

ДЕФИЦИТ ДЛИНОЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ СОКРАЩЕНИЯ В МИОКАРДЕ КРЫС С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ: ОЦЕНКА НА УРОВНЕ МЫШЕЧНОЙ ПОЛОСКИ И ОДИНОЧНОЙ КЛЕТКИ

© 2018 г. О.Н. Лукин* **, Ю.Л. Проценко*

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

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

E-mail: o.lookin@iip.uran.ru

Поступила в редакцию 13.03.18 г.

В рамках одного исследования проведено сравнение степени выраженности длинозависимой активации сокращения в миокарде правого желудочка здоровых крыс и крыс с легочно-сердечной недостаточностью, вызванной действием монокроталина, на двух уровнях организации сердечной ткани: мышечной полоске и изолированном кардиомиоците. Установлено, что дефицит длинозависимого прироста силы сокращения в недостаточном миокарде количественно близок на обоих уровнях организации миокардиальной ткани. Это свидетельствует о том, что подавление механизмов длинозависимой регуляции сократимости миокарда при легочно-сердечной недостаточности происходит в первую очередь на уровне сердечной клетки. На уровне мышечной полоски дефицит связи «длина–сила» оказывается более явным, вероятно, за счет влияния пространственной организации миоцитов на интегральный сократительный ответ мышцы.

Ключевые слова: мышца, кардиомиоцит, связь «длина–сила», недостаточность, монокроталин.

При адаптации насосной функции сердца к нагрузкам ведущую роль выполняют механизмы регуляции сократимости миокарда, зависящие от текущей длины саркомеров кардиомиоцитов [1–3]. Основным проявлением длинозависимых механизмов регуляции силы сокращения миокарда является феномен Франка–Старлинга, согласно которому максимальное давление в сердечной камере пропорционально ее конечно-диастолическому объему (для мышечных полосок этот феномен описывается связью «длина–сила»). В недостаточном миокарде показан выраженный дефицит роста сократимости миокарда при изменении длины саркомеров [4–6], причем некоторые авторы фиксируют практически полное исчезновение этого феномена, например, у человека с терминальной стадией недостаточности левого желудочка [7]. Согласно другим работам, механизм Франка–Старлинга не исчезает полностью в сердце человека с легочно-сердечной недостаточностью, в кардиомиоцитах собаки и крысы [8–10]. Наконец, имеются данные о сохранении нормальной контрактильной функции кардиомиоцитов правого

желудочка собаки при развитии выраженной недостаточности функции целого желудочка [11].

Достаточно разнообразные данные о степени выраженности феномена Франка–Старлинга в недостаточном миокарде могут объясняться различиями в выборе уровня объекта исследования, а также в применяемой модели развития патологии. Существуют различные экспериментальные модели развития легочно-сердечной недостаточности у крыс, включая перевязку легочной артерии, применение линий животных с почечной дисфункцией, применение веществ, нарушающих нормальную работу ренин-ангиотензин-альдостероновой системы с последующей экспрессией эндотелина и ангиотензина. В нашей работе мы использовали экспериментальную модель неинвазивного типа, в которой после однократного применения алкалоида монокроталина (МКТ) инициировалось сужение легочного ствола с последующим развитием концентрической гипертрофии правого желудочка и легочно-сердечной недостаточности.

Количественные данные о дефиците длинозависимого прироста силы сокращения получены либо для многоклеточных объектов, либо для изолированных кардиомиоцитов, но отсут-

Сокращения: МКТ – монокроталин, L_{\max} – длина мышцы, при которой развивается максимальная сила сокращения.

ствуют работы, в которых такая оценка была бы проведена одновременно на уровне клетки и на уровне ткани. Мы количественно оценили степень длинозависимой активации сокращения мышечных полосок и изолированных кардиомиоцитов у крыс с легочно-сердечной недостаточностью и сравнили полученные оценки с соответствующими данными для крыс с нормальной функцией миокарда правого желудочка. Такой подход к изучению особенностей развития сократительной дисфункции миокарда является принципиально важным, поскольку позволяет определить не только степень нарушения сократительного статуса индивидуальных сердечных клеток, но и сопоставить выраженность этого нарушения с дефицитом сократительного ответа многоклеточного образца сердечной ткани. Учитывая сложную геометрию сердца и пространственно-временную неоднородность характеристик отдельных его слоев, можно было ожидать, что дефицит сократительной функции на уровне клеток не будет полностью совпадать с дефицитом функции целого органа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все манипуляции с подопытными животными соответствовали международным правилам обращения с лабораторными животными и были одобрены комиссией Института иммунологии и физиологии УрО РАН по контролю за лабораторными животными. В экспериментах использованы молодые самцы и самки крыс линии Вистар со здоровым миокардом и с экспериментально вызванной легочно-сердечной недостаточностью при действии пирролизидинового алкалоида монокроталина [12,13]. Крысы в возрасте четырех недель (масса 80–100 г) были случайным образом распределены в контрольную группу и МКТ-группу. Животные каждой группы были подвергнуты однократной внутривенной инъекции физиологического раствора объемом 2 мл, без добавления или при добавлении монокроталина из расчета 50 мг на кг массы животного. Крыс МКТ-группы подвергали эвтаназии при появлении клинических признаков сердечной недостаточности (потеря веса, одышка в покое) на седьмой–восьмой неделе жизни. В том же возрасте подвергали эвтаназии и крыс контрольной группы. За 15–20 мин до эвтаназии животным внутримышечно вводили миорелаксант (рометар, 1 мл/кг), анестетик (золетил, 0,02 мл/кг) и гепарин (1000 Ед/кг). Для оценки степени дефицита феномена длинозависимой активации сократимости при сердечной недостаточности

у крыс на мышечном и клеточном уровнях животных разделяли на следующие подгруппы: контрольные группы ($n = 15$ для уровня мышцы и $n = 7$ для уровня одиночной клетки соответственно), МКТ-группы ($n = 23$ и $n = 9$).

Мышечный уровень. После эвтаназии животного извлекали сердце и помещали его в препаративную ванну с раствором Кребса–Хенселейта (в мМ): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO₄ – 1,2, NaHCO₃ – 14,5, KH₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, глюкоза – 11,1, pH 7,35, с добавлением 30 мМ 2,3-бутандион монооксида. Из правого желудочка сердца иссекали тонкую трабекулу и помещали ее в экспериментальную ванну с проточным раствором Кребса–Хенселейта без 2,3-бутандион монооксида при постоянном насыщении смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Один конец трабекулы фиксировали на штоке датчика силы, другой конец – на штоке сервомотора длины. Биомеханические измерения в мышечном препарате выполняли с помощью системы для исследования мышечной активности (Muscle Research System, Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия) в псевдореальном масштабе времени (с интервалом 100 мкс) с помощью АЦП/ЦАП PCI-1716S (Ad-Link Technology Inc., Тайвань) и программного обеспечения, функционирующего в подсистеме реального времени HyperKernel (Arc Systems Ltd., Япония), интегрированной в ОС Windows XP. Измерения были выполнены при частоте электрической стимуляции 1 Гц и температуре физиологического раствора 25°C.

Для задания одного и того же относительного удлинения (преднагрузки) в различных трабекулах с исходно разной длиной у каждой трабекулы определяли длину, при которой она развивала максимальную амплитуду изометрической силы, эту длину определяли как L_{max} и в дальнейшем преднагрузку задавали в процентах от этой длины. При каждой преднагрузке регистрировали изометрическое сокращение трабекулы в стационарных условиях. Изометрическое напряжение мышцы определяли как отношение величины силы мышцы к площади ее поперечного сечения, которую определяли по формуле $S = \pi d^2/12$, где d – диаметр мышцы в нерастянутом состоянии.

Клеточный уровень. После эвтаназии животного извлекали интактное сердце и помещали его в предварительно охлажденный до 10°C модифицированный раствор Кребса–Хенселейта для препарирования целого сердца (табл. 1). Затем фиксировали аорту сердца на канюле диаметром 1 мм и подключали канюлю к системе перфузии целого сердца (Radnoti, AD Instruments, Австралия) аэрируемым и нагре-

Таблица 1. Композиции растворов, использующихся в протоколе получения изолированных кардиомиоцитов желудочков сердца крысы

Предназначение раствора	Для приготовления целого сердца	Для перфузии целого сердца (этап 1)	Для перфузии целого сердца (этап 2)	Для перфузии целого сердца (этап 3)	Для работы с изолированными кардиомиоцитами (этап 4)
Компонент	Модифицированный раствор Кребса–Хенселейта (pH 7,4, при аэрации 95% O ₂ + 5% CO ₂ , титрование NaOH)				Раствор Тироде (pH 7,3, титр. NaOH)
Рабочая температура, °С	~5–10	37	37	37	25
NaCl, mM	118	118	118	118	118
KCl, mM	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
MgSO ₄ , mM	1,2	1,2	1,2	1,2	1
KH ₂ PO ₄ , mM	1,2	1,2	1,2	1,2	–
NaHCO ₃ , mM	25,0	25,0	25,0	25,0	–
HEPES, mM	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Глюкоза, mM	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1
CaCl ₂ дигидрат, mM	1,25	1,25	0,025	0,025	1,25
Гепарин натрия, МЕ/мл	20	–	–	–	–
Коллагеназа, мг/мл	–	–	–	1	–
Альбумин, мг/мл	–	–	–	–	1

Примечание. Все реагенты производства компании Sigma-Aldrich (США), за исключением коллагеназы (Collagenase Type 2, Worthington Biochemical Corporation, США).

тым до 37°C раствором с физиологической концентрацией кальция (табл. 1, этап 1). Спустя 15–20 мин включали перфузию номинально бескальциевым раствором (табл. 1, этап 2) и перфузировали сердце еще в течение 20 мин для полного подавления сократительной активности. Затем раствор заменяли на номинально бескальциевый раствор с добавлением коллагеназы (табл. 1, этап 3) и перфузировали сердце в течение 15–20 мин. После этого отрезали желудочки сердца и переносили в номинально бескальциевый раствор без добавления коллагеназы; в этом растворе желудочки аккуратно измельчали до образования суспензии. Отфильтрованную суспензию кардиомиоцитов осаждали в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли раствор Тироде (табл. 1, этап 4) с последовательным увеличением концентрации кальция до 100 мкМ, 250 мкМ, 400 мкМ и 1,25 мМ (конечное содержание кальция). Для исследования выбирали кардиомиоциты с неповрежденной мембраной, четкой поперечной исчерченностью, отсутствием спонтанных сокращений и устойчивым откликом на внешнюю электрическую стимуляцию.

Для регистрации механической активности изолированного кардиомиоцита, а также для задания контролируемой степени растяжения

кардиомиоцита использована методика карбоновых волокон [14,15]. В этой методике кардиомиоцит механически фиксировали к карбоновым волокнам, имеющим высокую адгезию к его поверхности. Были использованы карбоновые волокна толщиной 7 мкм (Tsukuba Materials Information Laboratory Ltd., Япония), клеенные в специальные стеклянные держатели сложной формы, изготовленные нами самостоятельно с помощью пуллеров (model 730, David Kopf Instruments, США или МЭ-4, СССР). Два зеркально симметричных держателя с карбоновыми волокнами монтировали на независимых прецизионных микроманипуляторах с использованием системы управления микропозиционирующими устройствами MP285 (Sutter Instrument, США).

Перед фиксацией кардиомиоцита к карбоновым волокнам на дно экспериментальной камеры с раствором помещали тонкое покровное стекло с нанесенным слоем polyHEMA для предотвращения прилипания кардиомиоцитов к дну камеры. Пару карбоновых волокон аккуратно прижимали к краям кардиомиоцита, после чего кардиомиоцит немного приподнимали над поверхностью дна камеры. Укорочение кардиомиоцита регистрировали непосредственно по величине изгиба карбоновых волокон, а развиваемую силу определяли исходя из вели-

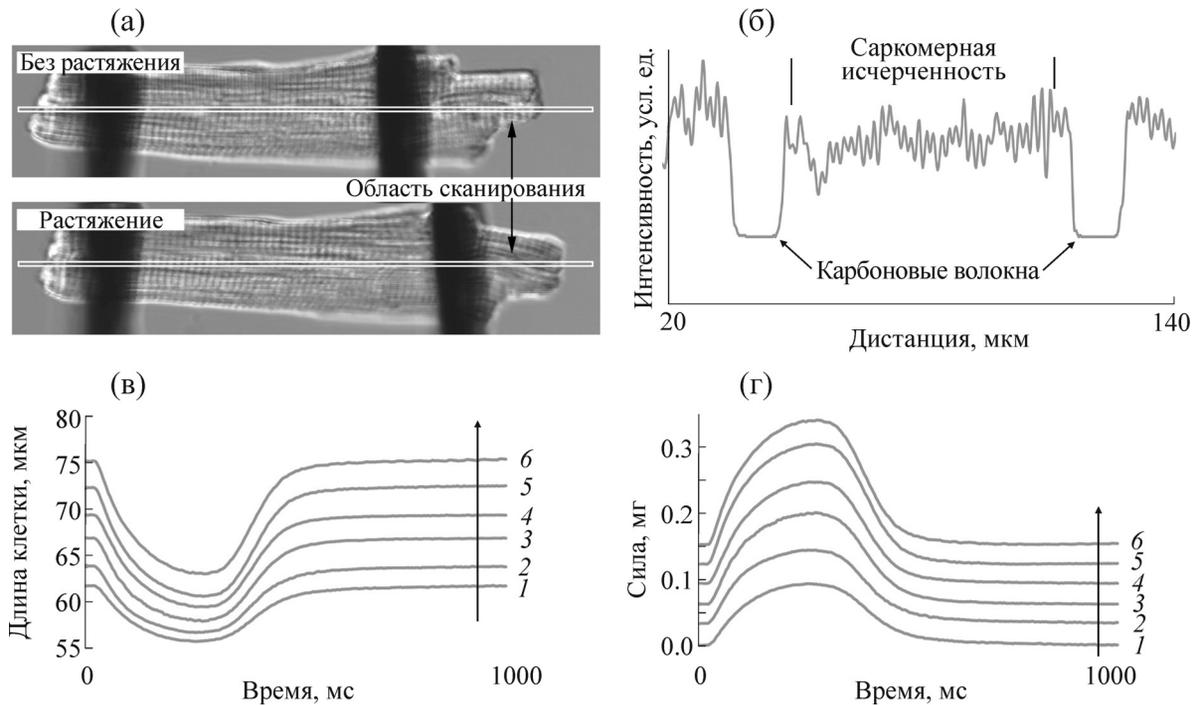


Рис. 1. Пояснение к методу карбоновых волокон при регистрации аусотонических сокращений изолированного кардиомиоцита. (а) – Изолированный кардиомиоцит, к концам которого прикреплены карбоновые волокна, в нерастянутом и растянутом состояниях; стрелками указана область сканирования. (б) – Профиль интенсивности изображения в области сканирования; стрелки указывают на провалы яркости, соответствующие положению карбоновых волокон, периодичное изменение яркости между этими провалами соответствует саркомерной исчерченности. (в) – Серия аусотонических укорочений кардиомиоцита при задании различной степени его растяжения. (г) – Серия аусотонических сил, вычисленных по траекториям укорочений и среднему значению изгибной жесткости для пары карбоновых волокон. Стрелки на панелях (в) и (г) указывают направление сдвига сигнала при растяжении кардиомиоцита, числа соответствуют степени растяжения (1 – без растяжения, 2–5 – последовательное увеличение степени растяжения, 6 – максимальное растяжение).

чины изгиба и заранее определенной жесткости волокон. Для определения коэффициента изгибной жесткости карбоновых волокон использовали прецизионный датчик силы с диапазоном чувствительности 0–5 мН и разрешающей способностью 0,2 мкН (модель KG-7, Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия), в кончик которого упирались карбоновым волокном. Для определения силы сокращения кардиомиоцита использовали среднее значение величин коэффициентов изгибной жесткости в данной паре карбоновых волокон.

Измерение механической активности периодически стимулируемого изолированного кардиомиоцита проводили с помощью системы лазерной конфокальной сканирующей микроскопии LSM 710 и программного обеспечения Zen 2010 (Carl Zeiss, Германия). Для этого сначала регистрировали один кадр изображения, включающего кардиомиоцит целиком, затем выделяли узкую (высотой 2 пикселя) горизонтально-ориентированную область вдоль длинной оси в центре кардиомиоцита так, чтобы в нее входили положения обоих карбоновых во-

локон даже при большой степени его растяжения (рис. 1а). Затем включали режим непрерывного сканирования выделенной области для получения профиля интенсивности изображения. Карбоновые волокна имели минимальную яркость, поэтому на горизонтальном профиле интенсивности изображения они определялись как провалы интенсивности (рис. 1б). Размеры области сканирования и скорость сканирования задавали так, чтобы обеспечить частоту регистрации не менее 300 кадров/с. Длину невозбужденного миоцита в нерастянутом состоянии (EDL_0) определяли как длину между карбоновыми волокнами без задания растяжения. Изменение степени растяжения кардиомиоцита производили путем смещения положения одного из двух карбоновых волокон с помощью микроманипулятора. При каждой степени растяжения регистрировали 10–15 сокращений кардиомиоцита; в рамках каждого протокола растяжения задавали 4–7 последовательных растяжений, что позволяло получать серию аусотонических укорочений кардиомиоцита при разной степени его растяжения

Таблица 2. Морфометрические показатели (животного, сердца, мышечного препарата, изолированного кардиомиоцита) и показатели сократимости нерастянутого мышечного препарата миокарда правого желудочка здоровых крыс и крыс после действия монокроталина

Морфометрические показатели	Контрольная группа ($n = 15$)	МКТ-группа ($n = 23$)
Возраст на момент эвтаназии, недели	$7,7 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,1$
Вес на момент эвтаназии, г	215 ± 13	$175 \pm 7^*$
Вес целого сердца, г	$0,69 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,02^*$
Вес левого желудочка, г	$0,35 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,01$
Вес правого желудочка, г	$0,16 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01^*$
Длина большой берцовой кости, мм	$31,3 \pm 0,8$	$31,2 \pm 0,3$
Средний диаметр трабекулы, мкм	258 ± 22	316 ± 23
Средняя длина кардиомиоцита, мкм	$112,7 \pm 1,3$	$107,2 \pm 0,9^*$
Средний поперечный размер (ширина) кардиомиоцита, мкм	$23,3 \pm 0,3$	$24,6 \pm 0,3^*$
Показатели сократимости трабекулы	Контрольная группа ($n = 13$)	МКТ-группа ($n = 15$)
Амплитуда изометрического напряжения, мН/мм ²	$8,2 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0,4^*$
Время достижения пика напряжения, мс	$116,0 \pm 2,0$	$141,0 \pm 2,8^*$
Время расслабления от пика напряжения до 50% амплитуды, мс	$66,7 \pm 2,2$	$87,4 \pm 3,6^*$

Примечание. * – Различие между контрольной группой и МКТ-группой достоверно, применялся двухсторонний t -критерий для неравных выборок ($P < 0,05$).

(рис. 1в), в диапазоне 100–130% EDL_0 . Измерение механической активности изолированных кардиомиоцитов проводили при частоте электрической стимуляции 1 Гц и температуре раствора 25°C.

Для обработки и анализа полученных протоколов растяжения было разработано собственное программное обеспечение (EqarAll6). С его помощью определяли сократительную активность кардиомиоцита, где ауксотоническое укорочение пересчитывали в ауксотоническую силу с учетом коэффициента изгибной жесткости карбонового волокна (рис. 1г). Для пересчета измеряемой силы сокращения в механическое напряжение определяли площадь поперечного сечения кардиомиоцита (в предположении его эллиптического сечения) по формуле $\pi d^2/12$, где d – широкая сторона кардиомиоцита. Такой подход позволил количественно сопоставлять измерения, выполненные для индивидуальных кардиомиоцитов. Для определения средней длины саркомера в кардиомиоците, подвергнутом последовательному растяжению, был использован метод дискретного преобразования Фурье-сигнала в части профиля интенсивности, располагающейся между положениями карбоновых волокон (рис. 1б).

Статистические методы. Для оценки значимости различий между средними величинами морфометрических показателей и показателей

сократимости, а также величинами механического напряжения, полученными для контрольной и МКТ-группы животных при одной и той же относительной длине мышцы или одной и той же диастолической длине саркомера кардиомиоцита, применяли двухсторонний t -критерий для неравных выборок. Эффекты считались значимыми при $P < 0,05$. Данные приведены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Развитие легочно-сердечной недостаточности у крыс при действии монокроталина. В табл. 2 приведены морфометрические показатели целого сердца и показатели сократимости нерастянутого мышечного препарата миокарда правого желудочка здоровых крыс и крыс после действия монокроталина. У крыс после однократного применения монокроталина спустя три–четыре недели наблюдалась потеря веса тела на ~20% (с 215 ± 13 до 175 ± 7 г, различия достоверны при $P < 0,05$) и двукратный прирост массы правого желудочка (с $0,16 \pm 0,01$ до $0,33 \pm 0,01$ г, различия достоверны при $P < 0,05$). Независимый от развития патологии сердца индекс «длина большой берцовой кости» не имел различий между данными группами. Выявлено также достоверное уменьшение длины

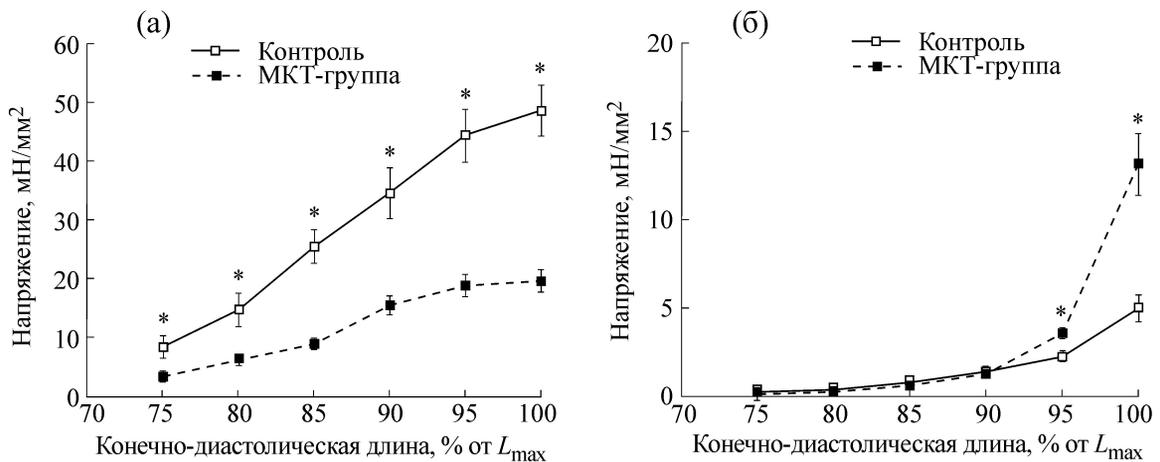


Рис. 2. Усредненные зависимости «изометрическое напряжение – конечно-диастолическая длина» для активной (а) и пассивной (б) компоненты напряжения, полученные в многоклеточных препаратах миокарда правого желудочка здоровых крыс ($n = 13$) и крыс с индуцированной монокроталином легочно-сердечной недостаточностью ($n = 15$). Относительная длина приведена в процентах от L_{max} . Величины напряжения приведены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * – Различия между контрольной группой и МКТ-группой при данной относительной длине мышцы достоверны ($P < 0,05$).

и увеличение поперечного размера (ширины) изолированных кардиомиоцитов у животных МКТ-группы. На уровне изолированного мышечного препарата правого желудочка сердца при анализе его сократимости в нерастянутом состоянии показано сильное падение амплитуды и общее замедление развития сократительного ответа у крыс МКТ-группы. Например, амплитуда изометрического напряжения уменьшалась более чем вдвое с $8,2 \pm 1,2$ до $3,3 \pm 0,4$ мН/мм² ($P < 0,05$), время достижения максимума активного напряжения и время расслабления до половины амплитуды достоверно увеличивалось. Таким образом, морфометрические показатели целого сердца и показатели сократимости изолированных мышечных препаратов подтверждают развитие выраженной гипертрофии миокарда правого желудочка и последующей легочно-сердечной недостаточности у крыс при однократном воздействии монокроталина.

Оценка длинозависимой активации сократимости на уровне мышечной ткани. Ранее мы показали, что в миокарде крыс с индуцированной монокроталином легочно-сердечной недостаточностью имеется существенный дефицит длинозависимого прироста амплитуды изометрического напряжения [16,17]; эти результаты были получены при частоте стимуляции 0,33 Гц. В данной работе на уровне мышечной ткани обнаружено, что при более высокой частоте стимуляции (1 Гц) этот дефицит также сильно выражен в миокарде крыс МКТ-группы и проявляется при любой степени растяжения мышцы в диапазоне от 75 до 100% L_{max} (рис. 2а).

В среднем для этого диапазона относительных длин, трабекулы правого желудочка крыс МКТ-группы развивали $40,5 \pm 1,5\%$ от максимального изометрического напряжения у трабекул контрольных животных ($P < 0,05$). Отметим, что из-за нелинейного характера связи «изометрическая сила–длина» для многоклеточного препарата мы не определяли линейного коэффициента наклона этой связи для каждой индивидуальной зависимости. Таким образом, значительный дефицит длинозависимого прироста силы сокращения сердечной мышцы при формировании легочно-сердечной недостаточности отчетливо продемонстрирован при частотах стимуляции, более близких к физиологическим значениям. Кроме того, наши данные показывают, что в физиологическом диапазоне длин мышечных препаратов ($> 90\% L_{max}$) в миокарде с легочно-сердечной недостаточностью диастолическая (пассивная) жесткость достоверно выше в сравнении с нормальным миокардом (рис. 2б). Например, при длине L_{max} диастолическое напряжение составило $13,1 \pm 1,7$ мН/мм² в препаратах МКТ-группы против $4,9 \pm 0,7$ мН/мм² в препаратах нормального миокарда (т.е. более чем в 2,5 раза, различия достоверны при $P < 0,05$).

Оценка длинозависимой активации сократимости на уровне изолированного кардиомиоцита. На уровне изолированного кардиомиоцита длинозависимую активацию сокращения оценивали по связи между степенью диастолического растяжения саркомера и амплитудой активного напряжения, развиваемого кардиомиоцитом в

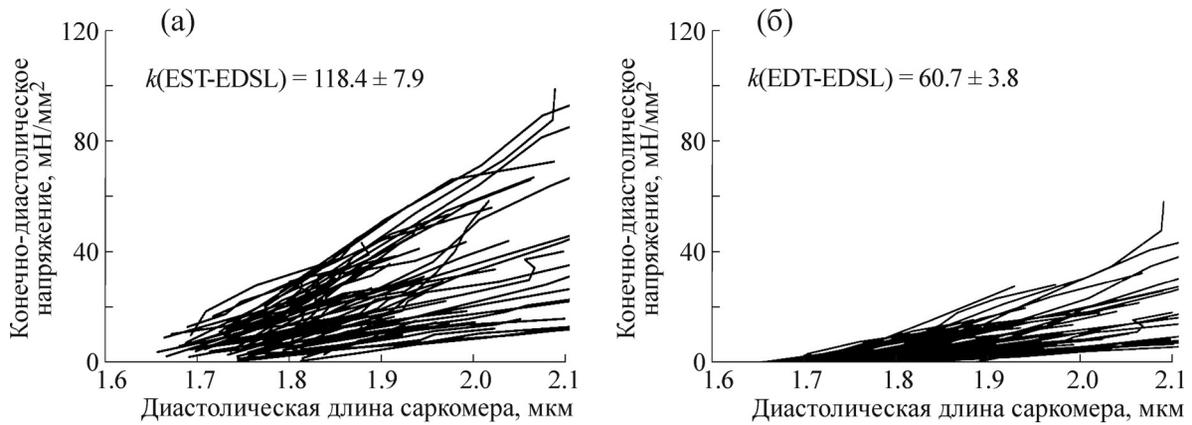


Рис. 3. Индивидуальные зависимости «диастолическая длина саркомера – конечно-систолическое напряжение» (а) и «диастолическая длина саркомера – конечно-диастолическое напряжение» (б), полученные для изолированных кардиомиоцитов правого желудочка здоровых крыс ($n = 70$ клеток для $N = 7$ животных). На диаграммах указаны средние величины коэффициентов углов наклона зависимостей \pm стандартная ошибка среднего.

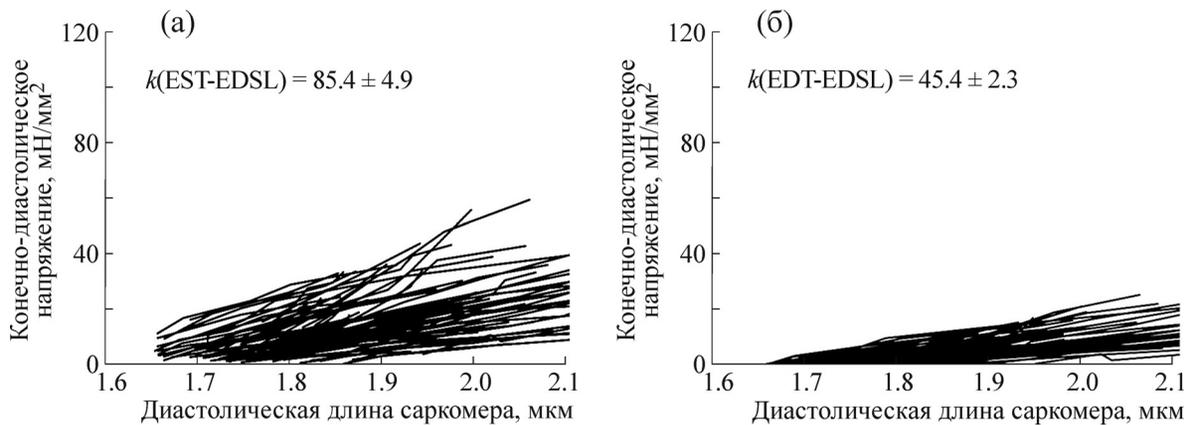


Рис. 4. Индивидуальные зависимости «диастолическая длина саркомера – конечно-систолическое напряжение» (а) и «диастолическая длина саркомера – конечно-диастолическое напряжение» (б), полученные для изолированных кардиомиоцитов правого желудочка крыс с индуцированной монокроталином легочно-сердечной недостаточностью ($n = 84$ клетки для $N = 9$ животных). На диаграммах указаны средние величины коэффициентов углов наклона зависимостей \pm стандартная ошибка среднего.

конечно-систолическую фазу сокращения. При использовании метода карбоновых волокон (см. раздел «Методы исследования») мы могли задавать растяжение кардиомиоцита в таком диапазоне, что это соответствовало диастолическим длинам саркомера в диапазоне от $\sim 1,7$ до $\sim 2,1$ мкм. На данном диапазоне длин саркомеров зависимости «диастолическая длина саркомера – конечно-систолическое напряжение» и «диастолическая длина саркомера – конечно-диастолическое напряжение» имели линейный характер, поэтому мы могли определять и сравнивать между группами животных линейные коэффициенты наклона этих связей.

На рис. 3а и 4а показаны индивидуальные кривые «конечно-систолическое напряжение – диастолическая длина саркомера», полученные

для пула кардиомиоцитов крыс контрольной группы ($n = 70$ клеток для $N = 7$ животных) и МКТ-группы ($n = 84$ клетки для $N = 9$ животных). Для каждой индивидуальной кривой был определен коэффициент угла наклона при аппроксимации линейной функцией. Средние величины этих коэффициентов составили $118,4 \pm 7,9$ и $85,4 \pm 4,9$ (мН/мм²)/мкм для контрольной и МКТ-групп соответственно (различия достоверны при $P < 0,05$). Таким образом, выявлен значительный дефицит длинозависимого пророста силы сокращения у кардиомиоцитов крыс МКТ-группы.

Аналогично были построены и проанализированы зависимости «конечно-диастолическое напряжение – диастолическая длина саркомера» для пулов кардиомиоцитов крыс кон-

трольной и МКТ-групп (рис. 3б и 4б). На уровне изолированных кардиомиоцитов в диапазоне диастолических длин саркомера от 1,7 до 2,1 мкм было обнаружено уменьшение наклона связи «диастолическое напряжение – длина саркомера» у крыс МКТ-группы. Так, средние величины угла наклона зависимости «диастолическое напряжение – длина саркомера» составили $60,7 \pm 3,8$ и $45,4 \pm 2,3$ (мН/мм²)/мкм для пула клеток здоровых крыс и крыс с легочно-сердечной недостаточностью (различия достоверны при $P < 0,05$). Отметим, что для многоклеточных препаратов миокарда было показано достоверное увеличение диастолического напряжения в миокарде крыс с индуцированной монокроталином легочно-сердечной недостаточностью только для растяжений, эквивалентных 95 и 100% L_{\max} (см. рис. 2б). Для растяжений $< 95\% L_{\max}$ достоверных различий показано не было, при этом средние величины диастолического напряжения были даже меньше в миокарде крыс МКТ-группы. Это согласуется с результатом, полученным на уровне изолированных кардиомиоцитов, так как клетку подвергали растяжению до длин саркомеров, не превышающих 2,1 мкм, т.е. до относительных длин меньше 95% L_{\max} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сократимость миокарда лежит в основе насосной функции здорового и патологически измененного сердца и определяется деятельностью саркомеров, а ее выраженность регулируется различными внутриклеточными системами и модулируется условиями окружения кардиомиоцитов [1–3]. В рамках одного исследования сопоставлены эффекты длинозависимой регуляции сократимости здорового и недостаточного миокарда крыс на двух разных уровнях организации миокардиальной ткани – мышечной полоски и изолированного кардиомиоцита. На уровне мышечной полоски в миокарде крыс с вызванной монокроталином легочно-сердечной недостаточностью обнаружен значительный, более чем в два раза, дефицит прироста механического напряжения в ответ на увеличение длины (в данной работе и в работах [16,17]). Количественно менее выраженный, но достоверный дефицит длинозависимой активации сократимости выявлен в изолированных кардиомиоцитах крыс этой же группы. Снижение наклона связи «длина–сила» для активного компонента сокращения мышечного препарата сопровождалось увеличением его диастолического напряжения при растяжении до длин, близких к максимальной. Для изолированного кар-

диомиоцита мы не могли обеспечить степени растяжения до длин саркомера ~2,3 мкм, однако в исследованном диапазоне длин саркомеров (от 1,7 до 2,1 мкм) поведение зависимости «длина–сила» для диастолического компонента напряжения кардиомиоцита совпадает с таковым для мышечной полоски.

Отметим, что хотя мы проводили исследование на двух разных уровнях организации сердечной ткани, мы были вынуждены в силу технических ограничений применять для этих объектов разные режимы сокращения: для мышечной полоски – изометрический режим, для изолированной клетки – ауksотонический режим. При активном укорочении кардиомиоцита в ауksотоническом режиме сокращения имеет место феномен длинозависимой инактивации укорочением, который зависит не только от амплитуды укорочения, но и от начальной степени растяжения клетки [18–20], в то время как мышечная полоска развивала усилие при квазипостоянной длине саркомеров. Так как установлено прямое влияние условий механического нагружения сердечной клетки на ее сократительное поведение [21,22], мы не проводили сопоставления между собой результатов, полученных в каждом из этих режимов. В данной работе мы обратили основное внимание на факт наличия выраженного снижения угла наклона связи «длина–сила» в миокарде с легочно-сердечной недостаточностью, вне зависимости от режима сокращения или уровня организации миокарда.

Итак, снижение длинозависимой активации сократимости миокарда при развитии легочно-сердечной недостаточности в значительной степени обусловлено дефицитом чувствительности механизмов генерации силы к изменению длины саркомеров на клеточном уровне. На тканевом уровне результат такого патологического ремоделирования проявляется количественно более заметно, вероятно, за счет влияния пространственной и временной неоднородности функции отдельных кардиомиоцитов.

Авторы благодарят Д.А. Кузнецова (ИИФ УрО РАН) за реализацию методики экспериментального развития легочно-сердечной недостаточности у крыс при использовании монокроталина.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18-118020590031-8), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00545) и Комплексной программы УрО РАН (№ 18-7-4-15, АААА-А18-118020590134-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. P. Dobesh, J. P. Konhilas, and P. P. de Tombe, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282** (3), H1055 (2002).
2. P. P. de Tombe, R. D. Mateja, K. Tachampa, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48** (5), 851 (2010).
3. H. E. D. J. ter Keurs, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302** (1), H38 (2012).
4. C. F. Vahl, T. Timek, A. Bonz, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 957 (1998).
5. K. Brixius, H. Reuter, W. Bloch, and R. H. Schwinger, *Eur. J. Heart Failure* **7**, 29 (2005).
6. H. Gu, Y. Li, H. Fok, et al., *Hypertension* **69** (4), 633 (2017).
7. R. Schwinger, M. Böhm, A. Koch, et al., *Circ. Res.* **74**, 959 (1994).
8. C. Holubarsch, T. Ruf, D. J. Goldstein, et al., *Circulation* **94**, 683 (1996).
9. N. Milani-Nejad, B. D. Canan, M. T. Elnakish, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309** (12), H2077 (2015).
10. D. Fan, T. Wannenburg, and P. P. de Tombe, *Circulation* **95**, 2312 (1997).
11. Y. Ishibashi, J. C. Rembert, B. A. Carabello, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H11 (2001).
12. S. A. Doggrel and L. Brown, *Cardiovasc. Res.* **39**, 89 (1998).
13. M. H. Hessel, P. Steendijk, B. den Adel, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H2424 (2006).
14. S. Sugiura, S. Nishimura, S. Yasuda, et al., *Nat. Protoc.* **1** (3), 1453 (2006).
15. G. Iribe, M. Helmes, and P. Kohl, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292** (3), H1487 (2007).
16. O. Lookin, D. Kuznetsov, and Y. Protsenko, *J. Physiol. Sci.* **65**, 89 (2015).
17. O. Lookin, A. Balakin, D. Kuznetsov, and Y. Protsenko, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **42** (11), 1198 (2015).
18. L. M. Hanft, F. S. Korte, and K. S. McDonald, *Cardiovasc. Res.* **77** (4), 627 (2008).
19. L. P. Collis, Y. Sun, and R. B. Hill, *J. Comp. Physiol. B* **176** (4), 371 (2006).
20. R. Fortuna, M. Groeber, W. Seiberl, et al., *Physiol. Rep.* **5** (12), e13279 (2017).
21. G. Iribe, T. Kaneko, Y. Yamaguchi, and K. Naruse, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **115** (2–3), 103 (2014).
22. R. Peyronnet, C. Bollensdorff, R. A. Capel, et al., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **130** (Part B), 333 (2017).

Deficiency of Length-Dependent Activation of Contraction in Myocardium from Rats with Heart Failure: Evaluation on Muscle and Single Cell Levels

O. Lookin* ** and Yu.L. Protsenko*

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

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

Within the same project we studied the extent of length-dependent activation of contraction in right ventricular myocardium of healthy rats and rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and heart failure on two separate levels of myocardial tissue: muscle strip and isolated cardiomyocyte. It was found that the deficiency of a length-dependent increase in the contractile force developed by the myocardium from failing the rat heart is similar quantitatively on both levels. This indicates that suppression of the mechanisms of length-dependent regulation of myocardial contractility in heart failure occurs primarily at the cardiac cell level. At the muscle strip level we found that the deficiency of force-length relation is more profound, probably, due to the influence of spatial organization of myocytes on the integral contractile response of the muscle.

Keywords: muscle, cardiomyocyte, force-length relation, heart failure, monocrotaline