

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА

© 2015 г. А.С. Толстокоров* **, Р.А. Сюняев* ** ***, Р.Р. Алиев* ** ***

*Московский физико-технический институт (государственный университет),
141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9;

**НИИ кардиологии Федерального научно-клинического центра
Федерального медико-биологического агентства России, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28;

*** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: roman.syunyaev@gmail.ru

Поступила в редакцию 23.12.14 г.

При математическом моделировании влияния фибробластов на электрическую активность клеток синоатриального узла обнаружено, что взаимодействие с фибробластами через щелевые контакты увеличивает частоту колебаний водителей ритма. Под влиянием фибробластов амплитуда колебаний истинных водителей ритма уменьшается вплоть до прекращения спонтанной активности. Амплитуда колебаний латентных водителей ритма уменьшается значительно слабее.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, синоатриальный узел, щелевые контакты, фибробласты.

Гистологические исследования синоатриального узла выявили существенно гетерогенную структуру ткани в синоатриальном узле и прилежащих областях. В частности, показано, что фибробласты и соединительная ткань составляют значительную часть объема синоатриального узла [1,2], фракция соединительной ткани растет с возрастом [3].

Фибробласты электрически взаимодействуют с клетками-водителями ритма посредством щелевых контактов (в основном – $Sx45$) [4]. Однако до настоящего времени модели электрической активности синоатриального узла, как правило, строились без учета влияния фибробластов и соединительной ткани. Цель настоящего исследования – выяснить, в какой степени электрическая активность клеток-водителей ритма зависит от их взаимодействия с фибробластами через щелевые контакты.

Известно, что фибробласты обладают собственной электрической активностью. Есть данные об экспрессии фибробластами сердца крысы калиевых каналов изоформ $Kv1.6$ (токи замедленного выпрямления) и $Kir2.1$ (токи внутреннего выпрямления) [5,6]. Эти данные позволяют также предположить существование натрий-калиевых насосов и натриевых токов.

УСЛОВИЯ ЧИСЛЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Для описания электрической активности клеток синоатриального узла мы использовали детальную модель, которая включает описание основных ионных токов в клетках синоатриального узла, изменения внутриклеточных концентраций калия, натрия и кальция, функцию саркоплазматического ретикулума, буферизацию кальция, различие между истинными и латентными водителями ритма [7–11]. Для модели фибробласта мы использовали работу [12], где учтены калиевые токи задержанного и внутреннего выпрямления (I_{Kv} , I_{K1}), натрий-калиевый насос (I_{NaK}) и фоновый натриевый ток (I_{bgNa}).

Изменение трансмембранного потенциала кардиомиоцита описывалось дифференциальным уравнением

$$\frac{dV_{SA}}{dt} = -\frac{1}{C_{SA}} \left(\sum I_{gap}(V, t) + g_{gap}(V_{SA} - V_{Fi}) \right),$$

где V_{SA} – трансмембранный потенциал, I_{gap} – мембранные ионные токи, g_{gap} – проводимость щелевых контактов (3 нСм), V_{Fi} – мембранный потенциал фибробласта, C_{SA} – электрическая

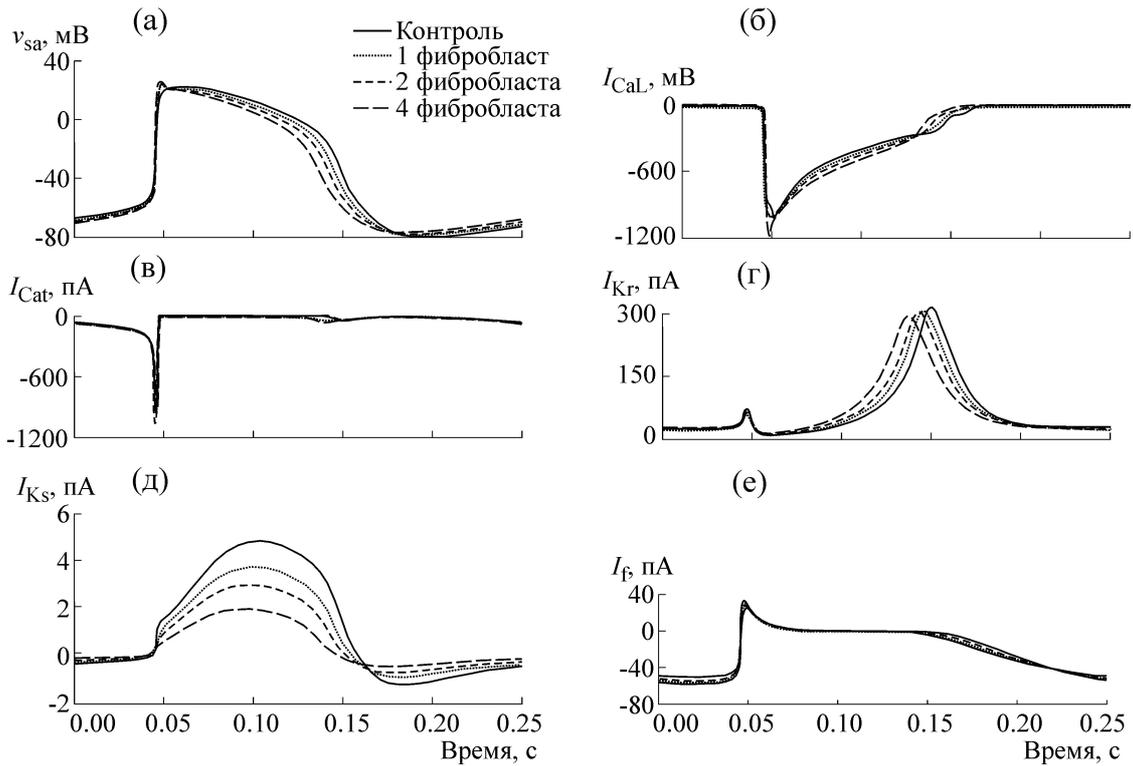


Рис. 1. Трансмембранный потенциал и основные токи изолированного латентного водителя ритма (контроль) и соединенного с одним, двумя и четырьмя фибробластами: (а) – трансмембранный потенциал; (б) – кальциевый ток L-типа; (в) – кальциевый ток T-типа; (г) – быстрая компонента калиевого тока; (д) – медленная компонента калиевого тока; (е) – ток, активируемый при гиперполяризации.

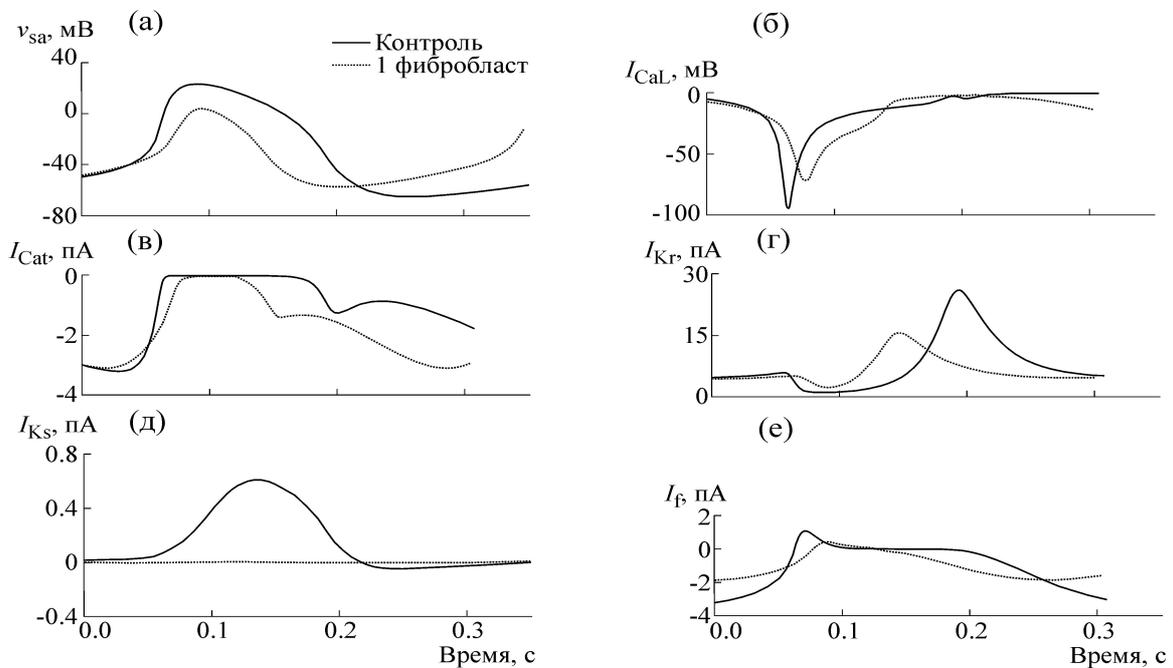


Рис. 2. Трансмембранный потенциал и основные токи изолированного истинного водителя ритма (контроль) и соединенного с одним фибробластом: (а) – трансмембранный потенциал; (б) – кальциевый ток L-типа; (в) – кальциевый ток T-типа; (г) – быстрая компонента калиевого тока; (д) – медленная компонента калиевого тока; (е) – ток, активируемый при гиперполяризации.

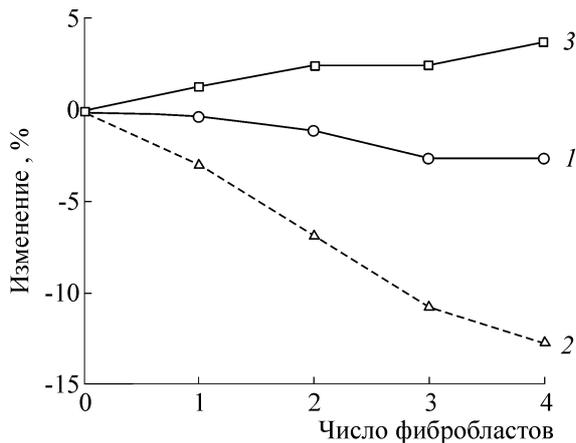


Рис. 3. Изменение периода колебаний (1), длительности потенциала действия (2) и диастолы (3) латентного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов.

емкость мембраны кардиомиоцита. Полный список уравнений и констант, использованный для модели фибробласта, приведен в приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 и 2 изображено взаимодействие истинного и латентного водителей ритма с одним или несколькими фибробластами. В обоих случаях мы наблюдали уменьшение периода спонтанной активности клеток. Эффект был более выраженный при взаимодействии с истинным водителем ритма: период колебаний уменьшился на тридцать процентов (табл. 1). Период колебаний латентного водителя менялся значительно слабее, даже при нагрузке из

четырёх фибробластов период изменился лишь на три процента. При этом относительное изменение длительности потенциала действия, которое вычислялось, как промежуток времени, когда трансмембранный потенциал $E_{SA} > -30$ мВ, составляло 12% (табл. 2, рис. 3). Таким образом, взаимодействие с фибробластами уменьшало длительность потенциала действия и увеличивало длину диастолы (рис. 3)

Влияние фибробластов на амплитуду колебаний истинных и латентных водителей ритма существенно отличалось. На рис. 2 видно, что взаимодействие с фибробластом истинного водителя ритма приводит к уменьшению амплитуды колебаний с 88 до 61 мВ. Взаимодействие с двумя фибробластами (рис. 4) полностью подавляло спонтанную активность истинного водителя ритма, при этом устанавливался трансмембранный потенциал -43 мВ, несколько выше потенциала покоя фибробластов, равного $-49,6$ мВ. Амплитуда колебаний трансмембранного потенциала латентного водителя ритма при взаимодействии с одним-четырьмя фибробластами менялась незначительно (рис. 1). Кроме того, наши расчеты показали, что даже присоединение десяти фибробластов не приводит к подавлению спонтанной активности, при этом период колебаний уменьшался лишь на 10%, а амплитуда — со 105 до 91 мВ.

Влияние фибробластов на основные ионные токи латентного водителя ритма приведено на рис. 1, 5 и в табл. 3. При взаимодействии с четырьмя фибробластами амплитуда натриевого тока уменьшилась с 3,5 до 2,7 нА, однако это компенсировалось двадцатипроцентным (с 1,0 до 1,2 нА) ростом кальциевого тока L-типа. По этой причине при взаимодействии с боль-

Таблица 1. Период колебаний (T), длительность потенциала действия ($ДПД$) и длительность диастолы ($ДД$) истинного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов

Количество фибробластов	Период, с	ΔT , %	$ДПД$, с	$ДД$, с	$\Delta ДПД$, %	$\Delta ДД$, %
0	0,391	0,0	0,137	0,254	0,0	0,0
1	0,271	-30,7	0,083	0,188	-39,4	-26,0

Таблица 2. Период колебаний (T), длительность потенциала действия ($ДПД$) и длительность диастолы ($ДД$) латентного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов

Количество фибробластов	Период, с	ΔT , %	$ДПД$, с	$ДД$, с	$\Delta ДПД$, %	$\Delta ДД$, %
0	0,263	0,0	0,102	0,161	0,0	0,0
1	0,262	-0,4	0,099	0,163	-2,9	1,2
2	0,26	-1,1	0,095	0,165	-6,9	2,5
3	0,256	-2,7	0,091	0,165	-10,8	2,5
4	0,256	-2,7	0,089	0,167	-12,7	3,7

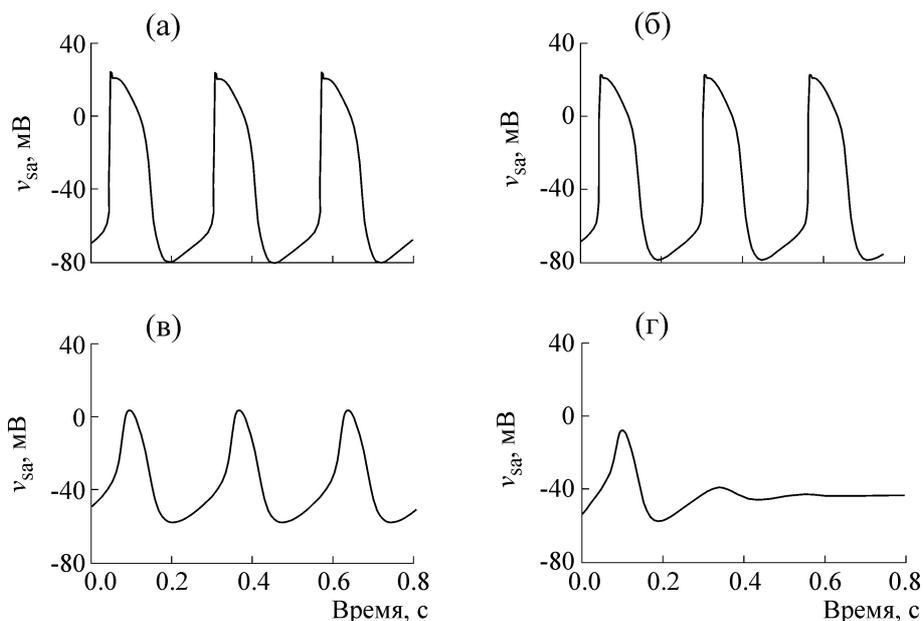


Рис. 4. Потенциал действия истинного и латентного водителей ритма при взаимодействии с одним или двумя фибробластами. Два фибробласта подавляют спонтанную активность истинного водителя ритма. (а) – Латентный водитель ритма, соединенный с одним фибробластом; (б) – латентный водитель ритма, соединенный с двумя фибробластами; (в) – истинный водитель ритма, соединенный с одним фибробластом; (г) – истинный водитель ритма, соединенный с двумя фибробластами.

шим количеством фибробластов отсутствовал овершут, но максимум трансмембранного потенциала оставался фактически неизменным. Отметим также уменьшение амплитуды I_{K_T} с 0,30 до 0,28 нА, что связано с более ранней реполяризацией за счет тока через щелевые контакты.

Влияние фибробластов на токи истинного водителя ритма приведены на рис. 2 и табл. 4. В отличие от латентных водителей ритма, при взаимодействии с одним фибробластом амплитуда кальциевых токов L-типа уменьшилась с 0,1 до 0,07 нА. Отметим также значительное уменьшение калиевых токов: например, амплитуда быстрой компоненты калиевого тока (I_{K_T}) уменьшилась с 0,026 до 0,015 нА.

Соответствующие рис. 1 и 2 ионные токи в фибробластах приведены на рис. 6 и 7. Основным ионным током в этих клетках является калиевый ток задержанного выпрямления (I_{K_V}). Отметим, что при взаимодействии с латентным водителем ритма во время фазы деполяризации эти токи относительно малы, не превышают 13 пА, но сильно возрастают во время фазы реполяризации кардиомиоцита, достигая при этом 50 пА. В данном случае фибробласты играют роль пассивной нагрузки во время фазы деполяризации кардиомиоцитов и активной нагрузки во время реполяризации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Фибробласты в синоатриальном узле электрически связаны с кардиомиоцитами щелевыми контактами, образованными в основном коннексинами Cx45 [4]. Таким образом, фибробласты могут влиять на генерацию ритма синоатриальным узлом. В первую очередь стоит отметить, что влияние фибробластов на клетки синоатриального узла существенно зависит от типа клеток-водителей ритма (рис. 1–3). Мы обнаружили, что в отличие от истинных водителей ритма амплитуда латентных водителей ритма менялась незначительно. Спонтанная активность истинных водителей ритма полностью подавлялась при наличии контакта с двумя фибробластами. В первую очередь, это связано с большей емкостью мембраны латентных водителей ритма (65 пФ против 20 пФ у истинных водителей ритма [7,13]) и экспрессией натриевых каналов в латентных водителях ритма.

Характер влияния фибробластов на кардиомиоциты обусловлен в первую очередь калиевыми токами задержанного выпрямления. Во время фазы быстрой деполяризации латентных водителей ритма ток I_{K_V} фибробластов достигает только значения порядка 13 пА (см. рис. 6), что значительно меньше натриевых токов и кальциевых токов L-типа (более 2,5 и 1 нА

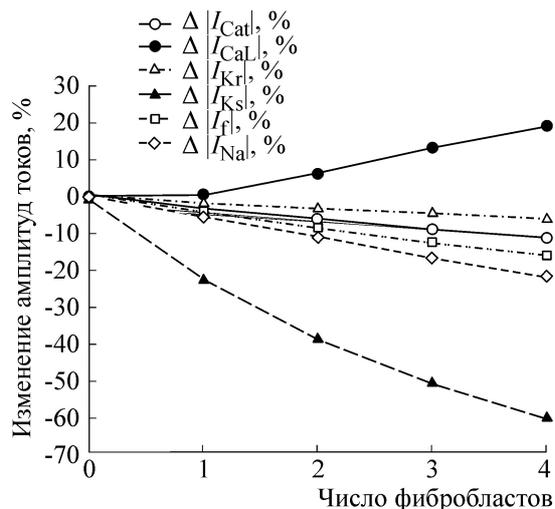


Рис. 5. Амплитуды основных ионных токов латентного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов.

соответственно). Во время этой фазы фибробласт играет роль пассивной нагрузки. С другой стороны, во время фазы реполяризации ток I_{Kv} достигает 50 пА, что сравнимо с током I_{Kr} кардиомиоцитов (порядка 300 пА, см. рис 1, б). В результате длительность потенциала действия кардиомиоцита и его период колебаний уменьшаются, однако амплитуда меняется слабо.

Во время деполяризации истинных водителей ритма величина токов I_{Kv} в фибробластах достигает 22 пА (см. рис. 7), что сравнимо с кальциевыми токами L-типа (70 пА), а максимум токов I_{Kv} составляет 30 пА, что больше калиевых токов в миоците (15 пА). Это объ-

ясняет более сильное влияние фибробластов на амплитуду и период колебаний истинных водителей ритма.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют утверждать, что фибробласты могут оказывать существенное влияние на генерацию ритма клетками синоатриального узла. В первую очередь они оказывают влияние на период спонтанной активности клеток. Однако большое количество фибробластов может подавлять истинные водители ритма. Это позволяет предположить, что в результате в центральной области синоатриального узла может образоваться группа невозбудимых клеток, при сохранении спонтанной активности на периферии, что в свою очередь является причиной опасных аритмий по механизму реентри [15]. Для проверки этой гипотезы требуются дальнейшие исследования с использованием многомерных моделей.

Таким образом, для детального учета динамики в синоатриальном узле требуется принимать во внимание влияние фибробластов, которые могут приводить к изменению ритма, генерируемого синоатриальным узлом на 10% и более, а в исключительных случаях способствовать патологической активности за счет локального подавления активности истинных водителей ритма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 14-04-31620 и 13-04-00438.

Таблица 3. Амплитуды основных ионных токов латентного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов

Количество фибробластов	$ I_{CatL} $, пА	$ I_{CaL} $, пА	$ I_{Kr} $, пА	$ I_{Ks} $, пА	$ I_f $, пА	$ I_{NaL} $, пА
0	100,2	985	300	6,0	89,8	3479
1	97,0	988	295	4,6	85,9	3287
2	94,0	1047	291	3,7	82,1	3096
3	91,3	1120	286	2,9	78,5	2907
4	88,8	1175	281	2,4	75,5	2721

Таблица 4. Амплитуды основных ионных токов истинного водителя ритма в зависимости от числа фибробластов

Количество фибробластов	$ I_{CatL} $, пА	$ I_{CaL} $, пА	$ I_{Kr} $, пА	$ I_{Ks} $, пА	$ I_f $, пА
0	3,19	95	24,9	0,653	4,5
1	3,10	73	15,4	0,007	2,3

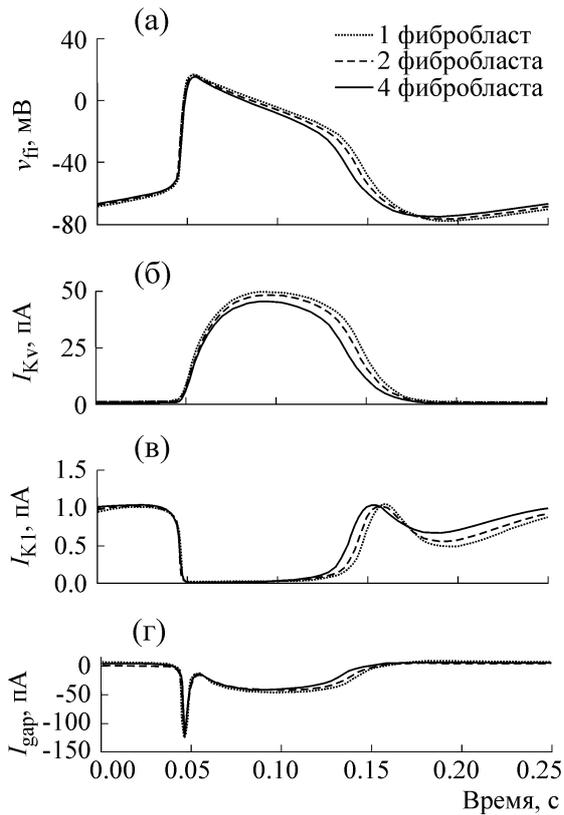


Рис. 6. Трансмембранный потенциал и основные ионные токи фибробласта, соединенного с латентным водителем ритма (см. рис. 1). (а) – Трансмембранный потенциал; (б) – калиевый ток задержанного выпрямления; (в) – калиевый ток внутреннего выпрямления; (г) – ток через щелевые контакты.

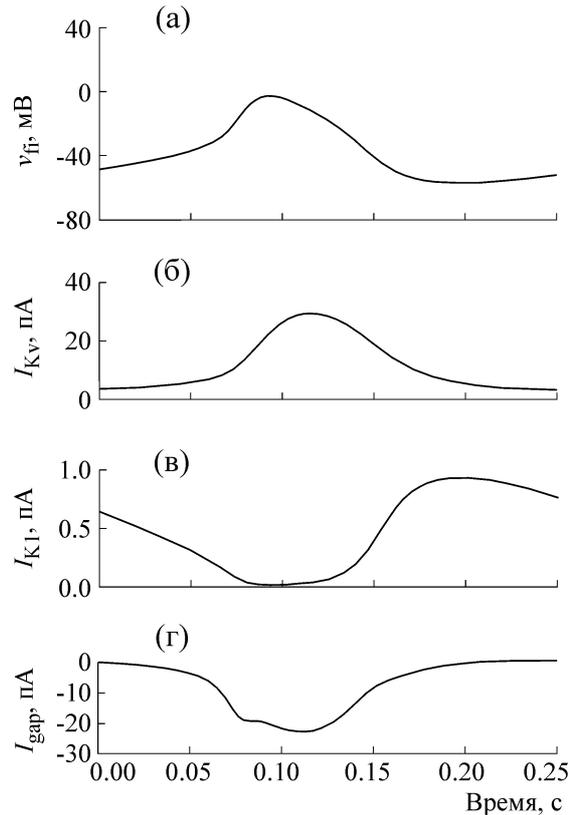


Рис. 7. Трансмембранный потенциал и основные ионные токи фибробласта, соединенного с истинным водителем ритма (см. рис. 2). (а) – Трансмембранный потенциал; (б) – калиевый ток задержанного выпрямления; (в) – калиевый ток внутреннего выпрямления; (г) – ток через щелевые контакты.

ПРИЛОЖЕНИЕ

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ
МОДЕЛЬ ФИБРОБЛАСТА

Изменение трансмембранного потенциала фибробласта:

$$\frac{dV_B}{dt} = -\frac{1}{C_{mf}} \left[\sum I_{fi}(V_{fi}, t) + G_{gap}(V_{fi} - V_{sa}) \right], \quad (1)$$

где V_{fi} – трансмембранный потенциал фибробласта, $C_{mf} = 6,3$ пФ – емкость мембраны фибробласта, $\sum I_{fi}(V_{fi}, t)$ – сумма ионных токов через мембрану фибробласта, $G_{gap}(V_{fi} - V_{sa})$ – ток через щелевые контакты, $G_{gap} = 3$ нСм – проводимость щелевых контактов между кардиоцитом и фибробластом.

Калиевый ток задержанного выпрямления:

$$I_{Kv} = g_{Kv} r_{Kv} s_{Kv} (V_{fi} - E_K), \quad (2)$$

$$\frac{dr_{Kv}}{dt} = \frac{r_{Kv} - \bar{r}}{\tau_r}, \quad (3)$$

$$\frac{ds_{Kv}}{dt} = \frac{s_{Kv} - \bar{s}}{\tau_s}, \quad (4)$$

$$\tau_r = 0,0203 + 0,138 \exp \left(- \left(\frac{V_{fi} + 20,0}{25,9} \right)^2 \right), \quad (5)$$

$$\tau_s = 1,574 + 5,268 \exp \left(- \left(\frac{V_{fi} + 23,0}{22,7} \right)^2 \right), \quad (6)$$

$$\bar{r} = \frac{1}{1 + \exp \left(- \frac{V_{fi} + 20,0}{11,0} \right)}, \quad (7)$$

$$\bar{s} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_{fi} + 23,0}{7,0}\right)}, \quad (8)$$

где $E_K = \frac{RT}{F} \log \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o}$ – потенциал Нернста ионов калия, $[K^+]_i$ и $[K^+]_o$ – внутриклеточная концентрация ионов калия (127,4 ммоль/л) и концентрация ионов калия в межклеточной среде (5 ммоль/л) соответственно, $g_{Kv} = 0,25$ нСм/пФ – максимальная проводимость для каналов I_{Kv} ,

s_{Kv} и r_{Kv} – воротные переменные медленной и быстрой компонент, в начальный момент времени равные 1 и 0 соответственно.

Калиевый ток внутреннего выпрямления:

$$I_{K1} = \frac{g_{K1} \alpha_{K1} (V_{fi} - E_K)}{\alpha_{K1} + \beta_{K1}}, \quad (9)$$

$$\alpha_{K1} = \frac{0,1}{1 + \exp(0,06(V_{fi} - E_K - 200))}, \quad (10)$$

$$\beta_{K1} = \frac{3 \exp(0,0002(V_{fi} - E_K + 100)) + \exp(0,1(V_{fi} - E_K - 10))}{1 + \exp(-0,5(V_{fi} - E_K))}, \quad (11)$$

где $g_{K1} = 482,2$ нСм/пФ – максимальная проводимость для токов I_{K1} .

Натрий-калиевый насос:

$$I_{NaK} = \bar{I}_{NaK} \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{mK}} \right) \left(\frac{[Na^+]_i^{(3/2)}}{[Na^+]_i^{(3/2)} + K_{mNa}^{(3/2)}} \right) \frac{V_{fi} - V_{rev}}{V_{fi} - B}, \quad (12)$$

где $\bar{I}_{NaK} = 2,002$ пА/пФ – максимальный генерируемый ток, $[Na^+]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов натрия (начальное значение 8,006 ммоль/л), K_{mK} и K_{mNa} – константы Михаэлиса для калия и натрия, равные 1,0 ммоль/л и 11,0 ммоль/л соответственно, $V_{rev} = -150$ мВ – реверсивный потенциал натрий-калиевого насоса, $B = -200$ мВ – эмпирически определенная константа.

Фоновый натриевый ток:

$$I_{bNa} = G_{bNa} (V_{fi} - E_{Na}), \quad (13)$$

где $G_{bNa} = 0,0095$ нСм/пФ – максимальная проводимость каналов I_{bNa} , $E_{Na} = \frac{RT}{F} \log \frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_o}$ – потенциал Нернста ионов натрия, $[Na^+]_i$ и $[Na^+]_o$ – внутриклеточная концентрация ионов натрия (8,0 ммоль/л) и концентрация ионов в межклеточной среде (140,0 ммоль/л) соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Dobrzynski, J. Li, J. Tellez, et al., *Circulation* **111**, 846 (2005).
2. T. Opthof, B. de Jonge, H. J. Jongasma, and L. N. Bouman, *Eur. Heart J.* **8**, 1249 (1987).
3. A. Biernacka and N. G. Frangogiannis, *Aging and Disease* **2** (2), 158 (2011).
4. P. Camelliti, C.R. Green, I. LeGrice, and P. Kohl, *Circ. Res.* **94** (6), 828 (2004).
5. Y. Shibukawa, E. L. Chilton, K. A. MacCannell, et al., *Biophys J.* **88** (6), 3924 (2005).
6. L. Chilton, S. Ohya, D. Freed, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288** (6), H2931 (2005).
7. H. Zhang, A. V. Holden, I. Kodama, et al., *Am. J. Physiol.* **279**, H397(2000).
8. Р. Р. Алиев, В. В. Федоров и Л. В. Розенштраух, *Докл. РАН* **397** (5), 697 (2004).
9. Р. Р. Алиев, В. В. Федоров и Л. В. Розенштраух, *Докл. РАН* **402** (4), 548 (2005).
10. Р. Р. Алиев и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН* **402** (5), 689 (2005).
11. Р. Р. Алиев, *Концептуальные и детальные модели электрической активности миокарда* (Lambert Acad. Publ., 2012), ISBN 978-3-8465-3943-9.
12. K. A. MacCannell, H. Bazzazi, L. Chilton, et al., *Biophys. J.* **92** (11), 4121 (2007).
13. H. Honjo, M. R. Boyett, I. Kodama, and J. Toyama, *J. Physiol.* **496** (Pt 3), 795 (1996).
14. A. Kamkin, I. Kiseleva, G. Isenberg, et al., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **82** (1–3), 111 (2003).
15. Р. А. Сяняев и Р. Р. Алиев, *Биофизика* **57** (5), 870 (2012).

Computer Simulation of Fibroblast Effect on Electrical Activity in Sinoatrial Node Cells

A.S. Tolstokorov* **, R.A. Syunyaev* ** *, and R.R. Aliev* ** *****

**Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

***Institute of Cardiology, Federal Scientific & Clinical Center for Federal Biomedical Agency of Russia,
Orehovyj bulvar 28, Moscow, 115682 Russia*

****Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Computer simulation of the electrical activity in sinoatrial node cells interacting via gap junctions with fibroblasts revealed that interaction with fibroblasts results in greater oscillation frequency of sinoatrial node cells. We have found out that fibroblasts also decrease the oscillation amplitude of the intrinsic central cells or completely suppress their spontaneous activity, while weakly affect the oscillation amplitude of peripheral cells.

Key words: computer simulation, sinoatrial node, gap junctions, fibroblasts