1) Моделирование пароксизмальной формы ФП вегетативного генеза. Инициация пароксизмальной формы ФП вегетативного генеза была реализована при помощи модели АЦХ-СаСl₂-индуцированной ФП (Zou et al, 2016; Lv et al, 2019) с модификациями. Крысы возрастом 9 недель подвергались серии в/в инъекций в течение 7 дней раствором АЦХ-СаСl₂ (60 мкг/мл АСhСl, 10 мг/мл СаСl₂) в дозировке 1.3 мл/кг. До и после введения раствора АЦХ-СаСl₂ выполнялась регистрация ЭКГ в трёх отведениях при помощи электрокардиографа ECG300G-VET (Китай) под быстрой ингаляционной анестезией с изофлураном. Регулярные в/в инъекции раствора АЦХ-СаСl₂ у 100% животных (N=38) вызывали появление f-волн, снижение амплитуды QRS комплекса и нерегулярности R-R зубцов после каждого введения (см. Рис.1Б).

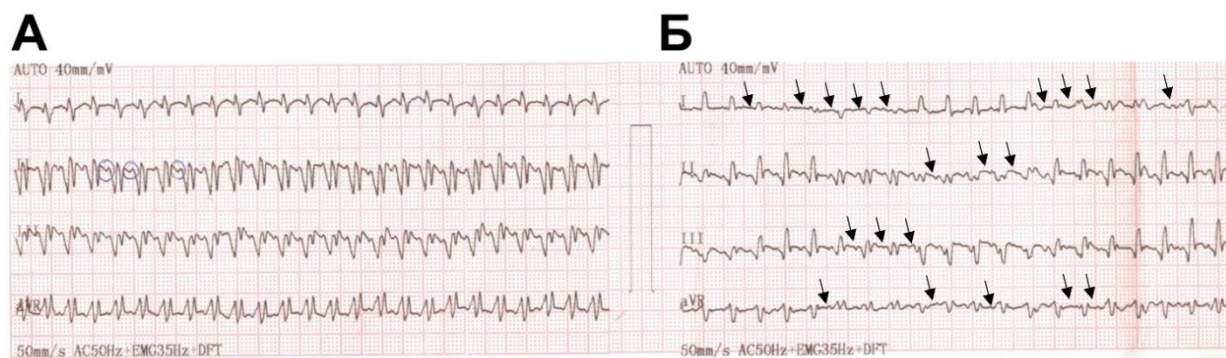


Рис. 1. Репрезентативные записи ЭКГ крысы на первый день постановки модели пароксизмальной формы ФП вегетативного генеза. А – До в/в введения раствора АЦХ-

CaCl₂. **Б** – После в/в введения раствора АЦХ-CaCl₂. Стрелками указаны эпизоды возникновения f-волн вместо P-зубца, сопровождающиеся последующим снижением амплитуды и исчезновением QRS-комплекса.

В возрасте 10 недель крысы группы пароксизмальной АЦХ-CaCl₂-индуцированной ФП подвергались эвтаназии. В случае постановки модели нескольким животным одновременно, вывод из эксперимента осуществлялся в срок ≤2 дней.

(2) Изоляция одиночных кардиомиоцитов и многоклеточных препаратов предсердий. Одиночные предсердные кардиомиоциты выделяли посредством ретроградной перфузии сердца по Лангендорфу с инъекциями в полость предсердий (Butova et al., 2021). Для измерений использовались кардиомиоциты с характерной для предсердий веретенообразной формой и сохраненной поперечно-полосатой исчерченностью, демонстрирующие активные сокращения при внешней электрической стимуляции. Многоклеточные препараты ЛП и ПП (полоски длиной 2000–3500 мкм) изолировались из ушек предсердий сразу после эвтаназии животного.

(3) Измерение и анализ динамики длины саркомеров в кардиомиоцитах предсердий при механически ненагруженных укорочениях. Изменение длины саркомеров в кардиомиоцитах при их электрической стимуляции регистрировалось при помощи специализированного аппаратно-программного комплекса MCSYS-02 (IonOptix, США). Анализируются следующие характеристики динамического укорочения-расслабления саркомеров: конечно-диастолическая длина (КДДС), амплитуда укорочения (в абсолютных единицах и нормированная на величину КДДС), максимальные скорости укорочения ($V_{дп}$) и расслабления ($V_{др}$), а также времена достижения пика укорочения ($V_{ДПс}$) и 50% расслабления ($V_{ДР50}$). Альтернансы укорочения саркомеров – чередующиеся от сокращения к сокращению изменения амплитуды укорочения саркомеров в большую (*MAX*) и меньшую (*MIN*) стороны относительно уровней, регистрируемых в псевдостационарном (без видимых альтернансов) состоянии клетки, анализировались при помощи разработанного подхода (Mikhryakova et al., 2022).

(4) Измерение и анализ характеристик изменения $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле кардиомиоцитов предсердий при механически ненагруженных укорочениях. Для визуализации изменения $[Ca^{2+}]_i$ одиночные кардиомиоциты инкубировались с флюорофором Fluo-8AM (ААТ Bioquest, Inc., США) в концентрации 1.7 мкМ и 0.1% Pluronic® F-127 (ААТ Bioquest, Inc., США). Для возбуждения флюорофора применялся аргоновый лазер с длиной волны 488 нм; регистрация флюоресценции производилась в оптическом канале 490–561 нм. Регистрация изменения $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле при электрической стимуляции кардиомиоцита выполнялась на системе лазерной сканирующей

конфокальной микроскопии LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Содержание ионов Ca^{2+} в СР (СР $[\text{Ca}^{2+}]_i$) оценивали по амплитуде изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванного воздействием кофеина в концентрации 10 мМ. Анализировались следующие характеристики: амплитуда изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и СР $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (в единицах интенсивности флюоресценции красителя, нормированных на фоновое свечение кардиомиоцита ($\Delta F/F_0$)), а также времена достижения пика (ВДП_{Ca}) и 50% спада $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ВДС₅₀).

(5) Регистрация и анализ силы сокращения кардиомиоцитов в условиях механического нагружения. Измерения силы ауксотонического сокращения кардиомиоцитов при их механическом нагружении 4 карбоновыми волокнами (Iribe et al., 2014; Volzhaninov and Khokhlova, 2020) выполняли при помощи программно-аппаратного комплекса MCSYS-02 (IonOptix, США). Анализировались следующие характеристики: амплитуда механического напряжения (сила, нормированная на площадь поперечного сечения кардиомиоцита), максимальные скорости достижения пика напряжения ($V_{\text{дп}}$) и расслабления кардиомиоцита ($V_{\text{др}}$), а также времена достижения пика силы (ВДП_F) и 50% расслабления (ВДР₅₀).

(6) Регистрация и анализ зависимости «длина-сила» многоклеточных препаратов предсердий. Активную и пассивную силу многоклеточных препаратов предсердий измеряли в ауксотоническом и изометрическом режимах сокращения при увеличении длины препарата (L) в диастолу, задаваемой в долях от длины мышцы при максимальной величине активной силы препарата (L_{MAX}) при 0.80, 0.85, 0.90, 0.95 и 1.00 L/L_{MAX} . Регистрация выполнялась на аппаратно-программном комплексе, разработанном в лаборатории биологической подвижности ИИФ УрО РАН. Анализировались следующие характеристики: амплитуда активного и величина пассивного напряжения (силы, нормированные на площадь поперечного сечения препарата) и абсолютные значения силы, скорость достижения пика силы, нормированная на амплитуду силы сокращения ($(dF/dt)_{\text{MAX}}/F_{\text{MAX}}$), а также время достижения пика силы (ВДП_F) и время 50% расслабления (ВДР₅₀). Степень зависимости увеличения силы от увеличения длины препарата оценивалась по коэффициентам крутизны линейной аппроксимации «длина-активная сила» и кривой экспоненциального роста «длина-пассивная сила».

(7) Оценка прямого действия АЦХ на характеристики сократительной функции одиночных кардиомиоцитов интактных животных. Для оценки прямого влияния АЦХ на изменение длины саркомеров и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в механически ненагруженных кардиомиоцитах интактных животных, суспензии кардиомиоцитов инкубировались в модифицированном растворе Тироде с АЦХ в концентрациях 0, 1, 10 и 100 мкМ в течение 10 минут до начала измерений.

Все измерения (3)-(7), кроме измерений силы сокращения кардиомиоцитов при комнатной температуре, выполнялись при температуре 30°C и частоте электрической стимуляции 1 Гц.

(8) Оценка содержания активных форм кислорода и оксида азота в одиночных изолированных кардиомиоцитах. Определение внутриклеточного содержания АФК ($[АФК]_i$) и оксида азота ($[NO]_i$) в одиночных кардиомиоцитах выполнялась с использованием флюорофоров DHE и DAF-FM, соответственно (Sigma Aldrich, США).

(9) Определение степени фосфорилирования белков саркомера. Определение степени фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С (сMyBP-C), регуляторных лёгких цепей миозина (RLC), тропонинов Т и I (TnT, TnI) и тропомиозина (Tpm) осуществляли при помощи гель-электрофореза с окрашиванием Pro-Q Diamond (Thermo Fisher Scientific, США) и SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США) в лаборатории биологической подвижности ИИФ УрО РАН.

(10) Гистологическая оценка структуры миокарда предсердий. Для определения толщины свободных стенок предсердий и плотности распределения ядер препараты окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для оценки соединительнотканного компонента срезы окрашивались с использованием 0.1% пикросириус красный (ab150681, Abscam, Великобритания). Для определения количества саркомеров и гликогена применялась периодическая кислота Шиффа с окрашиванием метиленовым синим. Данный блок результатов был получен в лаборатории морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН.

Сбор и анализ данных выполнялся при помощи специального программного обеспечения IonWizard (IonOptix, США), Zen 2009 (Carl Zeiss, Германия), EqsarAll версии 6 и 6.0 (ИИФ УрО РАН, Россия), FIJI ImageJ (US National Institutes of Health, США) и Excel 16 (Microsoft Corp, США).

(11) Статистический анализ данных экспериментов. В блоке экспериментов по анализу характеристик сократительной функции миокарда предсердий в норме и при ФП проводилось сравнение между следующими группами:

1. ЛП vs. ПП;
2. Норма vs. пароксизмальная форма ФП.

Статистический анализ полученных данных выполнялся при помощи пробной версии программы GraphPad Prism 8.0 (Origin Lab, США) и R Studio (RStudio Team, Integrated Development for R., США). Сравнение характеристик сократительной функции миокарда предсердий выполняли при использовании критерия Манна-Уитни, иерархического кластерного анализа (Sikkel et al., 2017), 1-факторного дисперсионного анализа с поправкой

Даннетта или критерия Краскелла-Уоллиса с поправкой Данна. Для анализа морфологических характеристик тканей предсердий и уровней фосфорилирования белков саркомера выполнялся тест Шейрера-Рей-Хара с поправкой Бонферрони. Коэффициент детерминации для аппроксимируемых зависимостей «длина-сила» R^2 был больше 0.7. Достоверность различий принималась при $p < 0.05$. Данные экспериментов представлены в формате «ящика-с-усами», где горизонтальная линия соответствует медиане, границы «ящика» – интервалу $Q1-Q3$, а «усы» – разбросу между минимальным и максимальным значениями в выборке. Число клеток и/или препаратов (n) и количество животных (N) в каждой группе обозначено на графиках как (n/N).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Межпредсердные особенности сократительной функции миокарда предсердий в норме

На клеточном уровне организации миокарда. Амплитуда укорочения саркомеров, КДДС, $V_{дп}$ и $V_{др}$ в механически ненагруженных кардиомиоцитах статистически значимо не различались между ЛП и ПП. В механически нагруженных кардиомиоцитах также не обнаружено достоверных различий в значениях амплитуды аутокотонического напряжения, $V_{дп}$ и $V_{др}$, $V_{дпF}$ и $V_{др50}$ между ЛП и ПП. Таким образом, результаты по однородности характеристик активного напряжения кардиомиоцитов ЛП и ПП согласуются с межкамерной однородностью параметров динамики длин саркомеров в механически ненагруженных кардиомиоцитах.

Для понимания механизмов однородности параметров укорочения саркомеров и силогенерирующей способности кардиомиоцитов ЛП и ПП была проанализирована степень фосфорилирования белков саркомера предсердий. Уровни фосфорилирования сМуВР-С, RLC, а также белков тонкого филамента – Трт и ТnI, не различались между ЛП и ПП. Однако, уровень фосфорилирования ТnT был в ЛП в ~ 2 раза выше, чем в ПП. Таким образом, однородность в уровнях фосфорилирования белков саркомера ЛП и ПП согласуется с данными об однородности характеристик сократительной активности кардиомиоцитов ЛП и ПП.

Далее были проанализированы межпредсердные особенности изменения $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле кардиомиоцитов как промежуточного звена электромеханического сопряжения, которое может вносить вклад в динамику длины саркомеров и силогенерацию кардиомиоцитов. Не было найдено отличий как в параметрах изменения $[Ca^{2+}]_i$, так и в амплитудах $SP [Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах ЛП и ПП. Можно предположить, что

однородность кинетики Ca^{2+} в кардиомиоцитах ЛП и ПП обуславливает однородность параметров укорочения-расслабления саркомеров и ауксотонического напряжения.

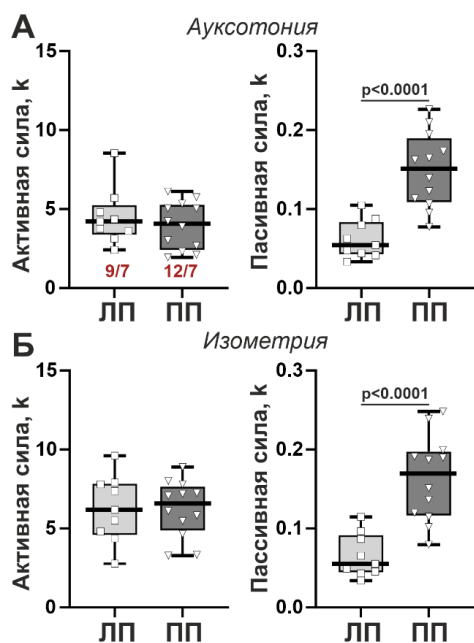


Рис. 2. Коэффициенты (к) наклона аппроксимированных зависимостей «длина-активная сила» и «длина-пассивная сила» многоклеточных препаратов ЛП и ПП. **А** – Ауксотонический режим сокращения. **Б** – Изометрический режим сокращения. U-тест Манна-Уитни (ЛП vs. ПП), $p < 0.05$.

На тканевом уровне организации миокарда. В ауксотоническом режиме сокращения наклоны зависимости «длина-активная сила» многоклеточных препаратов не различались между ЛП и ПП животных, тогда как увеличение пассивной силы при диастолическом растяжении препарата имело большую крутизну в ПП, чем в ЛП (см. Рис. 2А). В изометрическом режиме сокращения мышечных препаратов было выявлено аналогичное различие длинозависимого увеличения пассивной силы (крутизна кривой «длина-пассивная сила») между ЛП и ПП (см. Рис. 2Б).

В ауксотоническом режиме сокращения ПП характеризуется меньшим по сравнению с ЛП пассивным напряжением на малых величинах диастолического растяжения (0.80 и 0.85 L/L_{MAX} , см. Рис. 3А,Б). При этом, амплитуды активного напряжения не различались для ЛП и ПП во всём диапазоне диастолических растяжений.

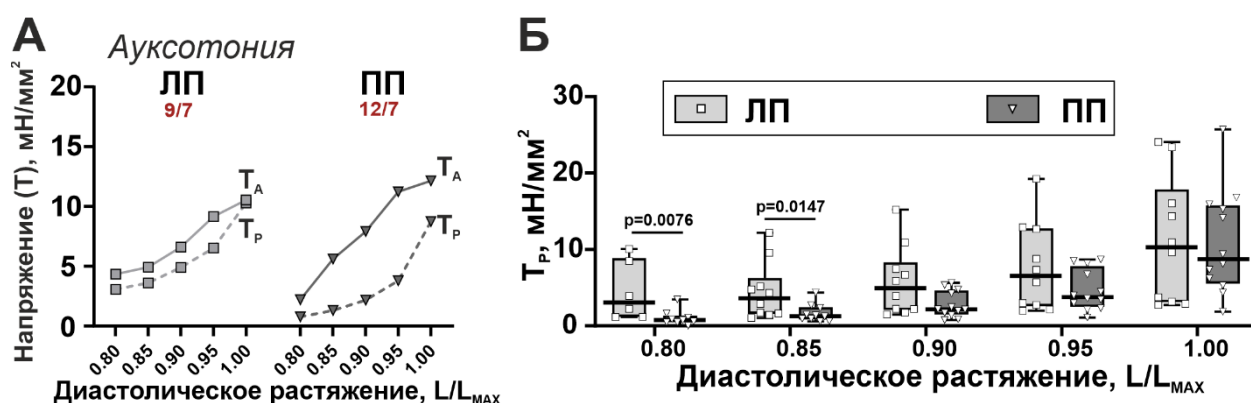


Рис. 3. Сравнительный анализ величин активного (T_A) и пассивного (T_P) напряжений препаратов ЛП и ПП на различных величинах диастолического растяжения в ауксотоническом режиме сокращения. **А** – Средние значения T_A и T_P препаратов. **Б** – Значения пассивного напряжения. Величины диастолического растяжения указаны в долях от длины мышцы, соответствующей максимальной сократительной способности при выбранных внешних условиях (L/L_{MAX}). Критерий Краскелла-Уоллиса, $p < 0.05$.

Аналогично, в изометрическом режиме сокращения препараты ПП демонстрировали меньшее, чем у ЛП, пассивное напряжение, но данные различия проявлялись в большем диапазоне величин диастолических растяжений по сравнению с аутокотоническим режимом сокращения (0.80, 0.85 и 0.90 L/L_{MAX} , см. Рис. 4А,Б).

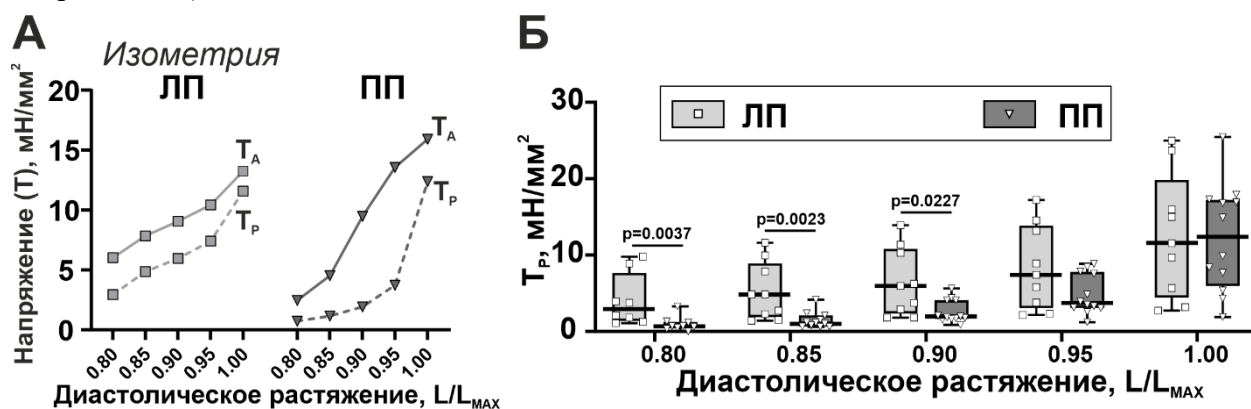


Рис. 4. Сравнительный анализ величин активного (T_A) и пассивного (T_P) напряжений препаратов ЛП и ПП на различных величинах диастолического растяжения в изометрическом режиме сокращения. А – Средние значения T_A и T_P препаратов. Б – Значения пассивного напряжения. Величины диастолического растяжения указаны в долях от длины мышцы, соответствующей максимальной сократительной способности при выбранных внешних условиях (L/L_{MAX}). Критерий Красселла-Уоллиса, $p < 0.05$

Таким образом, на тканевом уровне организации миокарда предсердия демонстрируют меньшую степень однородности параметров сократительной функции (см. Рис. 5). В препаратах ПП были обнаружены меньшие величины пассивного напряжения, но больший наклон зависимости «длина-пассивная сила» по сравнению с ЛП. В то же время, многоклеточные препараты, как и одиночные кардиомициты, демонстрировали однородность характеристик активной компоненты силы сокращения.

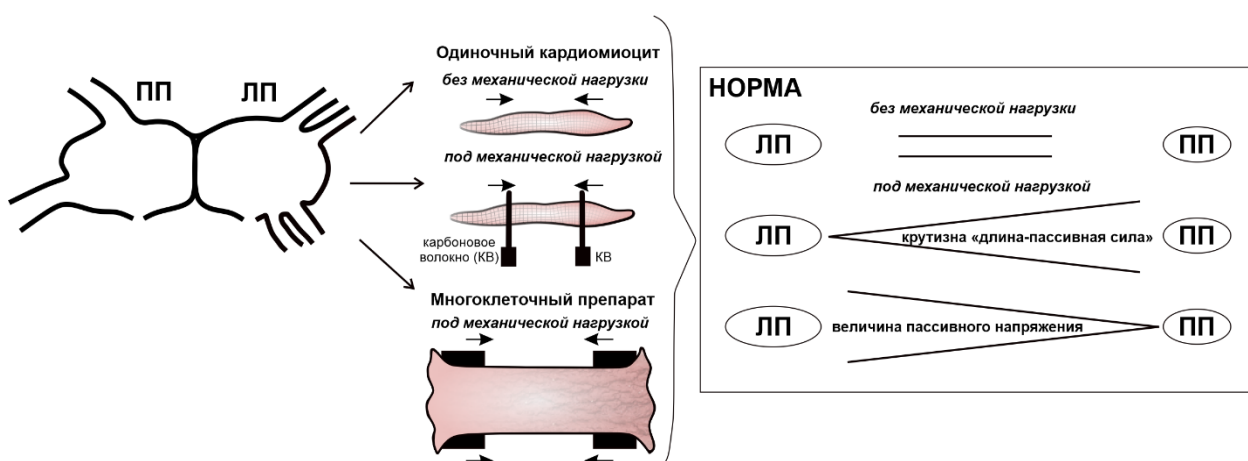


Рис. 5. Вклад механической нагрузки в формирование межпредсердных различий сократительной функции миокарда крыс в норме.

Ремоделирование сократительной функции предсердий при АЦХ- CaCl_2 - индуцированной пароксизмальной ФП

На клеточном уровне

организации миокарда. В механически ненагруженных кардиомиоцитах в группе ФП было отмечено выраженное нарушение сократительной функции саркомеров в ЛП. В кардиомиоцитах ЛП амплитуды укорочения саркомеров уменьшались (в ~ 1.27 раз по абсолютным и ~ 1.26 раз по нормированным относительно КДДС единицам) и $V_{др}$ саркомеров (в ~ 1.27 раз) относительно значений, полученных в контрольной группе. В кардиомиоцитах ПП было обнаружено увеличение КДДС и $V_{дп}$ саркомеров, что не сопровождалось изменениями амплитуды укорочения. Анализ межпредсердных различий показал, что пароксизмальная ФП приводила к возникновению различий между ЛП и ПП в величине КДДС, а также $V_{дп}$ и

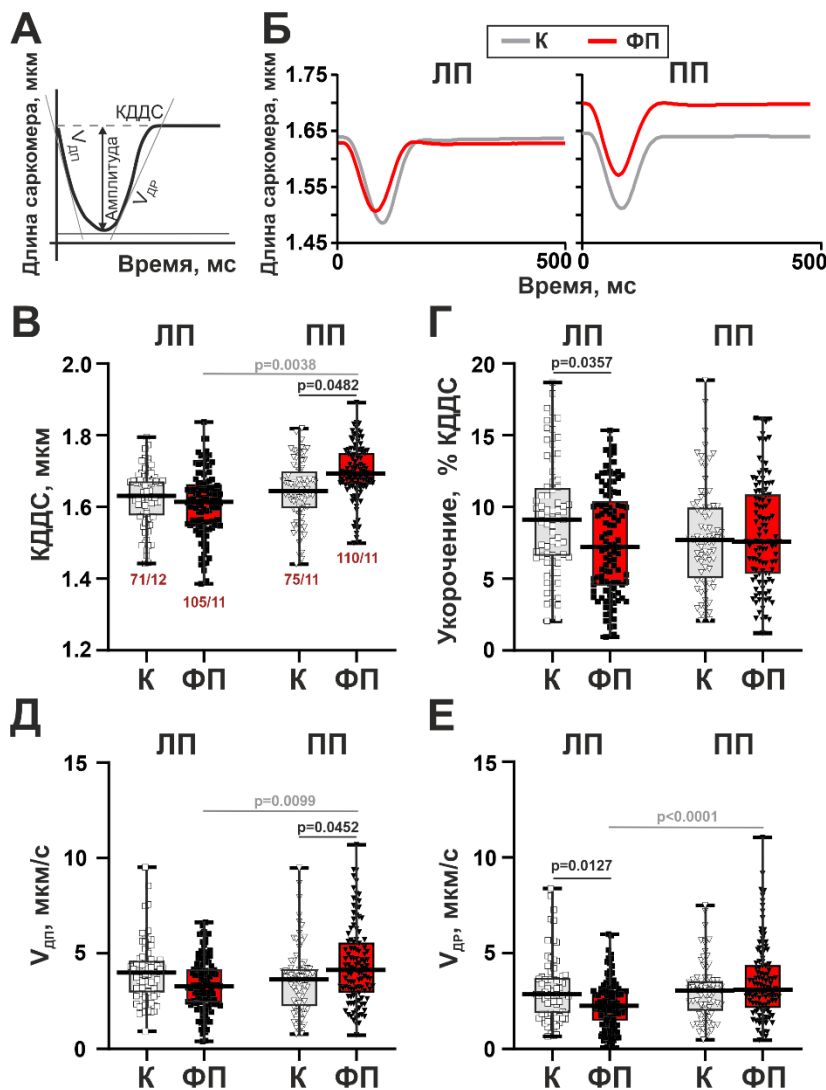


Рис. 6. Характеристики изменения длины саркомеров в механически ненагруженных одиночных кардиомиоцитах ЛП и ПП в контрольной группе (К) и при пароксизмальной ФП. **А** – Анализируемые параметры. **Б** – Репрезентативные профили изменения длины саркомеров. **В** – Конечно-диастолическая длина саркомеров (КДДС). **Г** – Амплитуда укорочения саркомеров, нормированная относительно величины КДДС. **Д** – Максимальная скорость укорочения саркомеров ($V_{дп}$). **Е** – Максимальная скорость расслабления саркомеров ($V_{др}$). Иерархический кластерный анализ с логарифмическим преобразованием данных, достоверность различий при $p < 0.05$.

$V_{др}$ саркомера, которые отсутствовали в контрольной группе (см. Рис. 6).

В группе ФП $\sim 84\%$ кардиомиоцитов ($n=55$ из 65 клеток, $N=5$ животных) демонстрировали альтернансы с отклонениями амплитуды укорочения саркомеров свыше 5% от псевдостационарного уровня. Частота встречаемости альтернансов была выше для

кардиомиоцитов ЛП (77%), чем для миоцитов ПП (70%). Кардиомиоциты ЛП имели большую величину отклонений амплитуды укорочения саркомеров в *MAX* альтернансе по сравнению с ПП (см. Рис. 7).

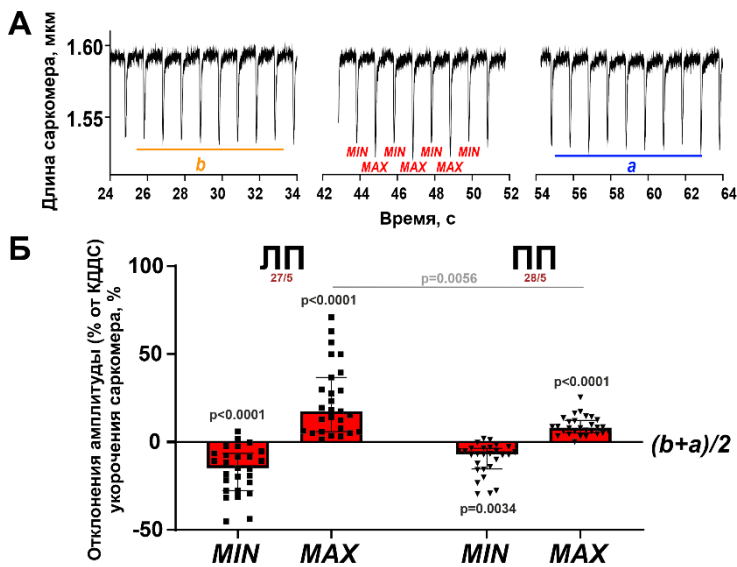


Рис. 7. Анализ альтернансов амплитуды укорочения саркомеров в механически ненагруженных кардиомиоцитах ЛП и ПП при пароксизмальной ФП. **А** – Репрезентативная запись изменения длины саркомеров в кардиомиоците с видимым альтернансом, где *b* – амплитуда укорочения саркомеров, регистрируемая в псевдостационарном состоянии до возникновения альтернирующего участка в записи; *a* – амплитуда укорочения саркомеров, регистрируемая после эпизода альтернансов; *MIN* и *MAX* –

отклонение амплитуды укорочения саркомеров в альтернансе в сторону уменьшения или увеличения от значений амплитуды в псевдостационарном состоянии, соответственно. **Б** – отклонения амплитуды укорочения саркомеров, нормированной на величину КДДС, в *MIN* и *MAX* альтернансах. Величины *MIN* и *MAX* указаны в % от средних величин амплитуды укорочения саркомеров, регистрируемых в псевдостационарном состоянии сокращения клетки до и после альтернанса ($(b+a)/2$). 1-факторный дисперсионный анализ и модель смешанных эффектов (*MIN* и *MAX* vs. $(b+a)/2$), $p < 0.05$.

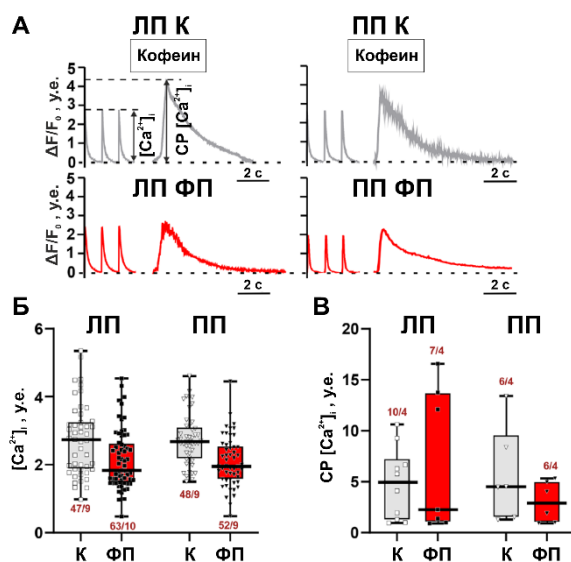


Рис. 8. Характеристики динамического изменения $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле механически ненагруженных кардиомиоцитов ЛП и ПП в контрольной группе (К) и при АЦХ- $CaCl_2$ -индуцированной пароксизмальной ФП. **А** – Репрезентативные сигналы динамического изменения $[Ca^{2+}]_i$ при сокращении кардиомиоцита и $[Ca^{2+}]_i$, вызванного применением кофеина в отсутствие

При этом, в группе ФП не было обнаружено значимых альтернансов в $[Ca^{2+}]_i$, которые могли бы внести вклад в возникновение альтернансов укорочения саркомеров. Несмотря на наличие тренда на уменьшение амплитуд изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $SR [Ca^{2+}]_i$, наблюдаемого в обоих предсердиях, достоверных изменений при ФП относительно величин контрольной группы выявлено не было (см. Рис. 8). Времена достижения пика и спада изменения $[Ca^{2+}]_i$ также не различались между группами ФП и контроль.

электрической стимуляции (СР $[Ca^{2+}]_i$) с демонстрацией анализируемых параметров. **Б** – Амплитуда изменения $[Ca^{2+}]_i$. **В** – Амплитуда изменения СР $[Ca^{2+}]_i$. $\Delta F/F_0$ – интенсивность флюоресценции красителя, нормированная на фоновое свечение кардиомиоцита; у.е. – условные единицы флюоресценции.

Сократительную дисфункцию саркомеров в механически ненагруженных кардиомиоцитах ЛП можно связать с вызванным ФП снижением уровней фосфорилирования сMyBP-C на ~56% и TnI на ~42% относительно значений контрольной группы. В ПП увеличилась степень фосфорилирования RLC, что может способствовать поддержанию значений амплитуды укорочения саркомеров, сравнимыми со значениями контрольной группы (см. Рис. 9).

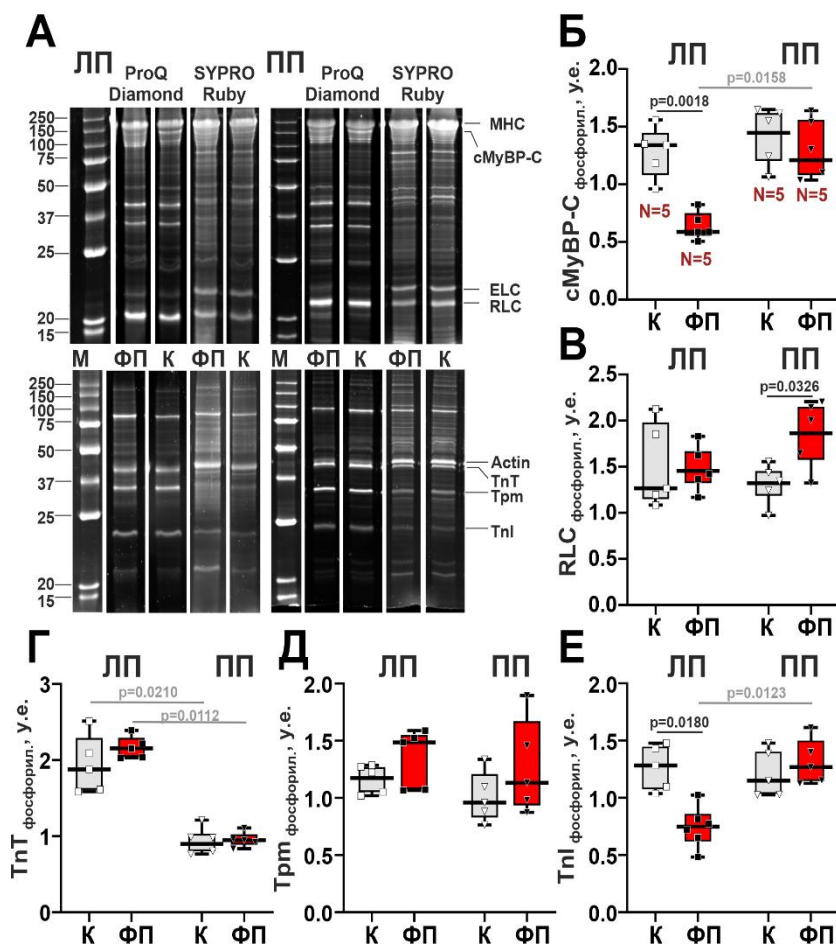


Рис. 9. Оценка степени фосфорилирования белков саркомера ЛП и ПП в контрольной группе (К) и при пароксизмальной ФП. **А** – Репрезентативное изображение геле-электрофореза белков ЛП и ПП контрольной группы и группы с ФП с окрашиванием Pro-Q Diamond и SYPRO Ruby. **Б** – сMyBP-C. **В** – RLC. **Г** – TnT. **Д** – Tpm. **Е** – TnI. у.е. – условные единицы соотношения интенсивности флюоресценции Pro-Q Diamond и SYPRO Ruby. Каждая точка представляет среднее значение, полученное с измерений на каждом животном в выборке. Тест Шейпера-Рэя-Хара, $p < 0.05$.

Изменение продукции АФК и NO может влиять на степень фосфорилирования белков саркомера. $[АФК]_i$ увеличились в ~2.6 раз в кардиомиоцитах ЛП и в ~2.8 раз в кардиомиоцитах ПП относительно значений контрольной группы (см. Рис. 10 А). $[NO]_i$ снизилось в ~39 раз в ЛП и ~26 раз в ПП (см. Рис. 10 Б). В ЛП и ПП контрольных животных

[АФК]_i и [NO]_i не различались, тогда как при ФП значение [АФК]_i в ЛП превышало значение [АФК]_i в ПП в 1.84 раза, что может приводить к дисфункции саркомеров в ЛП.

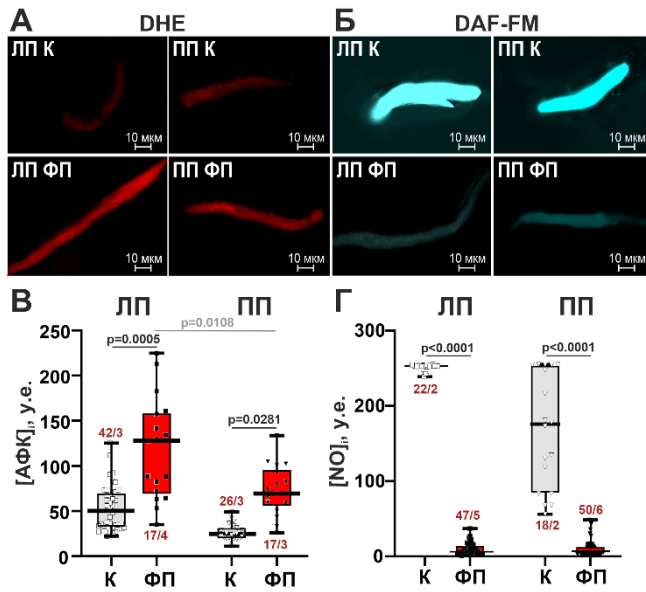


Рис. 10. Оценка содержания АФК и NO в кардиомиоцитах ЛП и ПП в контрольной группе (К) и при пароксизмальной ФП. **А** – Репрезентативные изображения кардиомиоцитов ЛП и ПП, окрашенных DHE для анализа [АФК]_i (масляный иммерсионный объектив, увеличение 63х). **Б** – Репрезентативные изображения кардиомиоцитов ЛП и ПП, окрашенных DAF-FM для анализа [NO]_i (масляный иммерсионный объектив, увеличение 63х). **В** – Содержание АФК. **Г** – Содержание NO. у.е. – условные единицы флюоресценции. Иерархический кластерный анализ с логарифмическим преобразованием данных, $p < 0.05$.

В механически нагруженных кардиомиоцитах в группе ФП было отмечено уменьшение амплитуды ауksотонического напряжения и значений $V_{др}$ для ПП, но не для ЛП (см. Рис. 11).

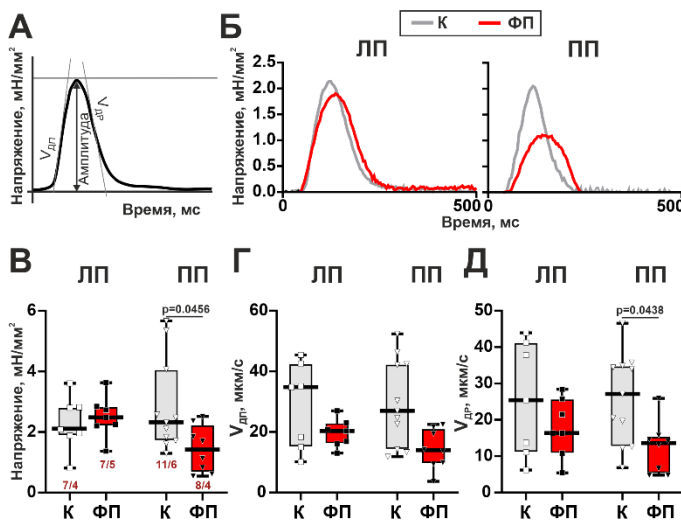


Рис. 11. Характеристики ауksотонического напряжения одиночных кардиомиоцитов ЛП и ПП при их механическом нагружении карбоновыми волокнами контрольной группы (К) и группы пароксизмальной ФП. **А** – Анализируемые параметры. **Б** – Репрезентативные профили ауksотонического напряжения одиночных кардиомиоцитов. **В** – Амплитуда ауksотонического напряжения. **Г** – $V_{др}$ ауksотонического напряжения. **Д** – $V_{др}$. Иерархический кластерный анализ с логарифмическим преобразованием данных, $p < 0.05$.

На тканевом уровне организации миокарда. В ПП при ФП выявлено уменьшение

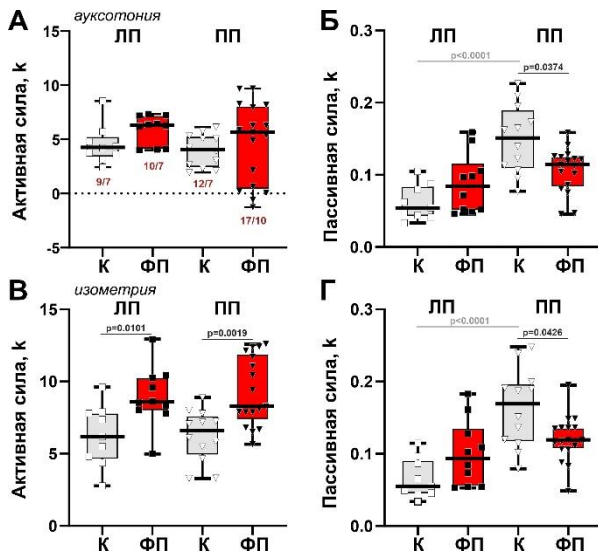


Рис. 12. Анализ зависимостей «длина-активная сила» и «длина-пассивная сила» ЛП и ПП контрольной группы (К) и группы пароксизмальной ФП. **А** – «Длина-активная сила» ауксотонического режима сокращения. **Б** – «Длина-пассивная сила» ауксотонического режима сокращения. **В** – «Длина-активная сила» изометрического режима сокращения. **Г** – «Длина-пассивная сила» изометрического режима сокращения. Критерий Краскелла-Уоллиса, $p < 0.05$

коэффициента крутизны кривой «длина-пассивная сила» ауксотонического и изометрического сокращения на 24% по сравнению со значениями контрольной группы (см. Рис. 12). Для изометрического режима сокращения обнаружено, что пароксизмальная ФП приводит к увеличению коэффициента наклона зависимости «длина-активная сила» на 39% в ЛП и на 26% в ПП. Вызванные ФП изменения крутизны

длиннозависимого увеличения амплитуд пассивной пассивной силы в ПП привели к исчезновению различий между ЛП и ПП по данному параметру, которые были показаны для контрольной группы.

Несмотря на тренд на уменьшение величин ауксотонического напряжения многоклеточных препаратов ПП, пароксизмальная ФП не вызывала

достовверного изменения величин активного и пассивного напряжений ауксотонического и изометрического сокращений, как и изменения параметров времени и скорости сокращения и расслабления в ЛП и ПП по сравнению с значениями контрольной группы (см. Рис. 13). Однако, в ЛП при ФП был обнаружен выраженный тренд на уменьшение пассивного ауксотонического напряжения ($p=0.075$, тест Краскелла-Уоллиса, см. Рис. 13 А), регистрируемый на всём диапазоне диастолических растяжений. В ПП при ФП величины активного напряжения демонстрировали тренд на уменьшение при 0.90, 0.95 и 1.00 L/L_{МАХ}; пассивное напряжение также снижались, но в диапазоне 0.95 и 1.00 L/L_{МАХ} ($p > 0.072$, тест Краскелла-Уоллиса, см. Рис. 13 Б).

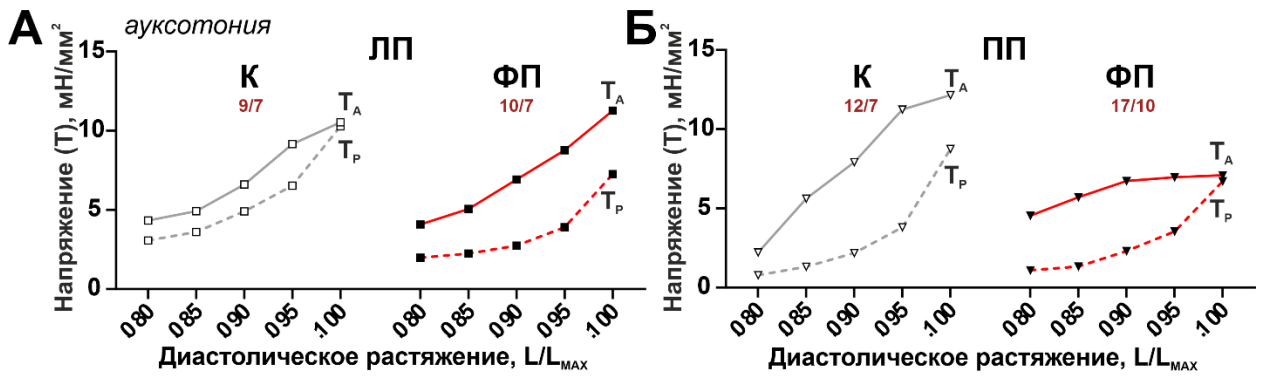


Рис. 13. Величины активного (T_A) и пассивного (T_P) напряжений многоклеточных препаратов предсердий контрольной группы (К) и группы пароксизмальной ФП при диастолическом растяжении в ауксотоническом режиме сокращения. **А** – ЛП. **Б** – ПП.

Гистологический анализ миокардиальных срезов (см. Рис. 14) показал, что при ФП уменьшается число миофибрилл (в большей степени в ЛП, чем в ПП), увеличивается содержание гликогена и коллагена в ЛП, но не в ПП.

Можно предположить, что увеличение содержания коллагена на фоне уменьшения числа саркомеров (миофибрилл) позволяет поддерживать пассивные свойства миокарда ЛП при ФП, сравнимые со значениями в контрольной группе. Наоборот, в ПП уменьшение числа саркомеров, оказывающих вклад в пассивную жёсткость, совместно с отсутствием изменений в содержании коллагена может вносить вклад в снижение крутизны наклона «длина-пассивная сила».

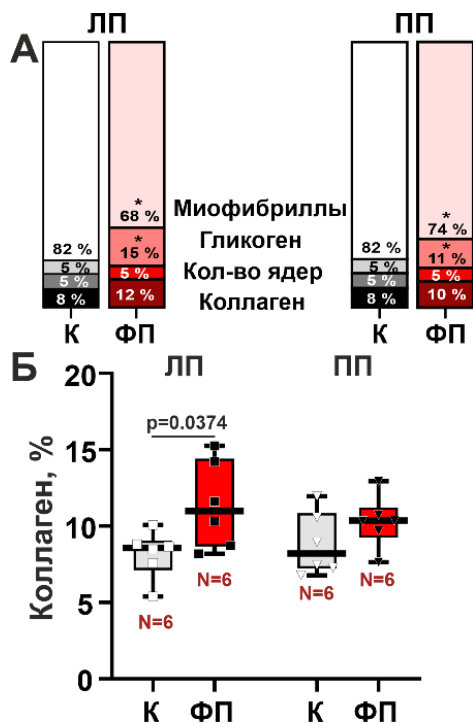


Рис. 14. Морфологические особенности ремоделирования ЛП и ПП при пароксизмальной ФП. **А** – Относительный состав тканей предсердий. **Б** – Содержание коллагена в тканях предсердий. * – достоверность различий между группами К и ФП. Тест Шейрера-Рэя-Хара с поправкой Бонферрони, $p < 0.05$

Таким образом, выраженность и камероспецифичность ремоделирования параметров сократительной функции при пароксизмальной ФП зависит от условий механического нагружения. Несмотря на то, что ЛП показывает большую предрасположенность к ФП с

точки зрения дисфункции саркомеров на клеточном и молекулярных уровнях организации миокарда, механическая нагрузка может влиять на межпредсердные особенности сократительной функции миокарда предсердий. Так, механически нагруженные кардиомиоциты ЛП при ФП показали уровни напряжения, сравнимые с контрольными значениями, и механически нагруженные многоклеточные препараты ЛП демонстрировали более крутую зависимость «длина-активная сила». Поскольку сердце является органом, работающем в условиях механической пред- и пост-нагрузки, экстраполяция полученных результатов позволяет выделить ПП (а не ЛП) как регион, уязвимый к потере сократительной функции при пароксизмальной ФП. Камероспецифичные механизмы ремоделирования параметров сократительной функции представлены на Рис. 15.

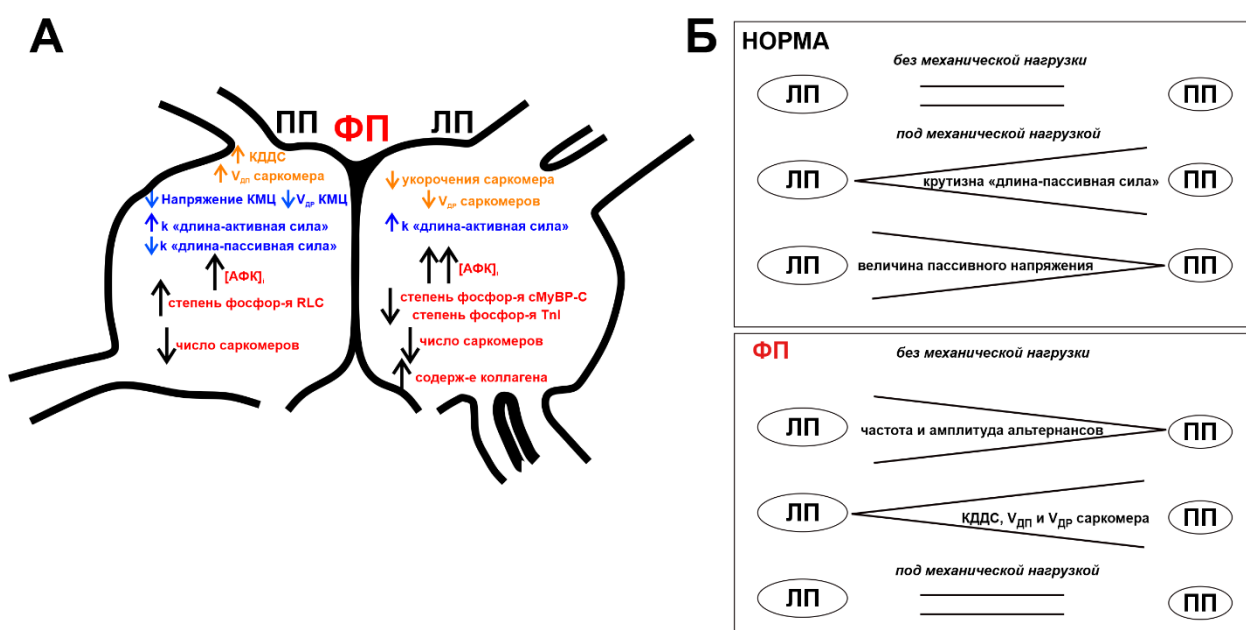


Рис. 15. Схема особенностей сократительной дисфункции миокарда ЛП и РП при пароксизмальной ФП. **А** – Камероспецифичные механизмы ремоделирования параметров сократительной функции. **Б** – Оранжевым цветом обозначены характеристики сократительной функции кардиомиоцитов, сокращающихся без механической нагрузки; синим – характеристики сократительной функции кардиомиоцитов и многоклеточных препаратов под механической нагрузкой; k – коэффициент крутизны зависимости; КМЦ – кардиомиоцит; ↓↑ – направление изменений при ФП по сравнению с контрольной группой (норма).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании была проведена оценка характеристик сократительной функции предсердий крыс при пароксизмальной АЦХ- CaCl_2 индуцированной ФП, а также выявлены особенности сократительной дисфункции и механизмов её развития в ЛП и РП. Заявленная в работе цель и поставленные для её реализации задачи подразумевали выполнение исследования в 3 смысловых блока:

1. Определение межпредсердных различий в характеристиках сократительной функции предсердий в норме;

2. Оценка камероспецифичного ремоделирования сократительной функции предсердий и определение паттерна различий в характеристиках жесткости и сократимости между ЛП и ПП, индуцированного пароксизмальной ФП;

3. Анализ возможных механизмов, участвующих в камероспецифичном изменении сократительной функции предсердий при пароксизмальной ФП.

На клеточном уровне организации миокарда была обнаружена однородность (близость величин) параметров сокращения ЛП и ПП в норме. В отличие от ранее полученных литературных данных о наличии электрического, метаболического и структурного различий между предсердиями в норме, гипотеза о наличии различий в параметрах сократимости одиночных кардиомиоцитов не подтвердилась. Только на тканевом уровне организации миокарда были определены характеристики пассивной жесткости, которые могут вносить вклад в различия сократительной способности между предсердиями – величина пассивного напряжения и крутизна зависимости «длина-пассивная сила». Были получены меньшие величины пассивного напряжения и большая крутизна роста силы в ответ на изменение длины в многоклеточных препаратах ПП в сравнении с ЛП.

При анализе камероспецифичного ремоделирования миокарда при пароксизмальной ФП было установлено, что функционально ПП подвергается большим изменениям, чем ЛП, что может указывать на его большую чувствительность. Пароксизмальная ФП в ПП приводит к уменьшению крутизны «длина-пассивная сила», а также снижению величин активного напряжения кардиомиоцита и многоклеточных препаратов миокарда при их механическом нагружении. Пароксизмальная ФП в механически ненагруженных кардиомиоцитах ЛП приводит к уменьшению амплитуды укорочения и скорости расслабления саркомеров, а также более выраженным альтернансам амплитуды укорочения саркомеров, но не оказывает влияния на процессы силогенерации в условиях механического нагружения кардиомиоцита.

Таким образом, в результате работы было установлено влияние механического нагружения на развитие сократительной дисфункции ЛП и ПП. В отсутствие механической нагрузки (при оценке сократимости миокарда *per se* на клеточном уровне организации миокарда) пароксизмальная ФП ведёт к более выраженной дисфункции саркомеров в ЛП. В условиях механического нагружения ПП становится наиболее уязвимой камерой к ФП.

На основании результатов исследования и литературных данных выдвинуты следующие предположения о камероспецифичных особенностях механизмов патологического ремоделирования предсердий при ФП. В результате увеличения

продукции АФК в кардиомиоцитах ЛП при пароксизмальной ФП происходят посттрансляционные модификации белков кардиомиоцитов, что нарушает их функцию. Снижение числа саркомеров, гипофосфорилирование сMyBP-C и TnI в ЛП приводит к выраженным изменениям в динамике саркомеров: уменьшению амплитуды и максимальной скорости расслабления, а также к более выраженным альтернансам сокращения саркомеров в механически ненагруженных кардиомиоцитах. Сохранение величин активного напряжения механически нагруженных кардиомиоцитов и многоклеточных препаратов ЛП при пароксизмальной ФП может объясняться камероспецифичным влиянием механической нагрузки на сократительную функцию предсердий. Увеличение содержания коллагена в ЛП, несмотря на уменьшение числа саркомеров, обеспечивает сохранение значений пассивной жесткости при пароксизмальной ФП на уровне контрольных значений.

Напротив, в ПП при пароксизмальной ФП отмечается снижение коэффициента крутизны кривой «длина-пассивная сила», что говорит об увеличении податливости мышцы. В связи с тем, что содержание коллагена не изменилось, можно объяснить этот результат участием титина. В данном исследовании не оценивались уровни экспрессии и степень фосфорилирования титина, эффект его гиперфосфорилирования описан в литературе и, вероятнее всего, именно за счёт него отмечается снижение пассивного напряжения и увеличение чувствительности длинозависимой регуляции активной силы в ПП. Увеличение степени фосфорилирования RLC в ПП может способствовать поддержанию значений амплитуды укорочения саркомеров, сравнимыми со значениями контрольной группы кардиомиоцитов ПП. Уменьшение числа саркомеров и увеличение продукции АФК на фоне повышенной чувствительности к механической нагрузке может объяснять снижение силы при ФП на уровне одиночной клетки. В многоклеточном препарате, взаимодействие нескольких кардиомиоцитов в условиях их активации при механическом нагружении, позволяют сохранить величины активных напряжений вблизи контрольных значений.

Таким образом, пароксизмальная ФП приводит к нарушению исходного паттерна сократительной функции между предсердиями, характерного для здорового сердца, что может создавать дополнительный субстрат прогрессирования ФП в виде рассинхронизации работы предсердных камер в ходе сердечного цикла.

ВЫВОДЫ

Результаты проведённого исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлена однородность параметров сократительной активности одиночных кардиомиоцитов и многоклеточных препаратов миокарда и неоднородность пассивных

свойств миокарда ЛП и ПП крыс в норме. В многоклеточных препаратах миокарда ПП величина жёсткости выше, чем в ЛП, что характеризуется большей крутизной зависимости «длина- пассивная сила».

2. Пароксизмальная ФП приводит к нарушению сократительной функции миокарда обоих предсердий и к появлению межпредсердных различий в характеристиках сократительной функции на клеточном уровне миокарда.

3. Выраженность и камероспецифичность нарушений при пароксизмальной ФП зависят от приложенной механической нагрузки:

3.1. В механически ненагруженных кардиомиоцитах ЛП пароксизмальная ФП сопровождается уменьшением амплитуды укорочения и скорости расслабления саркомеров, а также большим числом и амплитудой альтернансов укорочения саркомеров по сравнению с кардиомиоцитами ПП.

3.2. В механически нагруженных кардиомиоцитах пароксизмальная ФП приводит к снижению амплитуды механического напряжения и скорости расслабления в ПП, а амплитуда напряжения кардиомиоцитов ЛП не меняется.

3.3. Пароксизмальная ФП сопровождается увеличением наклона зависимости «длина-активная сила» в миокарде обоих предсердий. При этом в ПП происходит уменьшение коэффициента наклона кривой «длина-пассивное напряжение» и снижение амплитуды активного напряжения в диапазоне больших растяжений миокарда.

4. Механизмы развития дисфункции миокарда ЛП и ПП при пароксизмальной ФП являются камероспецифичными.

4.1. Дисфункция саркомеров в миокарде ЛП обусловлена увеличением продукции АФК, уменьшением числа саркомеров и снижением степени фосфорилирования сMyBP-C и TnI. Увеличение степени фосфорилирования RLC в миокарде ПП может вносить свой вклад в увеличение скорости сокращения саркомеров и поддержание их сократимости при пароксизмальной ФП. Снижение амплитуды напряжения одиночных кардиомиоцитов ПП при пароксизмальной ФП обусловлено увеличением продукции АФК и уменьшением числа саркомеров.

4.2. Увеличение содержания коллагена в ЛП, несмотря на уменьшение числа саркомеров, может вносить вклад в поддержание значений пассивной жесткости миокарда при ФП на уровне контрольных значений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах рецензируемых в международных базах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных:

1. **Butova X. A.**, Myachina T. A., Khokhlova A. D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // *MethodsX*. – 2021. – V. 8. – P. 101189. (IF – 1.84, WoS, SCOPUS) (0.69 / 0.35)*.

2. **Butova X.**, Myachina T., Simonova R., Kochurova A., Bozhko Y., Arkhipov M., Solovyova O., Kopylova G., Shchepkin D., Khokhlova A. Peculiarities of the Acetylcholine Action on the Contractile Function of Cardiomyocytes from the Left and Right Atria in Rats // *Cells*. – 2022. – V. 11, №. 23. – P. 3809. (IF – 7.666, WoS, SCOPUS). (1.43 / 0.57)*

3. Mikhryakova P. P., **Butova X. A.**, Myachina T. A., Simonova R. A., Khokhlova A. D. A Study of Mechanical Alternans in Single Rat Cardiomyocytes in Acetylcholine-CaCl₂ Induced Atrial Fibrillation // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2022. – V. 58., №. Suppl 1. – pp. S13-S21. (IF – 0.6, WoS, BAK) (0.75 / 0.29)*

4. **Butova X.**, Myachina T., Simonova R., Kochurova A., Mukhlynina E., Kopylova G., Shchepkin D., Khokhlova A. The inter-chamber differences in the contractile function between left and right atrial cardiomyocytes in atrial fibrillation in rats // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2023 – V 10. – P. 1203093. (IF – 3.6, WoS, SCOPUS) (1.86 / 0.74)*

Публикации в рецензируемых журналах:

1. **Butova X.A.**, Mikhryakova P.P., Myachina T.A., Simonova R.A., Shchepkin D.V., Kochurova A.M., Kopylova G.V., Khokhlova A.D. Regional variances of the contractile function disturbance of atrial cardiomyocytes in rats with paroxysmal atrial fibrillation // *Biophysical Reviews*. – V.15, № 5. – pp. 134. (IF – 1.39, SCOPUS) (0.15 / 0.06)*

* – Объём в условных печатных листах / вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ca²⁺ – ионы кальция;
[Ca²⁺]_i – динамическое изменение концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле кардиомиоцитов;

CaCl₂ – хлорид кальция;

cMyBP-C – сердечный миозин-связывающий белок C;

L/L_{MAX} – коэффициент деформации мышечного препарата предсердий, определяющий величину диастолического растяжения;

L₀ – длина мышцы, соответствующая минимальным значениям активной и пассивной сил при выбранных внешних условиях;

L_{MAX} – длина мышцы, соответствующая максимальным значениям активной силы при выбранных внешних условиях;

NO – оксид азота;

RLC – регуляторные лёгкие цепи миозина;

TnI – тропонин I;

TnT – тропонин T;

Тpm – тропомиозин;

V_{дп} – максимальная скорость достижения пика укорочения саркомеров / напряжения кардиомиоцита и/или многоклеточного препарата;

V_{др} – максимальная скорость расслабления саркомера / кардиомиоцита и/или многоклеточного препарата;

АФК – активные формы кислорода;

АЦХ – ацетилхолин;

КДДС – конечно-диастолическая длина саркомеров;

ЛП – левое предсердие;

ПП – правое предсердие;

СР – саркоплазматический ретикулум;

ФП – фибрилляция предсердий

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность Проценко Ю.Л. и Хохловой А.Д. за чуткое руководство исследованием;

Автор глубоко признателен Балакину А.А. и Лисину Р.В. за помощь в реализации ауксотонического режима сокращения сердечной мышцы и ценные комментарии;

Автор сердечно благодарит Копылову Г.К., Щепкина Д.В. и Кочурову А.М. за предоставление данных по профилям фосфорилирования белков саркомера и Мухлынину Е.А. за предоставление данных гистологии;

Автор выражает благодарность Михряковой П.П. за неоценимый вклад в анализ альтернансов сокращения саркомера;

Автор от всей души благодарит коллег и товарищей Мячину Т.А. и Симонову Р.А. за помощь в реализации измерений и обработке большого объёма данных на всех этапах исследования.