

МЕХАНИЧЕСКИЕ АЛЬТЕРНАНСЫ В КАРДИОМИЦИТАХ МИОКАРДИАЛЬНЫХ РУКАВОВ ВЕРХНЕЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ И ЛЕГОЧНЫХ ВЕН КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИСТОЧНИК ЭКТОПИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕДСЕРДИЙ

© 2025 г. Т. А. Мячина¹, К. А. Бутова¹, Р. А. Симонова¹, А. М. Кочурова¹, Г. В. Копылова¹,
А. Д. Хохлова², Д. В. Щепкин^{1, *}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

²Вашингтонский университет, Сент-Луис, Миссури, США

*e-mail: cmybp@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2025 г.

После доработки 13.03.2025 г.

Принята к публикации 29.03.2025 г.

Миокард правого и левого предсердий (RA и LA) продолжается в верхнюю полую вену (SVC) и легочные вены (PV) и формирует миокардиальные рукава, которые являются источниками эктопического возбуждения, вызывающими фибрилляцию предсердий. Мы сравнили динамику саркомеров одиночных кардиомиоцитов из миокардиальных рукавов SVC и PV и предсердий морской свинки. Миоциты SVC характеризовались большим временем достижения пика укорочения и 50% расслабления саркомеров, чем кардиомиоциты других групп. В кардиомиоцитах SVC, PV и ПП отсутствовала корреляция между амплитудой укорочения саркомеров и длиной кардиомиоцита. В кардиомиоцитах миокардиальных рукавов SVC и PV обнаружены альтернансы амплитуды укорочения саркомеров. Альтернансы сократительной функции и отсутствие корреляции между величиной амплитуды укорочения саркомеров и морфометрическими характеристиками клеток в миокардиальных рукавах SVC и PV указывают на возможность формирования уязвимого к патологическим факторам механического субстрата, провоцирующего аритмии.

Ключевые слова: миокардиальные рукава, кардиомиоциты верхней полую вены, кардиомиоциты легочной вены, укорочение-расслабление саркомеров, механические альтернансы, фибрилляция предсердий

DOI: 10.31857/S0044452925020044, EDN: IFCLRT

ВВЕДЕНИЕ

Миокард правого и левого предсердий (RA и LA) имеет продолжение в верхнюю полую вену (SVC) и легочные вены (PV), формируя так называемые миокардиальные рукава. Кардиомиоциты миокардиальных рукавов имеют несколько источников происхождения [1]. На примере человека с помощью компьютерной томографии и доплерографии показано, что сокращение миокардиальных рукавов легочных вен принимает активное участие в наполнении левого предсердия кровью, и изоляция миокардиальных рукавов приводит к ухудшению сократимости и резервуарной функции левого предсердия [2]. На крысах было показано, что отсутствие кардиомиоцитов в PV приводит к развитию легочной гипертензии [3].

Вследствие своих анатомических и электрофизиологических свойств миокардиальные рукава вен известны как источник эктопической активности,

иницирующей развитие фибрилляции предсердий (ФП) [4]. Механизмы возникновения эктопической активности и факторы, поддерживающие эту аномальную электрическую активность, остаются плохо изученными. В частности, слабо исследована сократительная функция кардиомиоцитов миокардиальных рукавов, а между тем их механические свойства могут служить основой для возникновения электрофизиологических аномалий по механизму механоэлектрической обратной связи [5, 6].

В предыдущей работе [7] мы сравнили сократительную функцию кардиомиоцитов LA и миокардиальных рукавов PV, предполагая наличие возможного механического субстрата формирования эктопических очагов. Мы обнаружили, что характеристики сократительной функции саркомеров в кардиомиоцитах миокардиальных рукавов PV не отличаются от таковых в LA, однако в PV отсутству-

ет корреляция между длиной клетки и укорочением саркомера, что может говорить о сниженной функциональной адаптационной способности кардиомиоцитов PV по сравнению с LA [8].

подавляющее большинство исследований сосредоточено на миокардиальных рукавах PV как основном источнике аномальной электрической активности, индуцирующей нарушение предсердного ритма [4]. Однако, известны клинические случаи ФП, развивающейся от фокальных очагов в SVC [9–11], так как правые отделы имеют ряд предпосылок для возникновения очагов эктопического возбуждения [12,13]. Ориентация кардиомиоцитов и экспрессия коннексинов миокардиальных рукавов SVC характеризуется высокой гетерогенностью, что увеличивает риск возникновения анизотропной проводимости, как было показано на сердцах собак [14]. На сердцах человека обнаружено, что волокна, составляющие миокардиальные рукава полых вен, характеризуются сложной архитектурой и морфологией, схожей с волокнами Пуркинье [15]. Электрофизиологические исследования подтверждают наличие в миокардиальных рукавах SVC здоровых животных популяций кардиомиоцитов с пейсмейкерной активностью [16], также отмечается, что миоциты SVC, хотя и в меньшей степени, чем миоциты PV, могут демонстрировать наличие ранних постдеполяризаций даже при нормальных физиологических условиях [17].

Возникают вопросы о наличии механических предпосылок возникновения эктопических очагов электрического возбуждения в PV и SVC. 1. Отличаются ли механические характеристики кардиомиоцитов миокардиальных рукавов SVC от кардиомиоцитов PV? 2. Обладают ли кардиомиоциты SVC особенностями сократительной функции, создающими предпосылки для возникновения эктопических очагов возбуждения? Для ответа на эти вопросы мы сравнили характеристики сократительной функции кардиомиоцитов из миокардиальных рукавов SVC и PV и предсердий и проанализировали: 1) корреляцию между параметрами сокращения саркомеров и размерами кардиомиоцитов; 2) наличие альтернансов амплитуд укорочения саркомеров.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на половозрелых инбредных самках морских свинок весом 650–700 г. Все животные были получены из вивария ИИФ УрО РАН и до эксперимента содержались в одинаковых условиях: по 4–5 особей в вольере, со световым режимом 12 ч света/12 ч темноты и свободным доступом к пище и воде.

Перед выводом морские свинки подвергались внутримышечной инъекции раствором гепарина

натрия (5000 МЕ/кг, ООО “Эллара”, РФ) для предотвращения развития тромбоза коронарных артерий и анестезии Золетилом-100 (Virbac, Франция) в дозе 0.3 мл/кг веса с премедикацией 2% Ксилазином (Alfasan, Нидерланды) в дозе 1 мл/кг веса за 30 и за 15 минут до эвтаназии, соответственно. Сердца изымали во время глубокого наркоза животных.

Изоляция одиночных кардиомиоцитов предсердий и вен. Одиночные кардиомиоциты предсердий и миокардиальных рукавов получали комбинацией техник ретроградной перфузии изолированного сердца по Лангендорфу с инъекциями в ткани предсердий и вен [7] с модификациями. Если не указано иное, все реагенты, используемые для изоляции кардиомиоцитов, от производителя Sigma-Aldrich (США). После вскрытия грудной клетки сердце промывали охлажденным НЕРЕС-содержащим раствором Тироды (концентрация в мМ: 140.0 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgSO₄, 10.0 НЕРЕС, 11.1 D-глюкоза, 1.25 CaCl₂, pH 7.35 с NaOH) с добавлением 10 МЕ/кг гепарина натрия и перемещали в препаровальную кювету с тем же раствором. На изолированном сердце сохраняли SVC и PV длиной по ~5–7 мм и лигировали с дистального конца хлопчатобумажной нитью. Далее сердце помещали на аппарат Лангендорфа и перфузировали 5 мин раствором Тироды и гиперкалиевым раствором с номинальным содержанием Ca²⁺ (15 мин, в мМ: 115.0 NaCl, 14.0 KCl, 1.2 MgSO₄, 10.0 НЕРЕС, 20.0 L-таурин, 5.0 L-аденозин, 11.1 D-глюкоза, 0.3 ЕГТА, 0.025 CaCl₂, pH 7.15) при 37 °С и скорости потока ~3.5–4.0 мл/мин. Далее в сердце подавали гиперкалиевый раствор с номинальным содержанием Ca²⁺ и 0.7 мг/мл коллагеназы L (~0.5 МЕ/мг FALGPA и 43 МЕ/мг Casein,) и 0.6 мг/мл протеазы XIV (~3.5 МЕ/мг) на 18–20 мин. После данного этапа аппаратную перфузию прекращали, и сердце перемещали в чашку Петри с 0.8 мг/мл коллагеназы L и 0.6 мг/мл протеазы XIV, где выполнялась процедура бережного ферментативного расщепления с помощью инъекций на протяжении 10 мин при 37 °С и непрерывной подаче O₂. Далее лигатуры удаляли, LA, RA, PV, SVC разделяли по отдельным чашкам Петри и подвергали перфузии с помощью инъекций с 0.9 мг/мл коллагеназы L и 0.6 мг/мл протеазы XIV на протяжении 8–10 мин. Финальную степень ферментативного расщепления ткани определяли по выходу одиночных кардиомиоцитов в раствор, после чего перфузию прекращали, а остатки ткани разрезали. Полученную суспензию разводили гиперкалиевым раствором без ЭГТА с номинальным содержанием Ca²⁺ с добавлением 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в пропорции 1:1 и центрифугировали при 200 об/мин 2 мин (ротор ELM1 6M.05, центрифуга ELM1 CM-6MT, ELM1 ltd., Латвия), после чего в 4 этапа поднимали концентрацию Ca²⁺ в среде до

1.8 мМ. Готовую суспензию изолированных кардиомиоцитов хранили в HEPES-содержащем растворе Тирода (в мМ: 140.0 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgSO₄, 10.0 HEPES, 11.1 d-глюкоза, 1.8 CaCl₂, pH 7.35 с NaOH) при 22–24 °С и использовали в течение 2–3 часов.

Измерение и анализ динамики укорочения-расслабления саркомеров в кардиомиоцитах предсердий и миокардиальных рукавов. К измерениям допускали кардиомиоциты с визуально сохранной поперечно-полосатой исчерченностью, демонстрирующие активные сокращения при частоте внешней электрической стимуляции 1 Гц.

Динамику укорочения-расслабления саркомеров в механически ненагруженных кардиомиоцитах регистрировали на аппаратно-программном комплексе MCSYS-02 (IonOptix, США), оснащенный высокоскоростной камерой MyoCam-S (IonOptix, США, частота регистрации ≥ 250 кадров/с) и интегрированным в микроскоп Motic AE30/31 (Motic, Китай). Характеристики укорочения и расслабления саркомеров клетки рассчитывали по профилю интенсивности, сформированному по поперечно-полосатой исчерченности, в выбранном регионе кардиомиоцита при увеличении 40х вдоль продольной оси клетки. Измерения выполняли при 37°С и частоте электрической стимуляции 1 Гц.

Для сравнения характеристик сократительной функции кардиомиоцитов предсердий и миокардиальных рукавов оценивали следующие параметры (рис. 1а): конечно-диастолическую длину саркомеров (EDSL), амплитуду укорочения саркомеров в абсолютных единицах и при нормировании на величину EDSL, максимальные скорости достижения пика укорочения (V_{short}) и расслабления саркомеров (V_{rel}), а также время достижения пика укорочения (TTP) и 50% расслабления саркомера (TTR₅₀). Анализ параметров выполняли при помощи программного пакета IonWizard (IonOptix, США).

Оценивали динамику укорочения саркомеров изолированных кардиомиоцитов как в стационарном состоянии (т. е. без видимых изменений параметров укорочения-расслабления на протяжении ≥30 с), так и при возникновении альтернансов. Альтернансы определяли как видимые чередующиеся отклонения амплитуд укорочения саркомеров в большую (MAX) и меньшую (MIN) стороны от величины, регистрируемой до возникновения альтернансов (рис. 2е). Значения MIN и MAX выражали как процент от усредненных величин амплитуд укорочения саркомеров, полученных с участков записи до и после эпизода с альтернансом ((b+a)/2, рис. 2е).

Измерение морфометрических характеристик изолированных кардиомиоцитов предсердий и миокардиальных рукавов. Изображения изолированных кардиомиоцитов получали в программе IonWizard (IonOptix, США) при увеличении объектива 40х и

в отсутствие электрической стимуляции. Длину и ширину (диаметр) одиночных кардиомиоцитов измеряли с помощью программы FIJI ImageJ. Для кардиомиоцитов сложной формы вычисляли среднее значение параметров по максимальным и минимальным значениям длины и/или ширины клеток.

Анализ содержания изоформ и степени фосфорилирования белков саркомера. Миозин и нативные тонкие филаменты экстрагировали из миокарда предсердий и миокардиальных рукавов вен (участков длиной ~5–7 мм) с помощью стандартных методов [18, 19]. Изоформный состав тяжелых цепей миозина определяли с помощью Ds-Na-ПААГ. Степень фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С (сMyBP-C), регуляторной легкой цепи миозина (RLC) тропонина Т (TnT) и тропонина I (TnI) определяли с помощью 10% (для сMyBP-C) и 12% (для RLC, TnT и TnI) Ds-Na-ПААГ с окрашиванием на фосфогруппы ProQ Diamond (Thermo Fisher Scientific, США). Окрашивание SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США) использовалось для оценки общего количества белка. Гели сканировали на ChemiDoc^{MP} Imaging System (Bio-Rad, США) и определяли интенсивность белковых полос с помощью Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, США). Степень фосфорилирования белков выражали как отношение интенсивности ProQ Diamond и SYPRO Ruby.

Статистический анализ. Все данные экспериментов собирали и систематизировали в программе Excel 2016 (Microsoft Corporation, США). Статистический анализ выполняли в пробной версии программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, США). Нормальность распределения определяли критерием Шапиро–Уилко, равенство дисперсий устанавливали с помощью критерия Барлетта. Статистический анализ выполняли с использованием 1-way ANOVA/теста Брауна–Форсайта/теста Краскелла–Уоллиса (в зависимости от параметров распределения значений и равенства дисперсий в выборках), задавая в параметрах анализа сравнение групп: SVC vs RA, SVC vs PV и LA vs RA. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Для исследования взаимосвязей между характеристиками укорочения-расслабления саркомеров и/или длиной и шириной кардиомиоцитов использовали линейный регрессионный анализ Спирмана. $p < 0.05$ определяло статистически значимую корреляцию, и $r > 0.70$ указывало на сильную корреляцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение характеристик сократительной функции саркомеров кардиомиоцитов предсердий и миокардиальных рукавов SVC и PV

Репрезентативные профили изменения длины саркомеров при механически ненагруженных

сокращения кардиомиоцитов предсердий и вен представлены на рис. 1b. Обнаружено отличие параметров динамики сокращения-расслабления саркомеров кардиомиоцитов SVC и PV, в то время как параметры сокращения саркомеров из миокардиальных рукавов и соответствующих предсердий не отличались между собой (рис. 1c–h). Значения конечно-диастолической длины саркомеров (EDSL) между кардиомиоцитами исследуемых групп не отличались (рис. 1c). По сравнению с кардиомиоцитами PV, кардиомиоциты SVC имели в ~1.44 и ~1.8 раза большие значения времени достижения пика укорочения (TTP) и расслабления саркомеров (TTR₅₀), соответственно (рис. 1c, g, h). Скоростные и временные параметры укорочения саркомеров кардиомиоцитов предсердий также отличались между собой. По сравнению с LA саркомеры кардиомиоцитов RA имели в ~2 раза меньшее значение $V_{др}$ и в ~1.5 и ~2.0 раза большие значения TTP и TTR₅₀, соответственно (рис. 1f–h).

В отличие от кардиомиоцитов предсердий, кардиомиоциты PV и SVC характеризовались наличием альтернансов амплитуд укорочения саркомеров, чередовавшихся с участками псевдостационарной сократительной активности. Среди кардиомиоцитов PV альтернансы укорочения саркомеров регистрировались в ~60% выборки (в 25 из 42 кардиомиоцитов), среди кардиомиоцитов SVC — в 43% выборки (в 6 из 14 кардиомиоцитов). Величина отклонения амплитуды укорочения в MIN альтернансе от значений амплитуды укорочения до и после альтернансов составляла в обеих венах около 12%. Отклонение амплитуды укорочения в MAX альтернансе было ~1.76 раз больше в PV, чем в SVC, и составляло около 17% от величины амплитуды укорочения саркомеров до и после появления альтернансов (рис. 2c–e).

Таким образом, кардиомиоциты SVC и PV отличаются по времени укорочения и расслабления саркомеров. В кардиомиоцитах миокардиальных рукавов были выявлены альтернансы амплитуды укорочения саркомеров, причем в миоцитах SVC величина этих колебаний была меньше, чем в PV.

Сравнение морфометрических характеристик кардиомиоцитов предсердий и миокардиальных рукавов SVC и PV.

Кардиомиоциты SVC, как и кардиомиоциты PV, характеризуются большей длиной клетки по сравнению с кардиомиоцитами предсердий (рис. 3). Кардиомиоциты LA шире, чем кардиомиоциты PV и RA (рис. 3f).

Далее были проанализированы корреляции между параметрами сократительной функции и морфометрическими характеристиками кардиомиоцитов SVC и RA. Обнаружено, что в кардиомиоцитах SVC и RA с увеличением амплитуды укорочения возрас-

тает V_{short} саркомеров (рис. 4a). Корреляция между амплитудой укорочения саркомеров и длиной кардиомиоцита не обнаружена ни в SVC ($p = 0.88$), ни в RA ($p = 0.86$) (рис. 4b).

Характеристика основных белков саркомеров предсердий и миокардиальных рукавов PV и SVC

Характеристики сокращения кардиомиоцитов определяются свойствами белков сократительного аппарата, поэтому мы сравнили изоформный состав тяжелых цепей миозина и степень фосфорилирования сMyBP-C, TnI, TnT в миокардиальных рукавах и предсердиях. Миозин, экстрагированный из LA, RA, миокардиальных рукавов PV и SVC содержал α -изоформу тяжелых цепей миозина (MHC, рис. 5).

Примеры гель-электрофореза с окрашиванием Pro-Q Diamont и SYPRO Ruby на определение фосфорилирования сMyBP-C, RLC, TnT и TnI представлены на рис. 6a–c. Обнаружено, что степень фосфорилирования сMyBP-C в миокарде LA в 1.2 раза ниже, чем в RA, но выше, чем в PV (рис. 6d). Фосфорилирование сMyBP-C в RA и SVC, а также в PV и SVC не отличалось. Фосфорилирование RLC в PV было ниже, чем в LA, а между SVC и RA не отличалось (рис. 6e).

Обнаружены отличия в степени фосфорилирования белков тропонинового комплекса. Фосфорилирование TnT было в 2.4 раза выше в LA, чем в PV, и в RA в 3 раза выше, чем в SVC. Фосфорилирование TnT в 1.6 раза было ниже в LA, чем в RA, но не отличалось между PV и SVC (рис. 6f). Фосфорилирование TnI в LA и RA не отличалось (рис. 6g). В LA фосфорилирование TnI было в 1.4 раза выше, чем в PV, а в RA в 2 раза ниже, чем в PV. В SVC фосфорилирование TnI в 4.5 раза выше, чем в PV (рис. 6g).

Таким образом, уровни фосфорилирования сократительных белков саркомера в миокардиальных рукавах и предсердиях отличаются и имеются особенности фосфорилирования белков в левом и правом отделах сердца.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследований миокардиальных рукавов верхней поллой вены (SVC) и легочных вен (PV) посвящены их электрофизиологическим свойствам в связи с тем, что миокард этих вен является источником эктопических очагов, которые приводят к фибрилляции предсердий (ФП). Как известно, электрофизиологические свойства миокарда связаны с механическими благодаря механоэлектрической обратной связи [5, 6]. Мы сравнили характеристики сократительной функции одиночных кардиомиоцитов из миокардиальных рукавов SVC и PV и предсердий морской свинки и

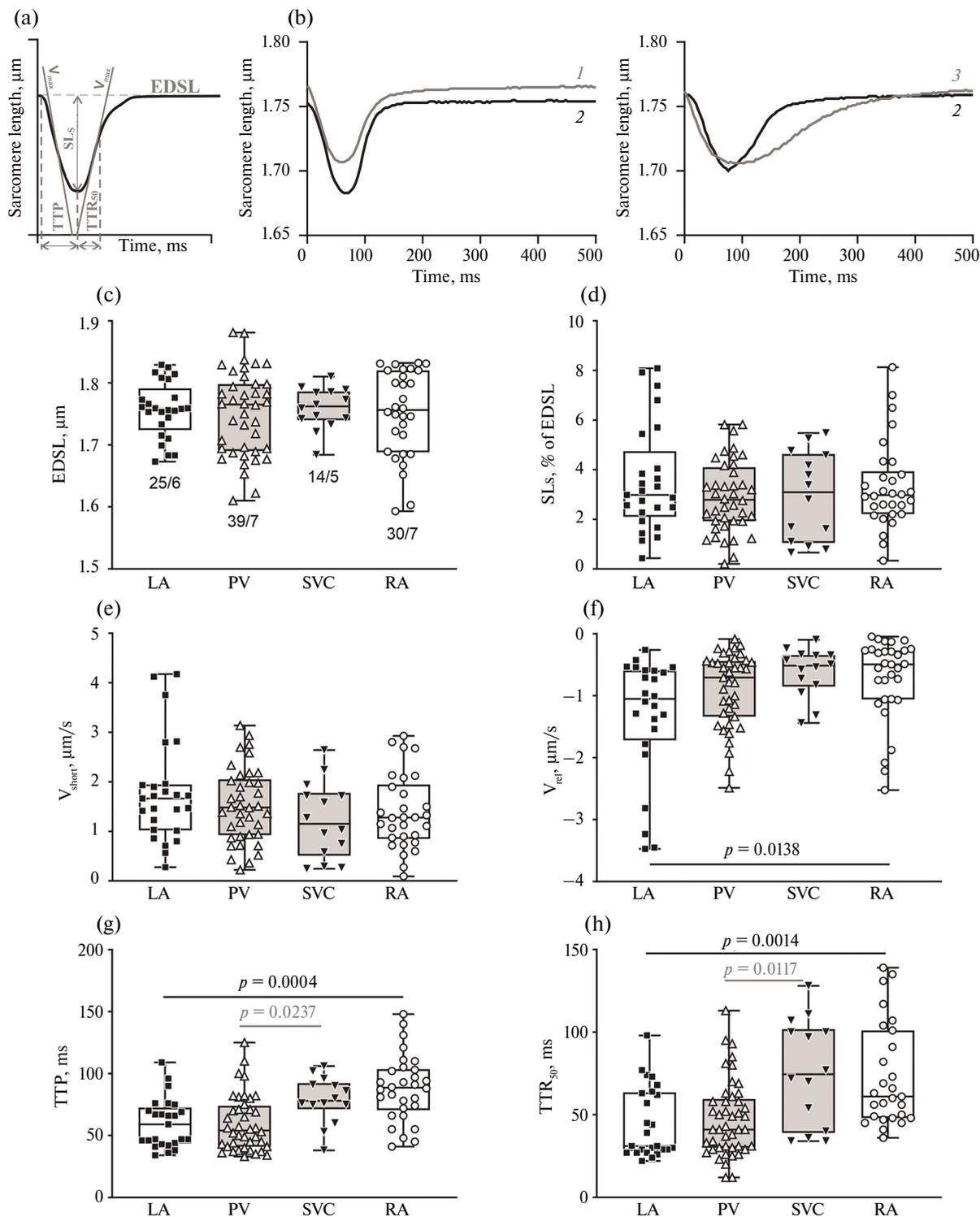


Рис. 1. Анализ параметров укорочения-расслабления саркомеров предсердий и миокардиальных рукавов вен: (а) — репрезентативная схема, демонстрирующая расчет параметров укорочения-расслабления саркомеров; (б) — репрезентативные профили изменения длины саркомеров при механически ненагруженных сокращениях кардиомиоцитов: 1 — саркомеры кардиомиоцита легочной вены (PV); 2 — саркомеры кардиомиоцита левого предсердия (LA); 3 — саркомеры кардиомиоцита верхней полой вены (SVC); 4 — саркомеры кардиомиоцита правого предсердия (RA). Оцениваемые параметры укорочения саркомеров: (с) — конечно-диастолическая длина саркомеров (EDSL); (д) — амплитуда укорочения саркомеров (SL_s , в % от величины EDSL); (е) — максимальная скорость достижения пика укорочения (V_{short}); (ф) — максимальная скорость достижения расслабления (V_{rel}); (г) — время достижения пика укорочения (TTP); (h) — время достижения 50% расслабления (TTR_{50}). Данные представлены в виде «ящика-с-усами» (границы — интервал Q1-Q3, усы — разброс между минимальным и максимальным значениями в выборке). Количество кардиомиоцитов в выборке (n) и количество животных в генеральной совокупности (N) представлено на графике как (n/N). 1-way ANOVA, достоверность различий при $p < 0.05$.

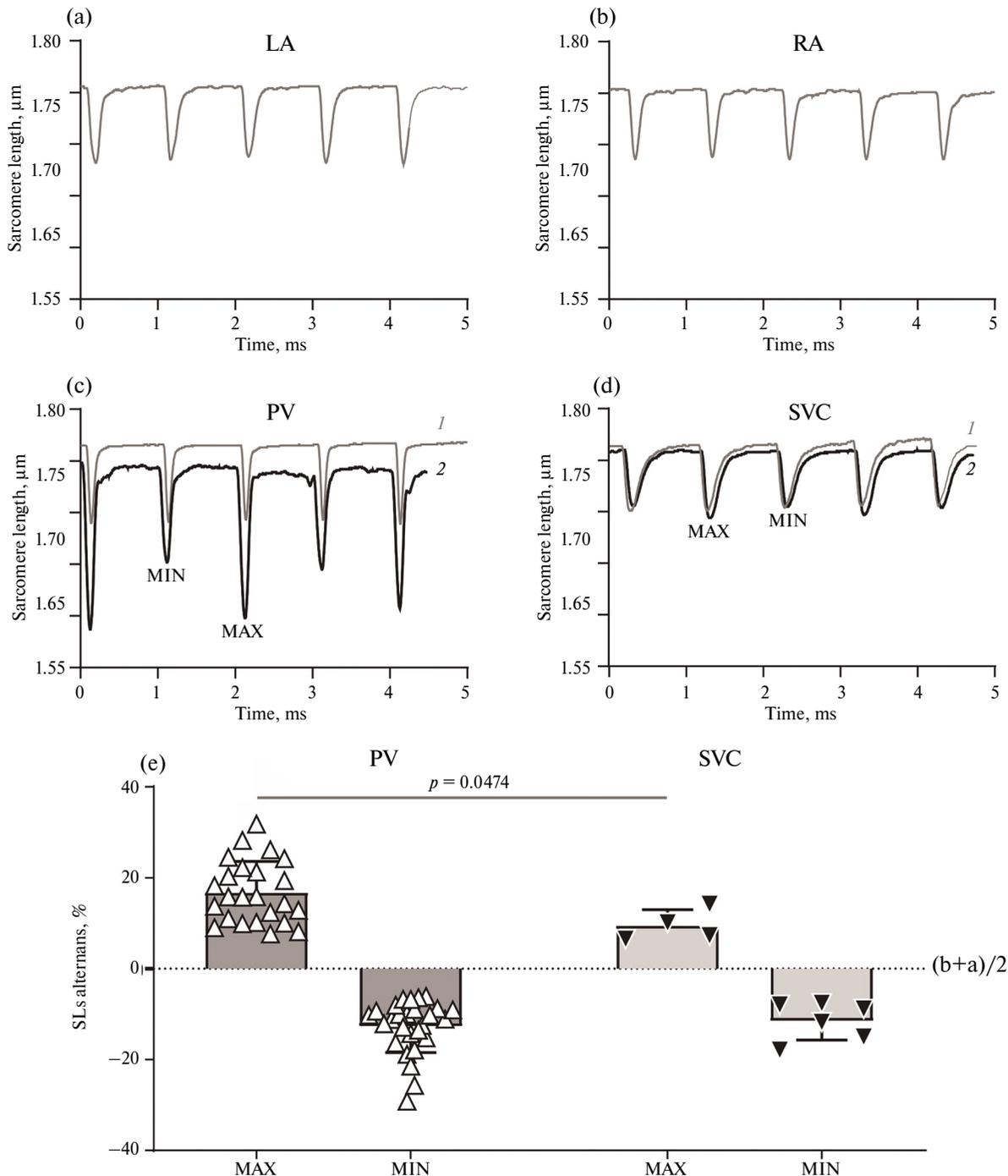


Рис. 2. Анализ альтернансов укорочения саркомеров: (a, b) — репрезентативные записи укорочения-расслабления саркомеров левого и правого предсердий (LA, RA) в стационарном состоянии; (c, d) — репрезентативные записи укорочения-расслабления саркомеров миокардиальных рукавов (PV, SVC) в стационарном состоянии и при появлении альтернансов: 1 — изменение длины саркомеров в стационарном состоянии (без альтернансов); 2 — изменения длины саркомеров при альтернирующей активности клеток; MIN, MAX — чередующиеся отклонения амплитуд укорочения саркомеров в меньшую (MIN) и большую (MAX) стороны от величины, регистрируемой до возникновения альтернансов. (e) — отклонения амплитуды укорочения саркомеров миокардиальных рукавов в MAX и MIN альтернансах в процентах относительно величин амплитуды в псевдостационарном состоянии (до и после альтернанса). Данные представлены как среднее и стандартное отклонение.

проанализировали возможность формирования в миокарде вен механических предпосылок для возникновения эктопических очагов электрической активности. Были получены следующие основные

результаты: 1) кардиомициты SVC и PV отличаются между собой временем укорочения и расслабления саркомеров, но не отличаются характеристиками укорочения-расслабления саркомеров от

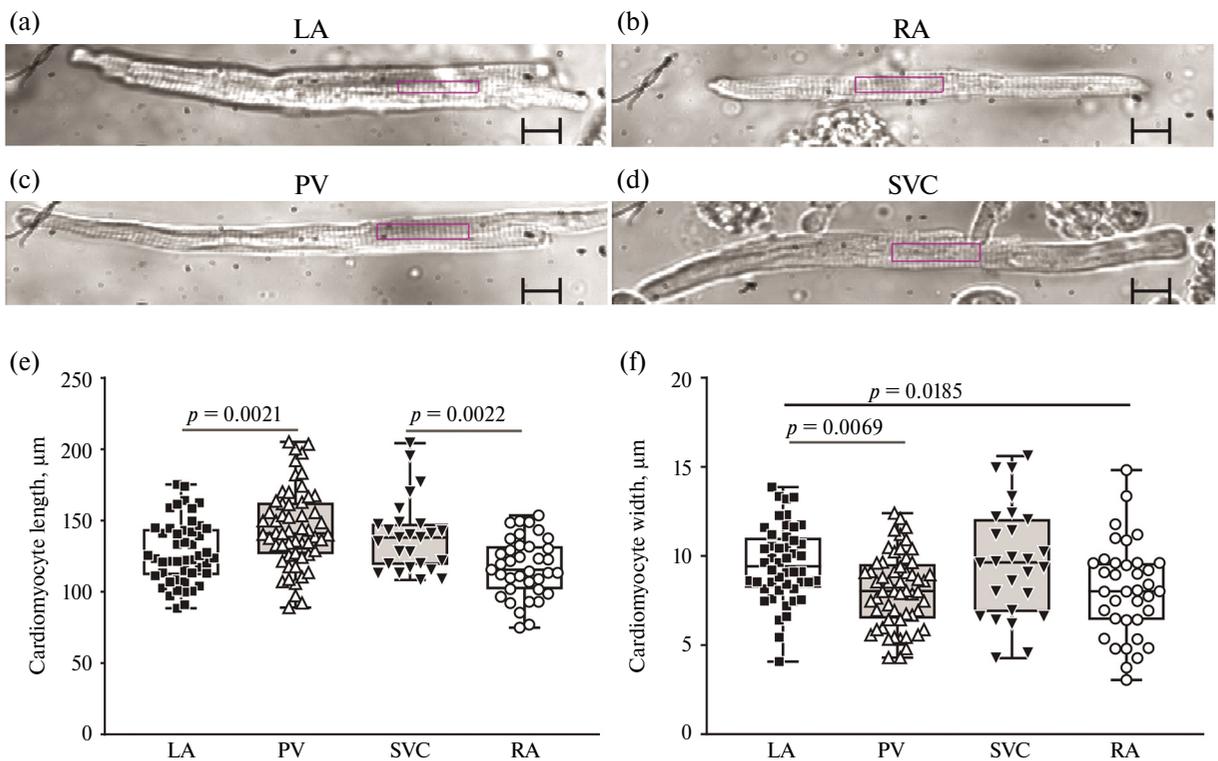


Рис. 3. Анализ морфометрических характеристик кардиомиоцитов предсердий и вен: (a, b) — репрезентативные фотографии кардиомиоцитов из левого и правого предсердия (LA, RA) и (c, d) — миокардиальных рукавов легочной и верхней полой вен (PV, SVC); (e) — длина кардиомиоцитов предсердий и вен; (f) — ширина (диаметр) кардиомиоцитов предсердий и вен. Шкала соответствует 10 мкм. Данные представлены в виде “ящика-с-усами” (границы — интервал Q1-Q3, усы — разброс между минимальным и максимальным значениями в выборке). 1-way ANOVA, достоверность различий при $p < 0.05$.

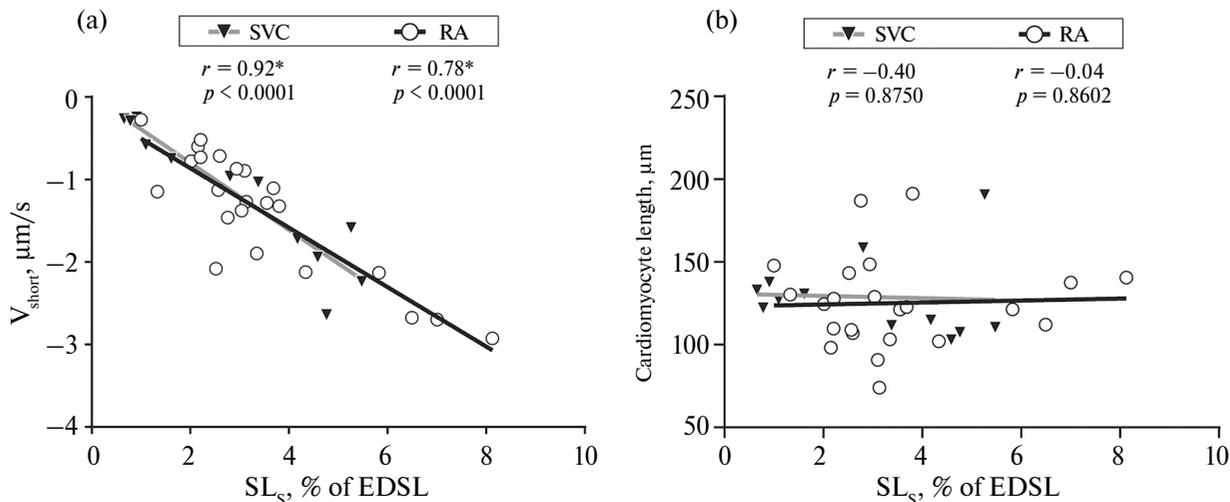


Рис. 4. Анализ зависимости между морфометрическими характеристиками кардиомиоцитов и параметров укорочения-расслабления саркомеров правого предсердия (RA) и миокардиального рукава верхней полой вены (SVC): (a) — корреляция максимальной скорости достижения пика укорочения саркомеров (V_{short}) и амплитуды укорочения саркомеров; (b) — корреляция амплитуды укорочения саркомеров и длины кардиомиоцитов. Сильная корреляция при $r > 0.70$.

кардиомиоцитов соответствующих предсердий; 2) для кардиомиоцитов миокардиальных рукавов SVC и PV характерно наличие альтернансов амплитуды

укорочения саркомеров и отсутствие корреляции между амплитудой укорочения саркомеров и длиной кардиомиоцитов.

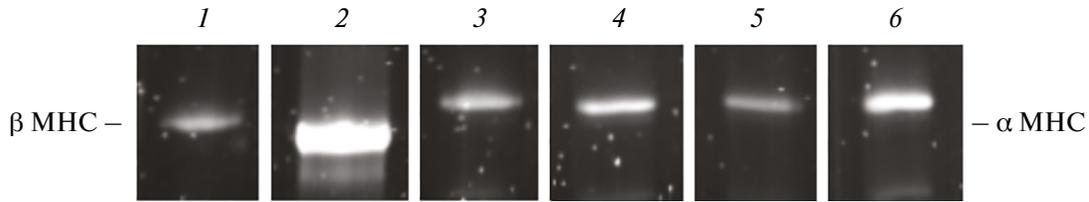


Рис. 5. Полиакриламидные гели электрофореза в присутствии Ds-Na для изоформ тяжелых (МНС) цепей миозина, экстрагированного из LA и RA, миокардиальных рукавов PV и SVC: 1 — миозин из левого желудочка в качестве маркера на β МНС; 2 — маркер молекулярной массы 200 кДа (Thermo Fisher Scientific, США); 3, 4, 5, 6 — миозин из LA, PV, SVC и RA, соответственно. ПААГ окрашен SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США).

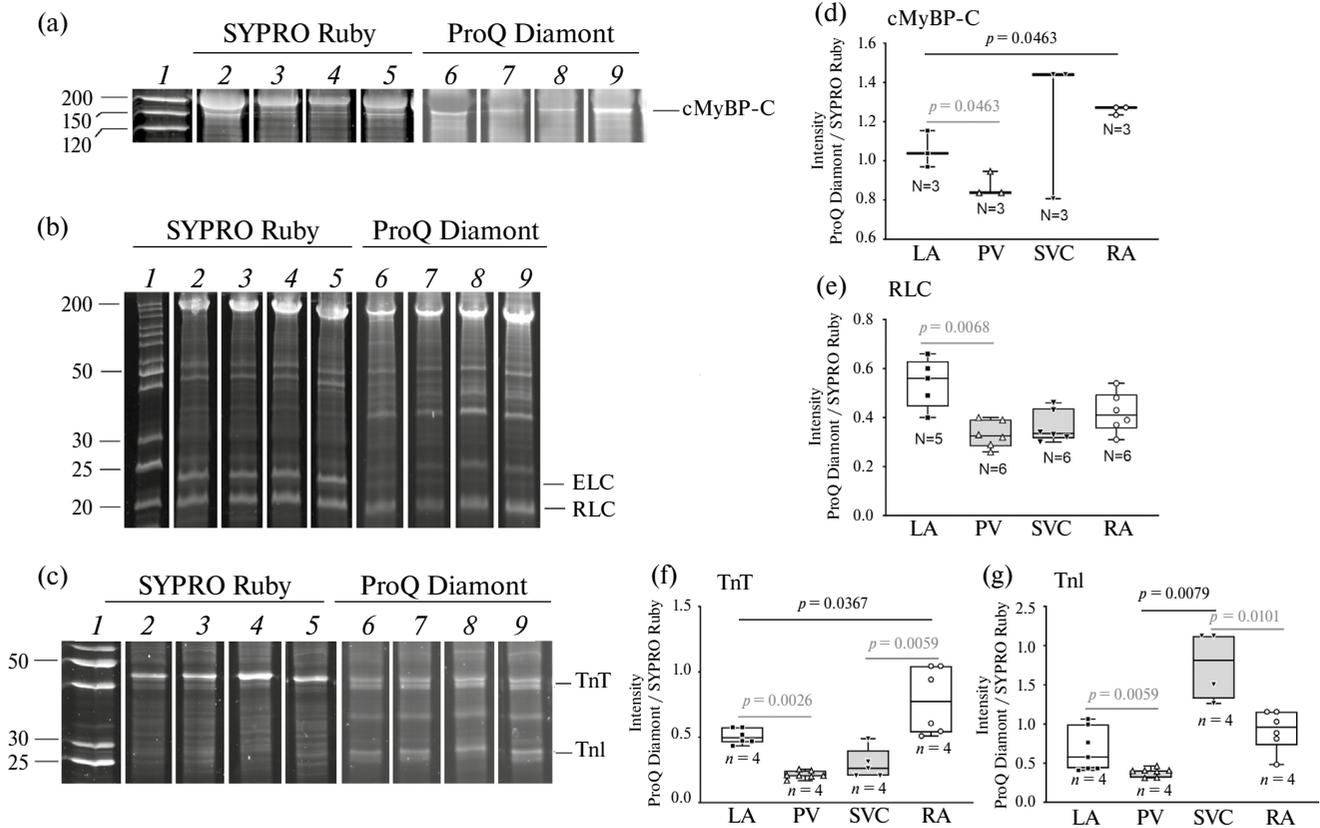


Рис. 6. Анализ степени фосфорилирования сократительных белков саркомера: (a) — пример Ds-Na-ПААГ для определения степени фосфорилирования сMyBP-C, (b) регуляторной легкой цепи миозина (RLC) и (c) белков тропонинового комплекса TnT и TnI. 1 — маркер молекулярной массы (Thermo Fisher Scientific, США); 2 и 6 — миозин из левого предсердия (LA); 3 и 7 — миозин из легочных вен PV; 4 и 8 — миозин из верхней полой вены (SVC); 5 и 9 — миозин из правого предсердия (RA). Уровни фосфорилирования (d) сMyBP-C, (e) RLC, (f) TnT и (g) TnI. Данные по степени фосфорилирования белков представлены в виде “ящика-с-усами” (границы — интервал Q1-Q3, усы — разброс между минимальным и максимальным значениями в выборке). N — количество животных в каждой из анализируемых групп.

Сравнение характеристик сокращения-расслабления кардиомиоцитов миокардиальных рукавов и предсердий

Мы обнаружили, что характеристики укорочения-расслабления саркомеров между кардиомиоцитами SVC и RA, как между кардиомиоцитами PV и LA, не отличались. Однако, в кардиомиоцитах SVC наблюдали большее время сокращения и расслабления саркомеров в сравнении с кардиомиоци-

тами PV. Ранее на миокарде мыши было показано, что мышечный препарат непарной вены обладает большей продолжительностью достижения пика сокращения и расслабления по сравнению с миокардом левого предсердия [20]. Характеристики сокращения саркомеров определяются свойствами белков саркомера. Тяжелые цепи миозина из миокардиальных рукавов и предсердий представлены α -изоформой МНС (рис. 5), но имелись различия в степени фосфорилирования белков саркомера в

PV и SVC и предсердиях (рис. 6с–е). Показано, что фосфорилирование сМуВР-С и TnI оказывает сочетанный эффект на сокращение миокарда [21, 22]. Степень фосфорилирования TnI в SVC была выше, чем в PV при одинаковой степени фосфорилирования сМуВР-С. Показано, что высокий уровень фосфорилирования TnI при низкой степени фосфорилирования сМуВР-С увеличивает кальциевую чувствительность тонких нитей, что ведет к увеличению времени расслабления, что было отмечено для кардиомиоцитов SVC (рис. 1h).

Кроме того, особенности параметры сокращения-расслабления саркомеров кардиомиоцитов миокардиальных рукавов определяются характеристиками цикла кальция в миоците. В работе Lang с соавт. [23] обнаружено, что в миокарде предсердий и легочных вен человека и мышей имеются региональные особенности T-тубулярной системы и белков электромеханического сопряжения, которые определяют цикл кальция в кардиомиоците. На примере овцы показано, что в кардиомиоцитах легочных вен выше скорость достижения пика и спада кальция в цитозоле, чем в левом предсердии [24].

*Возможность формирования в SVC
механических предпосылок возникновения
эктопических очагов электрической
активности*

Мы обнаружили два основных результата, указывающих на возможность формирования в SVC и PV механических предпосылок возникновения эктопических очагов электрической активности по механизму механоэлектрической обратной связи. Во-первых, для миокарда SVC, как и для миокарда PV [7], выявлено отсутствие корреляции между длиной кардиомиоцита и величиной амплитуды укорочения саркомеров. Форма кардиомиоцитов (соотношение длины и ширины) меняется в ответ на механический стресс. Показано, что в ответ на диастолическое напряжение кардиомиоциты удлиняются путем последовательного добавления саркомеров или становятся толще при систолическом стрессе за счет увеличения количества филаментов в параллели [8, 25]. На основании этих данных можно предположить, что кардиомиоциты миокардиальных рукавов и LA обладают разной адаптационной способностью к патологическим условиям.

Вторым таким результатом является то, что в кардиомиоцитах SVC и PV мы наблюдали наличие альтернансов амплитуд укорочения-расслабления саркомеров (рис. 2). Вероятнее всего, возникновение альтернансов амплитуд укорочения-расслабления саркомеров являются следствием колебаний в длительности ПД и длительности/амплитуде изменения концентрации цитозольного кальция [26]. Показано, что возникновение альтернансов (элек-

трических, кальциевых и/или механических) ассоциировано с риском развития ФП [27, 28]. Альтернансы амплитуд укорочения саркомеров одиночных кардиомиоцитов могут указывать на возможность формирования неоднородного фронта сократительной активности в ткани миокардиального рукава, способствуя тем самым формированию механического проаритмогенного субстрата.

Мы также показали, что в RA отсутствовала корреляция между длиной кардиомиоцита и величиной амплитуды укорочения саркомеров, что позволяет предположить, что RA также характеризуется меньшей адаптивностью сократительной функции, чем LA. Предположение о повышенной чувствительности RA к механической нагрузке в патологических условиях согласуется с данными, полученными на механически нагруженных кардиомиоцитах крысы с пароксизмальной ФП [29]. Ранее было показано, что миокард RA имеет ряд предпосылок к формированию нестабильного механического субстрата и электрофизиологических аномалий [12, 30, 31]. Ушко RA состоит из гребенчатых мышц с разветвленным и перекрывающимся расположением трабекул, а соединение между гребенчатыми мышцами и отностительно гладкой мышечной областью создает электрическую границу [23, 30]. Сложная структура RA может способствовать аритмогенным субстратам при возникновении определенных патофизиологических условий [12, 23] и обуславливать большую чувствительность составляющих ее кардиомиоцитов к изменяющейся механической нагрузке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель данной работы заключалась в установлении механических предпосылок возникновения эктопических очагов электрического возбуждения в PV и SVC. Для кардиомиоцитов SVC и PV было характерно появление альтернансов сокращения, которые могут служить механическим проаритмогенным субстратом и вести к возникновению эктопических очагов возбуждения и фибрилляции предсердий. Ранее было показано, что миокардиальные рукава PV принимают активное участие в наполнении LA кровью и его расслаблении во время систолы левого желудочка [2]. В этой работе мы сравнили характеристики сократительной функции кардиомиоцитов миокардиальных рукавов SVC и PV и предсердий и обнаружили особенности сокращения экстракардиальных кардиомиоцитов. Конкретные механизмы участия экстракардиального миокарда в сокращении сердца требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовали оборудование центра коллективного пользования Института иммунологии и физиологии ИИФ УрО РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Г.В.К., А.Д.Х., Д.В.Ш. — концепция и руководство работой; К.А.Б., Т.А.М., Р.А.С., А.М.К., Г.В.К. — проведение экспериментов; К.А.Б., Т.А.М., Г.В.К., А.Д.Х., Д.В.Ш. — обсуждение результатов исследования; К.А.Б., Т.А.М., Р.А.С. — подготовка графиков статьи, К.А.Б. — написание первоначального текста статьи; Г.В.К., А.Д.Х., Д.В.Ш. — редактирование окончательной версии статьи. Все авторы одобрили окончательный вариант статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на морских свинках были выполнены с соблюдением положений международной Директивы 2010/63/EU и заключением комиссии Института иммунологии и физиологии УрО РАН по контролю за лабораторными животными (заключение этического комитета при ФБГУН ИИФ УрО РАН № 02/23 от 6 апреля 2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00356).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mommersteeg MTM, Brown NA, Prall OWJ, De Gierde Vries C, Harvey RP, Moorman AFM, Christoffels VM (2007) Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* 101: 902–909. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.161182>
2. Mamchur S, Mamchur I, Khomenko E, Kokov A, Bokhan N, Sherbinina D (2014) Mechanical function of left atrium and pulmonary vein sleeves before and after their antrum isolation. *Medicina* 50: 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2014.11.008>
3. Yee M, Cohen ED, Domm W, Porter GA, McDavid AN, O'Reilly MA (2018) Neonatal hyperoxia depletes pulmonary vein cardiomyocytes in adult mice via mitochondrial oxidation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 314: L846–L859. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00409.2017>
4. Santangeli P, Zado ES, Hutchinson MD, Riley MP, Lin D, Frankel DS, Supple GE, Garcia FC, Dixit S, Callans DJ, Marchlinski FE (2016) Prevalence and distribution of focal triggers in persistent and long-standing persistent atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 13: 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.10.023>
5. Meijborg VMF, Belterman CNW, De Bakker JMT, Cornel R, Conrath CE (2017) Mechano-electric coupling, heterogeneity in repolarization and the electrocardiographic T-wave. *Prog Biophys Mol Biol* 130: 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.003>
6. Emig R, MacDonald EA, Quinn TA (2024) Cardiac mechano-electric crosstalk: multi-scale observations, computational integration, and clinical implications. *J Physiol* 602: 4335–4340. <https://doi.org/10.1113/JP286706>
7. Butova XA, Myachina TA, Simonova RA, Kochurova AM, Kopylova GV, Khokhlova AD, Shchepkin DV (2024) Contractile characteristics of single cardiomyocytes in the myocardial sleeves of the pulmonary veins of guinea pigs. *J Evol Biochem Physiol* 60: 1741–1750. <https://doi.org/10.1134/S0022093024050077>
8. Russell B, Curtis MW, Koshman YE, Samarel AM (2010) Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width. *J Mol Cell Cardiol* 48: 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.016>
9. Ooie T, Tsuchiya T, Ashikaga K, Takahashi N (2002) Electrical connection between the right atrium and the superior vena cava, and the extent of myocardial sleeve in a patient with atrial fibrillation originating from the superior vena cava. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 482–485. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2002.00482.x>
10. Watanabe K, Nitta J, Inaba O, Sato A, Inamura Y, Kato N, Suzuki M, Goya M, Hirao K, Sasano T (2021) Predictors of non-pulmonary vein foci in paroxysmal atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol* 61: 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10840-020-00779-x>
11. Kim D, Hwang T, Kim M, Yu HT, Kim TH, Uhm JS, Joung B, Lee MH, Pak HN (2021) Extra-pulmonary vein triggers at de novo and the repeat atrial fibrillation catheter ablation. *Front Cardiovasc Med* 8: 759967. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.759967>
12. Iwamiya S, Ihara K, Nitta G, Sasano T (2024) Atrial fibrillation and underlying structural and electrophysiological heterogeneity. *Int J Mol Sci* 25: 10193. <https://doi.org/10.3390/ijms251810193>
13. Nyuta E, Takemoto M, Sakai T, Mito T, Masumoto A, Todoroki W, Yagyu K, Ueno J, Antoku Y, Koga T, Ueno T, Tsuchihashi T (2021) Importance of the length of the myocardial sleeve in the superior vena cava in patients with atrial fibrillation. *J Arrhythm* 37: 43–51. <https://doi.org/10.1002/joa3.12494>
14. Yeh HI, Lai YJ, Lee SH, Lee YN, Ko YS, Chen SA, Severs NJ, Tsai CH (2001) Heterogeneity of myocardial sleeve morphology and gap junctions in canine superior vena cava. *Circulation* 104: 3152–3157. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100836>
15. Kugler S, Nagy N, Rác G, Tőkés AM, Dorogi B, Nemeskéri Á (2018) Presence of cardiomyocytes exhibiting Purkinje-type morphology and prominent connexin45 immunoreactivity in the myocardial sleeves of cardiac veins. *Heart Rhythm* 15: 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.09.044>
16. Chen YJ, Chen YC, Yeh HI, Lin CI, Chen SA (2002) Electrophysiology and arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from canine superior vena cava. *Circulation* 105: 2679–2685. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000016822.96362.26>
17. Wang P, Yang XC, Liu XL, Bao RF, Ding HY, Li O, Liu TF (2021) Study of the characteristics of the pulmonary vein and superior vena cava of rabbits. *J Biomater Tissue Eng* 11: 112–122. <https://doi.org/10.1166/jbt.2021.2585>

18. Margossian SS, Lowey S (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 85 Pt B: 55–71. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-x)
19. Spiess M, Steinmetz MO, Mandinova A, Wolpensinger B, Aebi U, Atar D (1999) Isolation, electron microscopic imaging, and 3-D visualization of native cardiac thin myofilaments. *J Struct Biol* 126: 98–104. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4111>
20. Liu R, Feng HZ, Jin JP (2014) Physiological contractility of cardiomyocytes in the wall of mouse and rat azygos vein. *Am J Physiol Cell Physiol* 306: C697–C704. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00004.2014>
21. Kumar M, Govindan S, Zhang M, Khairallah RJ, Martin JL, Sadayappan S, De Tombe PP (2015) Cardiac myosin-binding protein C and troponin-I phosphorylation independently modulate myofilament length-dependent activation. *J Biol Chem* 290: 29241–29249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686790>
22. Sevrieva IR, Ponnamp S, Yan Z, Irving M, Kampourakis T, Sun YB (2023) Phosphorylation-dependent interactions of myosin-binding protein C and troponin coordinate the myofilament response to protein kinase A. *J Biol Chem* 299: 102767. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102767>
23. Lang D, Medvedev RY, Ratajczyk L, Zheng J, Yuan X, Lim E, Han OY, Valdivia HH, Glukhov AV (2022) Region-specific distribution of transversal-axial tubule system organization underlies heterogeneity of calcium dynamics in the right atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 322: H269–H284. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00381.2021>
24. Cros C, Douard M, Chaigne S, Pasqualin C, Bru-Mercier G, Recalde A, Pascarel-Auclerc C, Hof T, Haissaguerre M, Hocini M, Jaïs P, Bernus O, Brette F (2023) Regional differences in Ca²⁺ signaling and transverse-tubules across left atrium from adult sheep. *Int J Mol Sci* 24: 2347. <https://doi.org/10.3390/ijms24032347>
25. Wilson AJ, Schoenauer R, Ehler E, Agarkova I, Bennett PM (2014) Cardiomyocyte growth and sarcomerogenesis at the intercalated disc. *Cell Mol Life Sci* 71: 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1374-5>
26. Kanaporis G, Blatter LA (2015) The mechanisms of calcium cycling and action potential dynamics in cardiac alternans. *Circ Res* 116: 846–856. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305404>
27. Narayan SM, Franz MR, Clopton P, Pruvot EJ, Krummen DE (2011) Repolarization alternans reveals vulnerability to human atrial fibrillation. *Circulation* 123: 2922–2930. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.977827>
28. Muthavarapu N, Mohan A, Manga S, Sharma P, Bhanushali AK, Yadav A, Damani DN, Jais P, Walton RD, Arunachalam SP, Kulkarni K (2023) Targeted atrial fibrillation therapy and risk stratification using atrial alternans. *J Cardiovasc Dev Dis* 10: 36. <https://doi.org/10.3390/jcdd10020036>
29. Butova X, Myachina T, Simonova R, Kochurova A, Mukhlynina E, Kopylova G, Shchepkin D, Khokhlova A (2023) The inter-chamber differences in the contractile function between left and right atrial cardiomyocytes in atrial fibrillation in rats. *Front Cardiovasc Med* 10: 1203093. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1203093>
30. Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J (2002) Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 90: 1173–1180. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000022854.95998.5C>
31. Prabhu S, Voskoboinik A, McLellan A, Peck K, Nalliah C, Wong G, Azzopardi S, Lee G, Mariani J, Ling L, Taylor A, Kalman J, Kistler P (2017) A comparison of the electrophysiologic and electroanatomic characteristics between the right and left atrium in persistent atrial fibrillation: is the right atrium a window into the left? *Heart Lung Circ* 26: S176. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2017.06.304>

MECHANICAL ALTERNANCIES IN CARDIOMYCYTES OF THE MYOCARDIAL SLEEVES OF THE SUPERIOR VENA CAVA AND PULMONARY VEINS AS A POTENTIAL SOURCE OF ECTOPIC ACTIVITY OF THE ATRIA

T. A. Myachina^a, X. A. Butova^a, R. A. Simonova^a, A. M. Kochurova^a, G. V. Kopylova^a, A. D. Khokhlova^b, and D. V. Shchepkin^{a, #}

^a*Institute of Immunology and Physiology, Ural branch of Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

^b*Department of Biomedical Engineering, Washington University, St. Louis, MO, United States*

[#]*e-mail: dvshchepkin@gmail.ru*

The myocardium of the right and left atria (RA and LA) continues into the superior vena cava (SVC) and pulmonary veins (PV) and forms myocardial sleeves, which are sources of ectopic activity causing atrial fibrillation. We compared the sarcomere dynamics of single cardiomyocytes from the myocardial sleeves of the SVC and PV and guinea pig atria. SVC cardiomyocytes were characterized by a longer time to peak sarcomere shortening and time to 50% relaxation than cardiomyocytes of other groups. In cardiomyocytes of the SVC, PV and right atrium, there was no correlation between the amplitude of sarcomere shortening and the length of the cardiomyocytes. The sarcomere shortening alternans was found in cardiomyocytes of the SVC and PV. The mechanical alternans and the lack of correlation between the amplitude of the sarcomere shortening and the cell size in the myocardial sleeves of the SVC and PV may point to a mechanical substrate that provokes arrhythmia.

Keywords: myocardial sleeves, superior vena cava cardiomyocytes, pulmonary vein cardiomyocytes, sarcomere shortening-relengthening, mechanical alternans, atrial fibrillation