

КООПЕРАТИВНОСТЬ МЕХАНО-КАЛЬЦИЕВЫХ ОБРАТНЫХ СВЯЗЕЙ В МИОКАРДЕ. НЕКОТОРЫЕ КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПРОТИВОРЕЧИЯ И ИХ ПРЕОДОЛЕНИЕ В РАМКАХ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

© 2016 г. А.Д. Докучаев*, Е.В. Шихалева*, Т.Б. Сульман*, Н.А. Викулова* **, Л.В. Никитина*, Л.Б. Кацнельсон* **

*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,
620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

**Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

E-mail: l.katsnelson@iip.uran.ru

Поступила в редакцию 08.06.16 г.

Важным звеном электромеханического сопряжения, ключевого механизма авторегуляции сократительной активности миокарда, являются механо-кальциевые обратные связи, обеспечивающие тонкую подстройку электрической и кальциевой активации сердечной мышцы к механическим условиям сокращений. Существует множество экспериментальных и теоретических свидетельств в пользу того, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов от концентрации поперечных мостиков – центральный механизм, лежащий в основе механо-кальциевых обратных связей в интактном миокарде. В то же время эксперименты, проведенные на скинированных препаратах миокарда, демонстрируют, что механические условия значительно влияют только на кальциевую чувствительность стационарной связи «Са–сила», но практически не влияют на ее коэффициент кооперативности Хилла. Эти данные заставили ряд исследователей подвергнуть сомнению вклад кооперативности в механо-кальциевые обратные связи. Для преодоления сложившегося противоречия мы предлагаем усовершенствованную концепцию кооперативности, имеющей разную степень выраженности в стационарном состоянии и в переходном процессе. Предлагаемая концепция позволяет одновременно воспроизвести и объяснить в рамках математической модели как механо-зависимость кальциевой активации в интактном миокарде, так и данные, полученные на скинированной мышце.

Ключевые слова: миокард, кальциевая активация, механо-кальциевые обратные связи, кооперативность.

Существуют различные внутриклеточные механизмы, позволяющие сердечной мышце приспособляться к разным механическим условиям, в которых происходит сокращение (например, предрастяжение или укорочение под нагрузкой). Среди них особое внимание в современных исследованиях уделяется двум типам механизмов – механо-чувствительности некоторых ионных каналов клеточной мембраны и механо-чувствительности кальциевой регуляции тонких нитей саркомеров. Особое внимание уделяется изучению прямых и обратных связей между механическими условиями сокращения

мышцы и ее кальциевой активацией. При этом целый ряд феноменов в принципе нельзя объяснить влиянием ионных токов через механо-чувствительные ионные каналы. Например, активность таких каналов не может объяснить дополнительное свечение внутриклеточного кальция, наблюдаемое при укорочении [1]. Тем более они не могут иметь отношение к влиянию длины на кальциевую чувствительность зависимости между стационарной концентрацией свободного кальция и развиваемым напряжением (связь «Са–сила» или «рСа–сила» для случая концентрации, выраженной в единицах $-\lg[\text{Ca}^{2+}]$) в скинированной сердечной мышце [2,3], поскольку в таком препарате они попросту отсутствуют.

Предмет данного исследования – механизмы второго типа, реализующие вклад механических

Сокращения: Xb – поперечные мостики, CaTnC – кальций-тропониновые комплексы, AL (Affinity Limit) – максимальное значение константы сродства в стационарном состоянии.

факторов в кальциевую регуляцию тонких нитей. Наиболее важными среди них являются механизмы кооперативности, модулирующие взаимодействие регуляторных и сократительных белков в кардиомиоцитах [4–7]. Один из этих механизмов описывает влияние поперечных мостиков (Хb) на сродство тропонина С к кальцию (первый тип кооперативности), другой – влияние кальций-тропониновых комплексов (CaTnC) на это сродство (второй тип кооперативности).

Как отмечалось в работе [5], эти два механизма вносят значительный вклад в регуляцию сократительной активности сердечной мышцы. В частности, предполагается, что эти механизмы лежат в основе влияния механических условий сокращений миокарда на активацию/инактивацию сократительной функции [8–13]. А именно, увеличение расстояния между актиновыми и миозиновыми нитями в ходе укорочения мышцы (саркомеров) уменьшает вероятность образования поперечных мостиков, что через первый тип кооперативности уменьшает концентрацию кальций-тропониновых комплексов, а второй тип усиливает этот эффект. В результате происходит инактивация сердечной мышцы. Наоборот, увеличение длины мышцы (саркомеров) способствует ее активации.

Ранее в рамках математической модели сократительной активности миокарда нами было установлено, что именно эта цепочка внутриклеточных событий предопределяет широкий спектр экспериментально установленных механо-механических, механо-кальциевых и механо-электрических обратных связей в ходе циклов сокращения–расслабления миокарда и является причиной таких фундаментальных эффектов, характерных для сердечной мышцы, как ее грузозависимое расслабление и инактивация в ответ на кратковременные деформации в ходе изометрического сокращения. В модели показано, что эта же цепочка событий ответственна за тесно связанные с данными эффектами механозависимые различия во временном ходе изменения концентрации кальция в цитозоле (кальциевых переходах) и длительностях потенциалов действия, обнаруженные в классических экспериментальных исследованиях на папиллярных мышцах и трабекулах около тридцати лет назад [1,14,15] и впоследствии многократно подтвержденные в других работах [16–22], в том числе и на изолированных клеточных препаратах [23,24].

Более того, модель предсказывает, что первый тип кооперативности – важный механизм, позволяющий сегментам неоднородного мио-

карда подстраиваться друг к другу в процессе их механического взаимодействия [25]. С другой стороны, согласно предсказаниям модели, первый тип кооперативности – один из главных внутриклеточных механизмов, ответственных за известный патологический феномен – нарушение сердечного ритма при перегрузке кардиомиоцитов кальцием [26].

Таким образом, сформировалось и подкреплено большим количеством экспериментальных и теоретических работ (в том числе и наших) представление о значительном вкладе указанных механизмов кооперативности в регуляцию сократительного цикла сердечной мышцы и в ритмоинотропные явления в нормальных и патологических условиях. Причем кооперативность выступает во всех этих случаях как ключевой механизм, обеспечивающий механозависимость кальциевой регуляции циклов сокращения–расслабления миокарда.

С другой стороны, в серии работ, выполненных на протяжении последних десяти лет рядом исследователей на скинированных мышечных препаратах, в том числе сердечных (трабекулах), было установлено, что изменение длины препарата и/или межфиламентарного расстояния в его саркомерах заметно влияет на кальциевую чувствительность стационарной кривой «pCa–сила» (т.е. на ее сдвиг вдоль оси pCa), однако очень слабо влияет на величину коэффициента кооперативности Хилла (т.е. на наклон этой кривой) [2,3,27–31]. Коэффициент кооперативности Хилла связи «pCa–сила» считается интегральным показателем всех типов кооперативности, модулирующих контрактильные свойства миоцита. Справедливо замечание, сделанное в одной из обзорных статей, посвященных исследованиям механизмов кооперативности: «Хотя изменения коэффициента Хилла означают, что кооперативность изменилась, однако из этого вовсе не следует с определенностью, что изменения кооперативности должны всегда вызывать изменения в наклоне кривой «pCa–сила»...» [13]. Тем не менее следует признать, что отсутствие изменений наклона этой кривой – серьезное основание для постановки вопроса о том, произошли ли изменения в кооперативности. Поэтому неудивительно, что результаты, полученные авторами вышеупомянутых работ, заставили самих авторов и многих других исследователей усомниться в наличии существенно длинноразмерной кооперативности, а значит, и во вкладе механизмов кооперативности в механозависимость кальциевой активации мышечных сокращений.

Таким образом, по данному вопросу имеются, на первый взгляд, весьма противоречивые

воззрения. При этом позиции каждой из сторон достаточно сильно аргументированы.

Нам представляется, что это противоречие является мнимым и что все перечисленные выше данные могут быть хорошо согласованы друг с другом, если допустить, что кооперативная зависимость кинетики комплексов CaTnC от концентрации поперечных мостиков и самих комплексов (то есть кооперативность первого и второго типов) имеет разную степень выраженности в стационарном состоянии (при постоянном уровне кальция и соответственно при постоянной концентрации прикрепившихся Xb) и в переходном процессе в ответ на изменение концентрации Xb. Нами в рамках математической модели предпринята попытка дать строгое определение кооперативности таким образом, чтобы реализовать указанное ее свойство.

Заключая обзор работ, посвященных состоянию дел в данной области исследований в мировой науке, следует упомянуть, что с помощью математического моделирования уже предпринималась попытка показать, что значительная длинозависимость кооперативности первого типа (Xb–CaTnC) гипотетически может сочетаться со слабой длинозависимостью коэффициента кооперативности Хилла кривой «pCa–сила». В рамках относительно простой математической модели было продемонстрировано, что влияние длины на угол наклона этой кривой через кооперативность Xb–CaTnC может компенсироваться противоположенным влиянием длины на этот угол через другие механизмы кооперативности [32]. Иначе говоря, будучи интегральным показателем кооперативности, коэффициент Хилла может испытывать влияние разнонаправленных факторов и из-за этого быть нечувствительным к каждому из них по отдельности. Однако в рамках упомянутой работы моделировалось только стационарное поведение скринированного миокарда при постоянных концентрациях кальция. Вопрос о том, как механизмы, заложенные авторами в модель, поведут себя в нативных условиях, т.е. в циклах сокращения–расслабления, не был изучен. В частности, не было установлено, способна ли противоположным образом направленная длинозависимость разных механизмов кооперативности обеспечить эффекты грузозависимого расслабления и другие феномены механозависимой активации, а также соответствующую механозависимость кальциевых переходов.

В одной из ранних версий нашей собственной модели механической активности миокарда [33] нам также удавалось получить стационарную кривую «pCa–сила», смещение которой вдоль оси pCa существенно зависело от пред-

растяжения виртуального образца, но наклон этой кривой (в нормированных координатах силы) при изменении длины фактически не изменялся. Однако в той версии модели кинетика образования поперечных мостиков была чрезмерно упрощена, и сегодня это не позволяет считать вполне убедительными полученные в ее рамках результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы предложили и верифицировали с помощью математического моделирования концепцию и уравнения модифицированной кооперативности, которые развивают наши предыдущие разработки.

Ранее нами была разработана и опубликована модель электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах (модель «Екатеринбург–Оксфорд») [26,34–37]. Эта модель давала возможность имитировать и объяснить широкий круг эффектов, наблюдаемых *in vitro* в циклах сокращения–расслабления интактной сердечной мышцы, демонстрирующих обратные механокальциевые и механоэлектрические обратные связи. Механизмы кооперативности поперечных мостиков и комплексов CaTnC лежали в основе этого объяснения.

Дифференциальные уравнения (1) и (2) описывали кинетику CaTnC и Xb в той модели:

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = k_+(v)M(A)n_1(l_1)L_{oz}(1-N) - k_-(v)N, & (1) \\ \frac{dA}{dt} = a_{on}(A_{tot} - A)Ca_C - a_{off}A, & (2) \end{cases}$$

где

$$a_{off} = \bar{a}_{off}\pi(N)e^{-k_A A}, \quad (2a)$$

$$M(A) = \frac{(A/A_{tot})^\mu(1 + k_\mu^\mu)}{(A/A_{tot})^\mu + k_\mu^\mu}, \quad (3)$$

$$\pi(N) = \begin{cases} 1, & N \leq 0, \\ \pi_0^s e^N, & 0 < N < \frac{1}{s_c}, \\ \pi_0, & N \geq \frac{1}{s_c}, \end{cases} \quad (4)$$

$$L_{oz} = (l_1 + s_0)/(0,46 + s_0). \quad (5)$$

В этих уравнениях l_1 – длина саркомера, $v = dl_1/dt$, N – число поперечных мостиков, $A = [CaTnC]$ (концентрация CaTnC), $a_{off} = \bar{a}_{off}\pi(N)e^{-k_A A}$ – «константа» скорости распада

CaTnC в модели до модификации, $\pi(N)$ – функция, задающая кооперативность Xb–CaTnC (см. ниже).

Кроме того, модель включает уравнения, связывающие величину N с механическими переменными, и уравнения, описывающие регуляцию Ca^{2+} и развитие потенциалов действия в циклах сокращения–расслабления [26].

В показанных формулах $k_+(v)$, $k_-(v)$, $n_1(l_1)$ – явные функции, детально описанные в наших ранних публикациях [26]. В частности, функция $n_1(l_1)$ в уравнении (1) опосредованно отражает зависимость N от расстояния между толстыми и тонкими нитями саркомера (это расстояние зависит от длины саркомера из-за неизменности его объема в процессе сокращения). Именно $n_1(l_1)$ вместе с кооперативностью Xb–CaTnC предопределяет механочувствительность кальциевой активации сокращений миокарда. Первый и второй тип кооперативности учтены в кинетических уравнениях модели, а именно они входят в элемент a_{off} уравнения (2):

- кооперативность Xb–CaTnC (монотонно убывающая функция $\pi(N)$ в формуле, задающей a_{off}): сродство CaTnC возрастает с ростом числа поперечных мостиков, прикрепившихся вокруг каждого комплекса CaTnC, и потому с ростом N ;

- кооперативность CaTnC–CaTnC (функция $e^{-k_A A}$ в формуле, задающей a_{off}): сродство каждого CaTnC возрастает с ростом концентрации остальных комплексов CaTnC в результате тропонин-тропомиозиновых конформаций после связывания тропонина С с Ca^{2+} .

Сформулированное выше определение кооперативностей Xb–CaTnC и CaTnC–CaTnC, основанное на явных функциях $\pi(N)$ и $e^{-k_A A}$ в том или ином виде проявлялось в численных экспериментах, имитирующих два разных типа реальных экспериментальных условий: (а) – стационарные условия, типичные для экспериментов на скинированных мышечных препаратах для построения связи «рСа–сила», (б) – переходные процессы, типичные, в частности, для циклов сокращения–расслабления интактной сердечной мышцы.

Как уже отмечалось, такая кооперативность в предыдущих версиях нашей модели позволяла нам адекватно воспроизводить и объяснять ключевые эффекты механокальциевых и механоэлектрических обратных связей в интактном миокарде. В то же время, моделируя связь «рСа–сила», мы получили корректные характеристики этой связи (такие, как длиннoзависимость его чувствительности к кальцию, а не к его коэффициенту Хилла) в модели только для малой

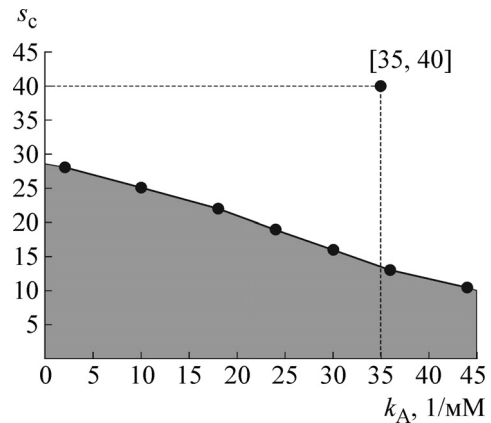


Рис. 1. Диапазон значений параметров кооперативности s_c и k_A (заштрихованная часть плоскости), в которых корректно воспроизводилась S-образная форма кривой «Ca–N» в модели с уравнениями (1)–(5) до их модификации. Точка с координатами $k_A = 35$, $s_c = 40$ – базовые значения параметров.

степени кооперативности, например, для малых значений параметра k_A , которые не были достаточны для воспроизведения эффектов механокальциевой и механоэлектрической обратной связи в циклах сокращения–расслабления интактного миокарда. Другими словами, сигмоидальный характер связи «Са–сила» воспроизводился в диапазоне значений параметров кооперативности первого и второго типа (s_c и k_A), показанном на рис. 1 в виде заштрихованной области. Если бы мы в своем исследовании занимались только оценкой зависимости «Са–сила» скинированной сердечной мышцы (чем, к сожалению, часто и ограничиваются как физиологи-экспериментаторы, так и теоретики, использующие математические модели), то данный результат показался бы вполне удовлетворительным, и дальнейший анализ проблемы не был бы выполнен. Однако нативные кардиомиоциты обладают мембраной и поэтому функционируют вовсе не в условиях загрузки кальцием на том или ином постоянном уровне, а в условиях быстрых и коротких изменений концентрации внутриклеточного кальция, возникающих в ответ на электрический стимул. Именно в этих режимах работы миокарда (включая, в частности, режимы его нагруженного укорочения/растяжения) осуществляются основные механокальциевые, механоэлектрические и механомеханические обратные связи. Эти связи проявляются в виде эффектов, зафиксированных в реальных экспериментах (в том числе феномен грузозависимого расслабления и эффекты циклических деформаций), которые успешно имитировались в модели, благодаря

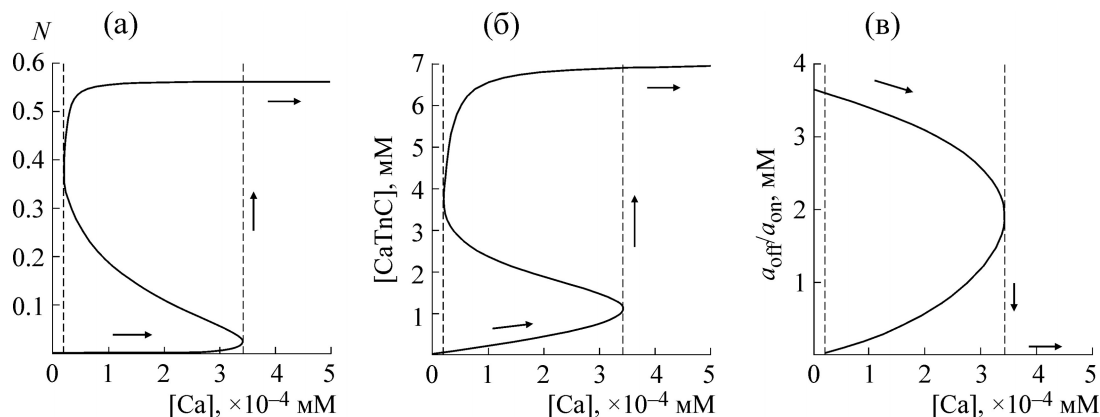


Рис. 2. Кривые стационарных связей между $[Ca^{2+}]$ и концентрацией поперечных мостиков (а), концентрацией кальций-тропониновых комплексов (б) и обратной константой равновесия комплексов a_{off}/a_{on} (в) на базовых параметрах модели до модификации описания механизмов кооперативности (подробности см. в тексте).

уравнениям (1)–(4) при базовых значениях параметров кооперативности s_c и k_A .

Как видно из рис. 1, точка, соответствующая этим базовым значениям (обозначена черным квадратиком), расположена очень далеко от заштрихованной зоны. Разумеется, указанные обратные связи, характерные для циклов сокращения–расслабления миокарда, проявляются в модели не только в данной точке значений параметров, а в достаточно большой области вокруг нее. Но по мере удаления от данной точки в направлении заштрихованной зоны выраженность соответствующих эффектов (прежде всего грузозависимого расслабления) ослабевает, а в самой заштрихованной зоне исчезают вообще. Таким образом, оказалось, что области, в которых в модели адекватно воспроизводится связь «Ca–сила» в имитируемой скинированной сердечной мышце и обратные связи в модели интактного миокарда, не только не совпадают, но даже не пересекаются (речь идет о модели до модификации механизмов кооперативности).

Проанализируем подробнее характер кривой «Ca–сила» при базовых значениях параметров кооперативности: ее отклонение от сигмоидального вида и другие особенности. Эти особенности как раз и дали нам ключ к построению уравнений модифицированной кооперативности.

На рис. 2 показаны кривые, полученные при базовых значениях параметров s_c и k_A , а именно:

- стационарная кривая «Ca–N», которая с точностью до нормировки совпадает со стационарной связью «Ca–сила» (рис. 2а);

- соответствующая ей стационарная кривая «Ca–A» (т. е. соотношение между уровнем по-

стоянного кальция и стационарным уровнем CaTnC) (рис. 2б);

- соответствующая стационарная кривая «Ca– a_{off}/a_{on} », где a_{off}/a_{on} – величина, обратная константе равновесия кинетики комплексов CaTnC, установившаяся в стационарном режиме при соответствующем постоянном уровне кальция (рис. 2в).

Первое, что видно на этих рисунках, – отсутствие однозначного соответствия между уровнем кальция и соответствующими характеристиками N , A , a_{off}/a_{on} : одному значению Ca может соответствовать до трех значений каждой из этих характеристик.

Качественный анализ уравнений показал, что устойчивыми среди этих стационарных решений оказались далеко не все. А именно, устойчивы только те решения, которые на графике «Ca–N» находятся левее и ниже точки с координатами $Ca = 0,00034$; $N = 0,0267$, а также правее и выше этой точки (соответственно, на графике «Ca–A» – такая бифуркационная точка имеет координаты $Ca = 0,00034$; $A = 0,01054$, а на «Ca– a_{off}/a_{on} » – координаты $Ca = 0,00034$; $a_{off}/a_{on} = 0,00178$). Все остальные стационарные точки, лежащие на нарушающих однозначность витках этих трех кривых, – неустойчивые стационарные решения, а значит, они никогда не реализуются в динамическом процессе.

Иными словами, когда в модели мы при базовых значениях параметров s_c и k_A имитировали эксперименты на скинированном препарате, т.е. не просто находили стационарные точки как решения системы алгебраических уравнений (получаемой приравнением к нулю левых частей дифференциальных уравнений (1) и (2)), а воспроизводили переход с одного постоянного уровня кальция на другой в самих

дифференциальных уравнениях (1) и (2), то для значений $Ca \in [0; 0,00034]$ после переходного процесса устанавливались значения N и A , лежащие на нижних ветках кривых « $Ca-N$ » и « $Ca-A$ », и значения a_{off}/a_{on} , лежащие на верхней ветке соответствующей кривой.

При пересечении правой границы отрезка $[0; 0,00034]$, т.е. при переходе к большим значениям концентрации кальция, система в результате переходного процесса осуществляет скачок, т.е. переходит сразу к максимальным значениям N и A , лежащим на горизонтальных верхних ветках соответствующих кривых, и к минимальным значениям a_{off}/a_{on} . Направления переходов в пределах отрезка $[0; 0,00034]$ и направление скачка при пересечении правой границы этого отрезка показаны стрелками на рис. 2.

Обозначим значение Ca , при котором происходит описанный скачок стационарных значений характеристик модели, символом Ca_j , а сами критические величины N , A и a_{off}/a_{on} , соответствующие на графиках этому Ca_j , символами N_j , A_j и a_j . Разумеется, полученные в описанных выше численных экспериментах значения $Ca_j = 0,00034$, $N_j = 0,0267$, $A_j = 0,01054$ и $a_j = 0,00178$ не являются некими незыблемыми величинами, найденными в модели раз и навсегда. Конкретные численные значения Ca_j , N_j , A_j и a_j могут варьировать в зависимости от полного набора базовых значений параметров модели, включая s_c и k_A , но не ограничиваясь этими двумя параметрами (все параметры, фигурирующие в формулах (1)–(4) влияют на критические величины Ca_j , N_j , A_j и a_j).

В более содержательных терминах переходной процесс, приводящий к скачку при переходе через критическую границу стационарной концентрации кальция Ca_j в модели (до модификации кооперативности), может быть описан следующим образом:

1) в соответствии с уравнением (2) возрастает концентрация комплексов $CaTnC$;

2) в ответ возрастает количество прикрепившихся миозиновых поперечных мостиков, в соответствии с уравнением (1);

3) вследствие событий 1) и 2) благодаря кооперативности первого и второго типов уменьшается «константа» скорости распада кальций-тропониновых комплексов a_{off} и вместе с ней величина a_{off}/a_{on} ;

4) уменьшение a_{off}/a_{on} в свою очередь вызывает рост $[CaTnC]$ и так далее. Иными словами, события 1) – 3) циклически повторяются вновь и вновь, приводя к все более значительному росту фазовых переменных A и N . Заме-

тим, что прирост кальция в пределах отрезка $[0; Ca_j]$ (т.е. такой прирост, при котором кальций оставался меньше критической величины Ca_j , а a_{off}/a_{on} соответственно оставалась больше, чем a_j) также вызывал аналогичный переходной процесс, однако этот процесс стабилизировался при достижении устойчивых стационарных решений системы уравнений (1), (2), располагающихся на нижних ветках кривых, показанных на рис. 2а и 2б, т.е. меньших, чем N_j и A_j . В соответствии с этим, обратная «константа» равновесия a_{off}/a_{on} стабилизировалась на новом стационарном уровне, большем, чем a_j . Однако после перехода критической границы Ca_j для концентрации кальция в модели (до модификации кооперативности) устойчивыми оказываются только стационарные значения, лежащие на верхних ветках кривых « $Ca-N$ » и « $Ca-[CaTnC]$ » (рис. 2а и 2б), именно к ним и приводят изложенные выше циклически повторяющиеся события 1) – 3), т.е. только на этих значениях стабилизируется переходной процесс, вызванный приростом кальция с пересечением критической границы Ca_j . Одновременно с этим величина a_{off}/a_{on} после уменьшения ниже критического порога a_j в том же переходном процессе регрессирует вплоть до минимальных значений на рис 2в. Все это и означает скачок стационарных уровней A , N и a_{off}/a_{on} .

Проведенный анализ подсказывает определенный путь модификации кооперативности: эта модификация должна противодействовать регрессии характеристики a_{off}/a_{on} в переходном процессе после пересечения критического порога a_j .

Таким образом, пороговая величина a_j должна быть одним из ключевых параметров модели с модифицированной кооперативностью, а необходимое противодействие регрессии «константы» скорости распада кальций-тропониновых комплексов обеспечивается заменой формулы (2а), определяющей эту «константу» в приведенной выше системе уравнений (1)–(5), на формулу (2б) следующего вида:

$$a_{off} = \alpha \underbrace{[\bar{a}_{off} \pi(N) e^{-k_A A}]}_{a_{off1}} + (1 - \alpha) \underbrace{[a_{on} a_j]}_{a_{off2}}. \quad (26)$$

Здесь

$$\alpha = \begin{cases} 1, & \text{для } [\bar{a}_{off} \pi(N) e^{-k_A A}] > a_{on} a_j, \\ \text{решение диф. уравнения (2г), для} \\ & [\bar{a}_{off} \pi(N) e^{-k_A A}] \leq a_{on} a_j. \end{cases} \quad (26)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = -\eta\alpha, \quad (2г)$$

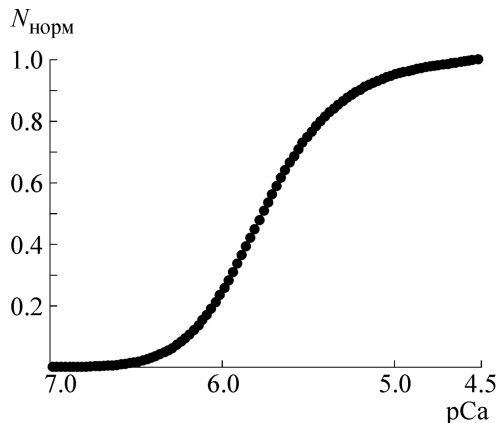


Рис. 3. Стационарная связь между $[Ca^{2+}]$, выраженной в единицах $-lg[Ca^{2+}]$ (pCa), и концентрацией поперечных мостиков, нормированной на свое максимальное значение при насыщающей $[Ca^{2+}]$ (N_{norm}), полученная в модели при базовых значениях параметров после модификации уравнений кооперативности.

где $\eta = \frac{1}{\tau_{\infty}}$, а τ_{∞} – постоянная времени выхода переменной α на стационарный уровень.

Начальное условие для уравнения (2г): $\alpha(t_0) = 1$, где t_0 – начало переходного процесса, возникающего после пересечения порога a_j , т.е. t_0 – момент, когда нарушается условие $[\bar{a}_{\text{off}} \pi(N(t_0)) e^{-k_A A(t_0)}] > a_{\text{on}} a_j$.

Следовательно, $\alpha(t) = \exp((t_0 - t)/\tau_{\infty})$.

Таким образом, новая «константа» скорости распада CaTnC определяется как взвешенная сумма двух слагаемых. Здесь a_{off1} – динамический компонент «константы» a_{off} скорости распада CaTnC, а a_{off2} – его постоянный компонент. Динамический компонент совпадает с общей «константой» скорости распада CaTnC a_{off} , использованной в предыдущем определении кооперативности, описанном выше и реализованном в предыдущих версиях нашей модели.

Новое определение оставляет неизменным (по сравнению с прежним) влияние кооперативности на распад CaTnC до тех пор, пока «константа» скорости распада остается больше порога $a_{\text{on}} \cdot a_j$; в этих условиях их влияние целиком определяется динамическим компонентом a_{off1} .

Совсем иначе модифицированное определение проявляется при пересечении этого порога. В этом случае возникает переходной процесс. В начале этого процесса «константа» скорости распада может оказаться намного меньше порога $a_{\text{on}} \cdot a_j$, поскольку в первый его момент она также целиком определяется формулой (2а) и

в полной мере отражает влияние кооперативности первого и второго типа. Однако затем, в соответствии с формулой (2б) и уравнением (2г), начинается постепенный рост этой «константы» – вплоть до ее возврата на уровень $a_{\text{on}} \cdot a_j$. Промежуток времени, требующийся для полного возврата на этот уровень, зависит от постоянной времени этого переходного процесса τ_{∞} – параметра уравнения (2г).

Теперь область параметров кооперативности, на которых в модели воспроизводится S-образная форма кривой «Ca–сила» включает и базовые значения параметров s_c и k_A (см. рис. 1). Наклон этой кривой в диапазоне значений кальция вблизи Ca_{50} (фактически, коэффициент кооперативности Хилла) при базовых значениях параметров определяется только значением a_j и поэтому, в частности, не зависит от межфиламентарного расстояния, влияющего на вероятность прикрепления поперечных мостиков $n_1(l_1)$, а значит, не является и длиннзависимым.

На рис. 3 представлена связь «Ca–N» для концентрации N , нормированной на свое максимальное значение при насыщающей концентрации кальция, полученная в подмодели, состоящей из дифференциальных уравнений (1) и (2) после модификации при базовых значениях параметров s_c и k_A . С точностью до нормировки эта связь соответствует стационарной кривой «Ca–сила».

Иными словами, вклад динамического компонента a_{off1} в распад CaTnC возникает, когда этот компонент становится ниже границы, задаваемой постоянным компонентом, например, из-за увеличения числа поперечных мостиков N . После этого a_{off1} сначала доминирует в общей сумме a_{off} , но постепенно a_{off} возвращается к своему граничному значению a_{off2} . Точная скорость восстановления a_{off} зависит от константы времени τ_{∞} в уравнении (2г). Эта константа – параметр модели.

Модифицированные уравнения изменяют кооперативную зависимость CaTnC от N таким образом, что кооперативность проявляется по-разному в стационарном состоянии (когда $[Ca^{2+}]$, а следовательно, $[CaTnC]$ и N не меняются) и во время переходных процессов в ответ на изменение N . Таким образом, присоединение поперечных мостиков увеличивает сродство тропонина С к кальцию благодаря мгновенному конформационному воздействию этого присоединения на скорость распада CaTnC, но потом это воздействие ослабевает, и в стационарном состоянии константа сродства не может превышать некоторое максимальное значение AL (т.е. Affinity Limit, максимальное значение кон-

станты сродства в стационарном состоянии), определяемое параметром \bar{a}_{eq_limit} (уравнение (26)). Следовательно, значительные изменения сродства возникают только немедленно в ответ на изменение (увеличение/уменьшение) числа поперечных мостиков N и некоторое время после этого. В частности, после присоединения новых поперечных мостиков константа сродства может значительно превышать величину AL , но затем она постепенно снижается до значения AL . Следовательно, модифицированная кооперативность менее выражена в стационарном состоянии, чем сразу после изменения N и в начале переходного процесса, инициированного таким изменением.

Характеристики связи «pCa–сила» определяются в модели стационарными условиями кооперативности. А именно, при низкой $[Ca^{2+}]$ (и низкой N соответственно), когда сродство тропонина S к кальцию меньше, чем AL , стационарная кооперативность довольно чувствительна к разнице в концентрациях Xb , но не к высокой $[Ca^{2+}]$. Следовательно, чувствительность связи «pCa–сила» к кальцию (т.е. сдвиг кривой вдоль оси «pCa») зависит от числа поперечных мостиков N (и, следовательно, от величины удлинения мышцы через межфилламентное расстояние) намного больше, чем коэффициент Хилла (т.е. наклон этой кривой). Соответствующие численные данные представлены на рис. 4 и находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными о влиянии длины на связь «pCa–сила», полученными на скинированных трабекулах [3]. Кроме того, эти численные данные хорошо согласуются с экспериментами на искусственной подвижной системе с регулируемой тонкой нитью, в которых определялись связи «pCa–сила» для сердечного миозина. Было найдено, что коэффициенты кооперативности Хилла связей «pCa–сила», построенных для разных концентраций миозина, не различаются, в то время как кальциевая чувствительность этих кривых различна [38]. Влияние концентраций миозина в искусственной подвижной системе в данном случае можно рассматривать как молекулярный аналог длиннзависимости, поскольку удлинение интактного кардиомиоцита сближает актиновые и миозиновые нити и тем самым увеличивает вероятность образования поперечных мостиков, так же как это происходит в экспериментах *in vitro* при увеличении концентрации миозина на поверхности проточной камеры.

С другой стороны, та же кооперативность во время циклов сокращения–расслабления интактной сердечной мышцы проявляет себя в переходных процессах, инициированных каль-

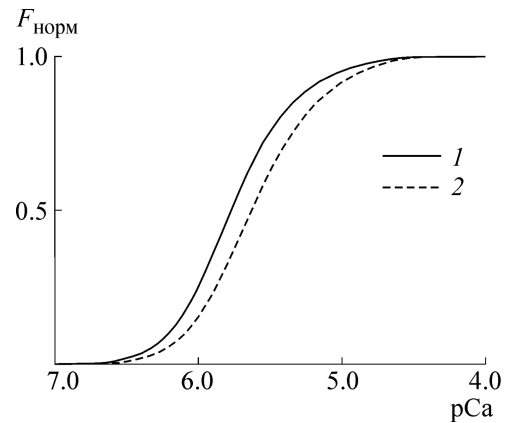


Рис. 4. Моделирование длиннзависимости связи «pCa–сила» в скинированной сердечной мышце. Представлены кривые для длины $L_1 = 2,2$ мкм/саркомер (кривая 1) и длины $L_2 = 2,0$ мкм/саркомер (кривая 2).

циевыми переходами. В результате кооперативность выражена довольно сильно во время фаз сокращения/расслабления циклов. Для достаточно больших величин константы времени τ_∞ модифицированная кооперативность проявляет себя в циклах сокращения–расслабления таким же образом, как ее немодифицированный вариант, лежащий в основе ряда механозависимых явлений, наблюдаемых в интактном миокарде и воспроизведенных в наших предыдущих работах [26,34–37].

Численные эксперименты наиболее важного явления грузозависимого расслабления показаны на рис. 5 и 6. Для $\tau_\infty = 1000$ с изображенные данные полностью совпадают с немодифицированным вариантом и, следовательно, правильно воспроизводят экспериментальные данные.

На рис. 6б используется общепринятый индекс грузозависимого расслабления, который определяется следующим образом: для каждой постнагрузки F/F_0 , где F_0 – пик изометрической силы, значение индекса грузозависимого расслабления – отношение между длительностью изотонической фазы сокращения–расслабления под этой постнагрузкой и временным интервалом в полном изометрическом цикле сокращения–расслабления, когда сила выше этой постнагрузки (рис. 6а).

Важно, что оба типа численных экспериментов – в циклах сокращения–расслабления и в стационарном состоянии – выполнены с параметрами, определяющими одну и ту же степень кооперативности.

Наконец, хотелось бы отметить, что имеется экспериментальное свидетельство, полученное

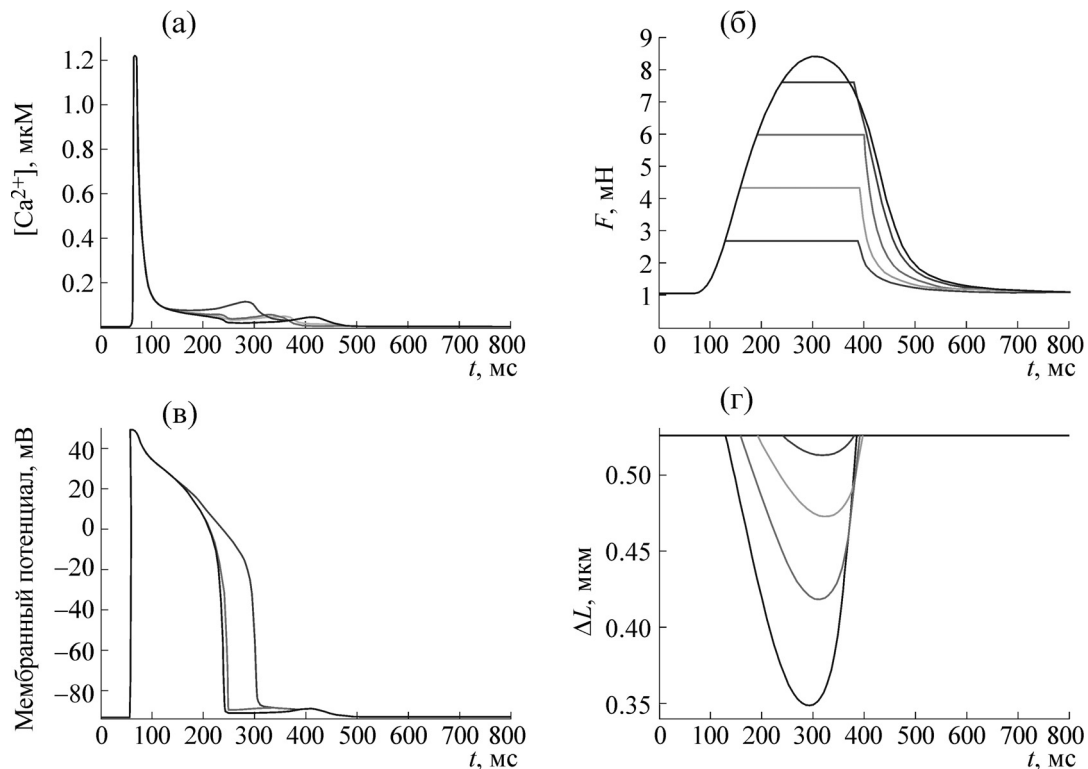


Рис. 5. Моделирование явления грузозависимого расслабления в интактной сердечной мышце. Представлены изометрический и шесть изотонических циклов (на поствазгрузках $F = 21$ мН, $F = 31$ мН, $F = 42$ мН, $F = 52$ мН, $F = 63$ мН и $F = 73$ мН). (а) – Временной ход изменения концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$); (б) – временной ход развития активной силы (F); (в) – мембранный потенциал; (г) – отклонение длины мышцы под разными поствазгрузками от длины провиса (ΔL).

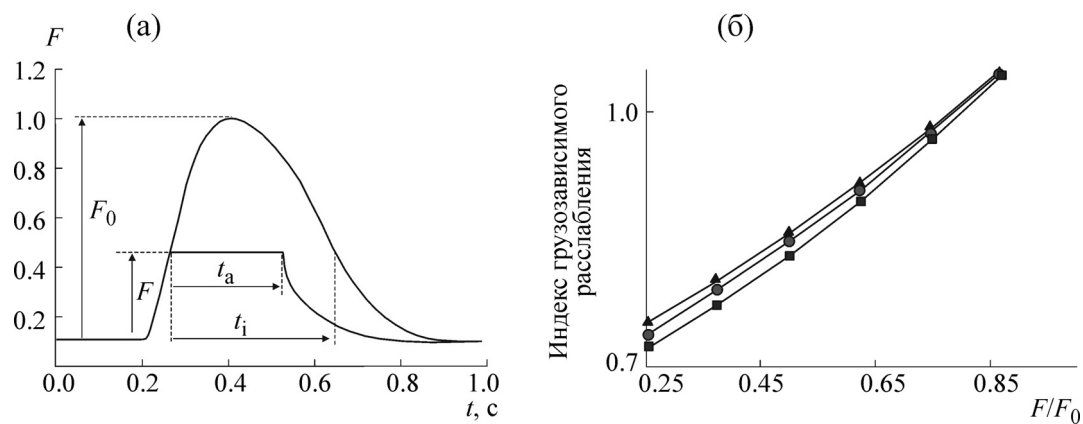


Рис. 6. (а) – Определение индекса грузозависимого расслабления (ГЗР). Для каждой поствазгрузки F/F_0 (где F_0 – пик изометрической силы) индекс ГЗР – отношение между длительностью изотонической фазы поствазгрузочного сокращения (t_a) и временным интервалом в полном изометрическом цикле, когда сила выше этой поствазгрузки (t_i). (б) – Индекс ГЗР, определенный для трех констант времени τ_∞ (сверху вниз: 60, 100 и 1000 с).

на скинированных мышечных препаратах, что помещение мышцы в раствор, содержащий кальций, может вызывать немонотонные переходные процессы изменения силы мышцы, пока она не достигает стационарного состояния для этой конкретной концентрации $[Ca^{2+}]$ [39]. Не-

монотонность возникает для температур раствора $22^\circ C$ и выше, но не возникает при более низких температурах, например при $5^\circ C$ [39] или при $15^\circ C$ [40].

Модифицированная концепция кооперативности позволила нам воспроизвести в модели

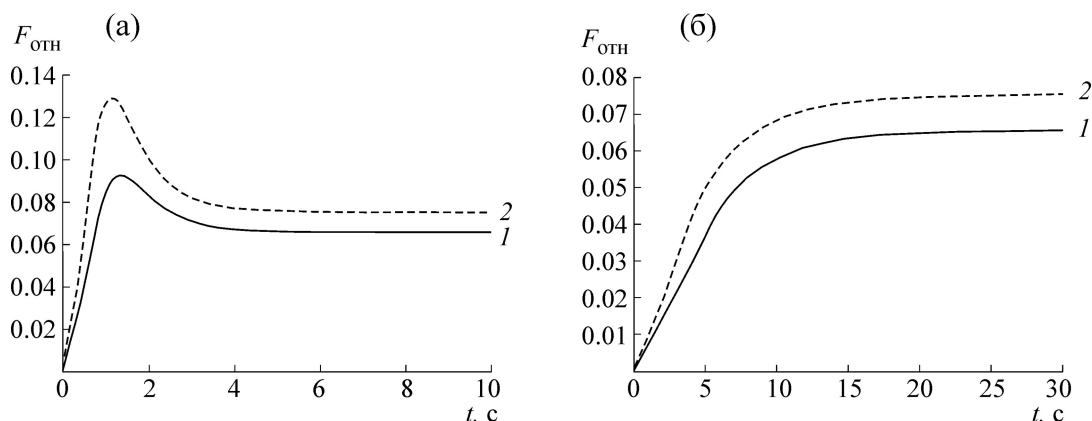


Рис. 7. Переходный процесс изменения силы (F), возникающий в модели во время ответа скинированной мышцы на добавление Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 0,39 \text{ мкМ}$ (кривая 1), $[\text{Ca}^{2+}] = 0,37 \text{ мкМ}$ (кривая 2)) в раствор, не содержащий кальция: (а) – для случая кинетических констант циклирования Xb: $k_- = 0,024 \text{ с}^{-1}$; $k_+ = 0,045 \text{ с}^{-1}$ ($k_+/k_- = 1,8$) – переходной процесс изменения силы немоноотонен; (б) – для случая десятикратного уменьшения кинетических констант циклирования Xb: $k_- = 0,024 \text{ с}^{-1}$; $k_+ = 0,045 \text{ с}^{-1}$ ($k_+/k_- = 1,8$) – возникает монотонный переходной процесс. Сила пронормирована на величину, соответствующую насыщающей концентрации $[\text{Ca}^{2+}]$ (см. рис. 1).

эти результаты: как немонотонный характер развития силы в скинированной мышце (рис. 7а), так и монотонный (рис. 7б). Более низкие температуры (рис. 7б) моделировались с помощью десятикратного уменьшения констант скорости (k_+ and k_-) кинетики поперечных мостиков.

Все результаты, имитирующие поведение скинированных препаратов, были воспроизведены сначала на подмодели, включающей только уравнения кинетики CaTnC с уравнениями модифицированной кооперативности и уравнение кинетики поперечных мостиков, а затем повторены в полной модели с уравнениями модифицированной кооперативности, включающей в себя не только описание кинетики CaTnC и поперечных мостиков, но и реологическую схему.

ВЫВОДЫ

В математической модели была проверена усовершенствованная концепция кооперативности Xb–CaTnC, в которой кооперативность проявляется различным образом в стационарном состоянии и в переходном процессе:

- она существенно влияет на чувствительность к кальцию связи «pCa–сила», но не влияет существенно на ее коэффициент Хилла;

- в то же время именно этот тип кооперативности в модели вносит вклад в механокальциевую обратную связь в интактной сердечной мышце.

Следовательно, усовершенствованная концепция снимает кажущиеся противоречия между значительным вкладом кооперативности в работу интактного миокарда и экспериментальными данными о связи «pCa–сила», полученными на скинированных мышечных препаратах.

Кроме того, усовершенствованное описание кооперативности позволило воспроизвести в модели эксперименты, демонстрирующие немонотонный характер переходного процесса изменения силы, который возникает в скинированных мышечных препаратах при достаточно высоких температурах [39]. По-видимому, это первая попытка объяснить (и смоделировать) переходные процессы такого рода.

Кроме обозначенных выше двух типов кооперативности, в модели учтен еще один: так называемая кооперативность «конец-в-конец» функциональных групп A_7TnTm (актин-тропоин-тропомиозин) вдоль тонкой нити [41]. Суть этого типа кооперативности такова: связывание кальция с молекулой тропоина С, расположенной в зоне одной регуляторной функциональной группы A_7TmTn на тонкой нити влияет через конформационное взаимодействие тропомиозина «конец-в-конец» на соседние функциональные группы, способствуя открытию мест прикрепления миозиновых головок на актине из этих групп. При этом влияние комплекса CaTnC на открытие этих мест в ближних к нему функциональных группах, разумеется, выше, чем в отдаленных, и ниже, чем в самой функциональной группе, в зоне которой произошло присоединение кальция. Иными слова-

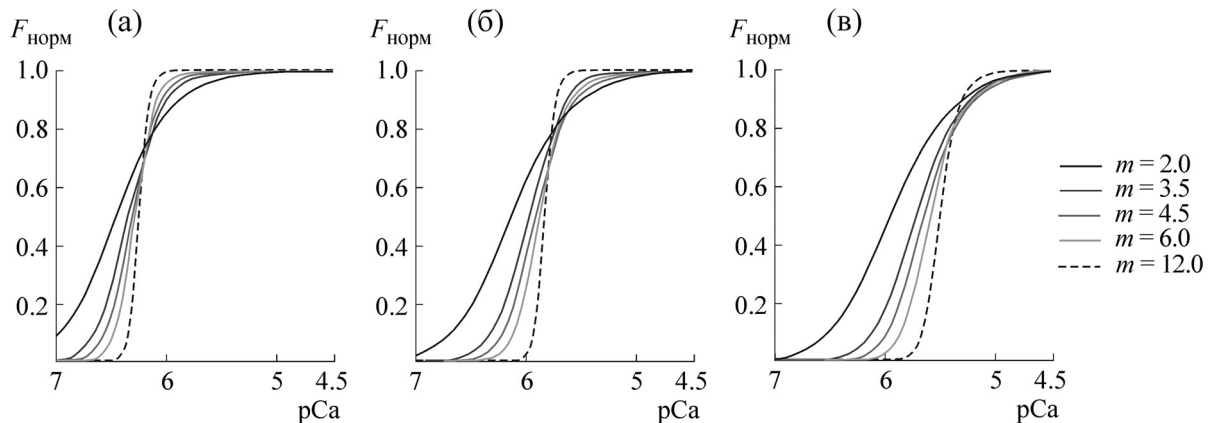


Рис. 8. Влияние кооперативности третьего типа на характеристики связи «pCa – сила» в усовершенствованной модели с кооперативностью. Кривые «pCa – сила» при трех различных значениях параметра k_m формулы (1), определяющей кооперативность третьего типа: (а) 0.2; (б) 0.4; (в) 0.6. На каждой из трех панелей слева направо располагаются кривые при разных значениях показателя степени m этой формулы: 2; 3.5; 4.5; 6 и 12 соответственно.

ми, концентрация N поперечных мостиков в модели пропорциональна не самой концентрации $A = [\text{CaTnC}]$, а величине $M(A)$, которая связана с A формулой (3).

Кооперативность третьего типа, в отличие от первых двух, осталась неизменной в модифицированной модели. Но ее роль в механокальциевом сопряжении ранее была не вполне ясна. В рамках обновленной модели, в которой модифицированная кооперативность первых двух типов не оказывает влияния на величину угла наклона сигмоиды «pCa–сила» (т.е. на изменение коэффициента Хилла связи «pCa–сила»), оказалось, что именно кооперативность третьего типа может существенно изменять этот наклон (рис. 8).

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума Уральского Отделения РАН № 15-5-4-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. G. Allen and S. Kurihara, *J. Physiol.* **327**, 79 (1982).
2. J. P. Konhilas, T. C. Irving, and P. P. De Tombe, *Circ. Res.* **90** (1), 59 (2002).
3. J. P. Konhilas, T. C. Irving, and P. P. De Tombe, *J. Physiol.* **544** (Pt 1), 225 (2002).
4. Z. Grabarek, J. Grabarek, P. C. Leavis, et al., *J. Biol. Chem.* **258** (23), 14098 (1983).
5. A. M. Gordon, M. Regnier, and E. Homsher, *News Physiol. Sci.* **16**, 49 (2001).
6. Y. Wang and W. G. Kerrick, *J. Appl. Physiol.* **92** (6), 2409 (2002).
7. C. W. Turtle, F. S. Korte, M. V. Razumova, et al., *Biophys. J.* **100** (3), 453a (2011).
8. R. E. Godt and D. W. Maughan, *Pflugers Arch.* **391** (4), 334 (1981).
9. K. S. McDonald and R. L. Moss, *Circ. Res.* **77** (1), 199 (1995).
10. F. Fuchs and Y. P. Wang, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28** (7), 1375 (1996).
11. S. H. Smith and F. Fuchs, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34** (5), 547 (2002).
12. F. Fuchs and D. A. Martyn, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26** (4–5), 199 (2005).
13. R. L. Moss, M. Razumova, and D. P. Fitzsimons, *Circ. Res.* **94** (10), 1290 (2004).
14. M. J. Lab, *Circ. Res.* **50** (6), 757 (1982).
15. M. J. Lab, D. G. Allen, and C. H. Orchard, *Circ. Res.* **55** (6), 825 (1984).
16. C. F. Vahl, T. Timek, A. Bonz, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30** (5), 957 (1998).
17. T. Ishikawa, H. Kajiwara, and S. Kurihara, *Am. J. Physiol.* **276** (1 Pt 2), H289 (1999).
18. Y. Wakayama, M. Miura, Y. Sugai, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (5), H2133 (2001).
19. R. R. Lamberts, M. H. Van Rijen, P. Sipkema, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283** (4), H1515 (2002).
20. C. Luers, F. Fialka, A. Elgner, et al., *Cardiovasc. Res.* **68** (3), 454 (2005).
21. M. M. Monasky, K. D. Varian, J. P. Davis, et al., *Pflugers Arch.* **456** (2), 267 (2008).
22. H. E. Ter Keurs, *Pflugers Arch.* **462** (1), 165 (2011).
23. C. Ruwhof, J. T. Van Wamel, L. A. Noordzij, et al., *Cell Calcium* **29** (2), 73 (2001).
24. S. Yasuda, S. Sugiura, H. Yamashita, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285** (2), H470 (2003).
25. O. Solovyova, L. B. Katsnelson, P. Kononov, et al., *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **364** (1843), 1367 (2006).
26. T. Sulman, L. B. Katsnelson, O. Solovyova, et al., *Bull. Math. Biol.* **70** (3), 910 (2008).

27. D. P. Dobesh, J. P. Konhilas, and P. P. De Tombe, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282** (3), H1055 (2002).
28. P. P. De Tombe, *J. Biomech.* **36** (5), 721 (2003).
29. M. Regnier, H. Martin, R. J. Barsotti, et al., *Biophys. J.* **87** (3), 1815 (2004).
30. R. J. Solaro, *J. Physiol.* **587** (1), 3 (2009).
31. Y. B. Sun and M. Irving, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48** (5), 859 (2010).
32. M. V. Razumova, A. E. Bukatina, K. B. Campbell, *Biophys. J.* **78** (6), 3120 (2000).
33. O. Solovyova, L. Katsnelson, S. Guriev, et al., *Chaos, Solitons & Fractals* **13** (8), 1685 (2002).
34. V. Izakov, L. B. Katsnelson, F. A. Blyakhman, et al., *Circ. Res.* **69** (5), 1171 (1991).
35. L. B. Katsnelson and V. S. Markhasin, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28** (3), 475 (1996).
36. L. B. Katsnelson, L. V. Nikitina, D. Chemla, et al., *J. Theor. Biol.* **230** (3), 385 (2004).
37. L. B. Katsnelson, O. Solovyova, A. Balakin, et al., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **107** (1), 81 (2011).
38. L. V. Nikitina, G. V. Kopylova, D. V. Shchepkin, et al., *Biochemistry (Moscow)* **73** (2), 178 (2008).
39. D. G. Stephenson and D. A. Williams, *J. Physiol.* **317**, 281 (1981).
40. Y. Saeki, T. Kobayashi, S. Yasuda, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36** (3), 371 (2004).
41. L. S. Tobacman, in *Tropomyosin*, Ed. by P. Gunning (Springer, 2008), p. 85.

Cooperativity in Mechano-Calcium Feedbacks in Myocardium. Some Conceptual Discrepancies and Overcoming Inconsistency within the Framework of a Mathematical Model

A.D. Dokuchaev*, **E.V. Shikhaleva***, **T.B. Sulman***, **N.A. Vikulova* ****,
L.V. Nikitina*, and **L.B. Katsnelson* ****

**Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomaiskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

***Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,
ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia*

Mechano-calcium feedbacks that provide a fine tuning of electrical and calcium activation of the heart muscle to mechanical conditions of contractions are an important element of the electro-mechanical coupling as a key mechanism of autoregulation of the myocardium contractile activity. A lot of experimental and theoretical evidences testify to the cooperative dependence of the calcium-troponin kinetics on the cross-bridge concentration as a principal mechanism underlying the mechano-calcium feedback in the intact myocardium. At the same time, experiments performed using skinned myocardial preparations demonstrated that mechanical conditions significantly affected only calcium sensitivity of the relationship Ca^{2+} -force rather than its Hill's coefficient of cooperativity. These data impel some investigators to doubt contribution of the cooperativity to the mechano-calcium feedbacks. To overcome the arising discrepancies we suggest a follow-on conception of cooperativity revealing the extent of intensity differently in steady state and transitional processes. A suggested conception enables us to reproduce and explain within the framework of a mathematical model both the mechanodependence of calcium activation in the intact myocardium and the results obtained with skinned muscle.

Key words: myocardium, calcium activation, mechano-calcium feedbacks, cooperativity