



Актовая речь заведующего кафедрой фундаментальной и прикладной физиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессора Камкина Андрея Глебовича

# МЕХАНОУПРАВЛЯЕМЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ, ПОТЕНЦИАЛЫ КЛЕТОК СЕРДЦА И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ



## MAX J. LAB

Вопрос о связи между механическими и электрическими явлениями в сердце был впервые сформулирован в 1968 году в работе М. J. Lab (рис.1) «Есть ли механическая обратная связь в сердце?».

Автор предположил следующее:

– В сердце существует электромеханическое сопряжение. Существует ли механоэлектрическая обратная связь?

– Если механоэлектрическая обратная связь существует, то механические изменения в миокарде могут приводить к изменению в нем электрических процессов.

– Механические факторы, модулирующие электрическую активность сердца – это растяжение миокарда и/или изменение его сократительной активности.

На основании собственных экспериментов, М. J. Lab и его научная группа предположили, что если механоэлектрическая обратная связь в сердце существует, то есть некий механизм, при котором механические изменения в миокарде приводят к изменению в нем электрических процес-

сов. В результате возникает, так называемая, «hump-like» механо-индуцированная деполяризация мембраны кардиомиоцитов (рис.2), которая, достигая порога, вызывает экстр-потенциалы действия, что ведет к различным нарушениям частоты и ритма сердечной деятельности.

Вместе с тем, долгие годы М. J. Lab пытался доказать наличие механоэлектрической обратной связи в сердце используя внеклеточные микроэлектроды, однако, точный ответ на вопрос о существовании этого механизма могли дать только прямые электрофизиологические эксперименты, заключающиеся в растяжении ткани сердца и одновременной регистрации при помощи микроэлектродной техники биопотенциалов клеток этой ткани.

## А. Г. КАМКИН

Впервые корректные доказательства наличия механоэлектрической обратной связи в сердце были сделаны в 1982 году (на сердечных фибробластах) и в 1984 году (на кардиомиоцитах) международной рабочей группой, которой ру-

ководил профессор А. Г. Камкин (рис.1).

Помимо кардиомиоцитов в сердце находятся немышечные клетки, 90% которых представляют собой сердечные фибробласты. В 1982 году впервые было показано, что фибробласты сердца представляют собой электроневозбудимые, но механосенситивные клетки.

На рис. 3 показаны синхронно зарегистрированные сила сокращений препарата правого предсердия крысы (верхняя кривая), потенциал действия кардиомиоцита (средняя кривая) и механоиндуцированный потенциал (МІР) фибробласта (нижняя кривая). Два последних биопотенциала были зарегистрированы при помощи пары микроэлектродов, находящихся на расстоянии друг от друга не более 50 мкм. Потенциал действия кардиомиоцита имеет типичную форму, овершут и амплитуду. МІР фибробласта заметно отличается от потенциала действия миокардиальной клетки. У этого потенциала другая форма, нет овершута и он начинается с задержкой относительно потенциала действия. Длительность МІР со-

## I. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

### 1.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ЯВЛЕНИЯ

Начало изучения механизмов механосенситивности клеток было положено в работах по изучению механоэлектрической обратной связи в сердце и ее механизмов тремя научными группами, лидерами которых были и остаются Max J. Lab (UK), Fred Sachs (USA) и Andre Kamkin (SU). В 60-х – 70-х годах прошлого столетия еще никто не предполагал, к каким важнейшим общепризнанным выводам придет наука в этом направлении.

Рис. 1

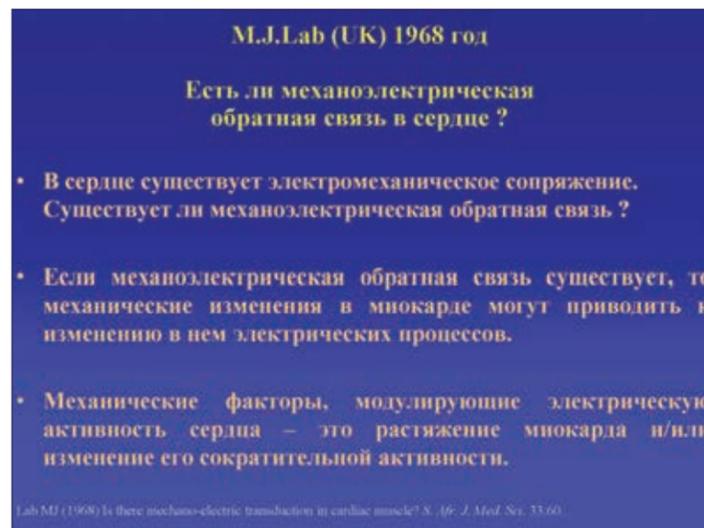




Рис. 2

ответствует длительности active force препарата предсердия.

В 1984 году в экспериментах на крысах было показано, что растяжение полоски правого предсердия здоровых животных до 2 mN вызывало небольшое укорочение APD50, но значительное увеличение APD90 (рис.4). Рисунок демонстрирует влияние длительного растяжения полоски миокарда здоровых крыс на потенциал действия на трех различных уровнях фазы реполяризации. Из рисунка следует, что в условиях растяжения ткани APD25 не изменялась, APD50 была укорочена, в то время как APD90 значительно увеличивалась. Увеличение APD90 было следствием развития hump-like механоиндуцированной деполаризации (stretch-induced depolarization - SID)

patch-пипетки на культивируемых эмбриональных скелетных мышечных клетках

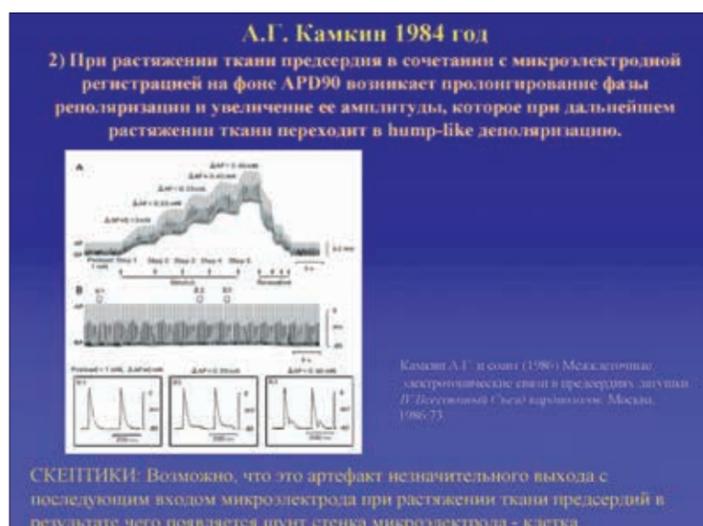


Рис. 4

цыпленка получил активацию специфических ионных каналов (рис.5), которые он на-

Sachs начал изучать одиночные MGCs разных клеток в конфигурации cell-attached и outside-out patch, а А. Г. Камкин сосредоточился на исследованиях связи МГ-токов и потенциалов клеток сердца, механосенситивными осцилляциями внутриклеточных ионов и регуляцией проводимости МГ-каналов.

### 1.2.1. ГРУППА F. SACHS, КАК ОСНОВОПОЛАГАЮЩАЯ, ДОСТИГЛА СЛЕДУЮЩИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 1984-1999 ГОДЫ

- (1) Открыты механоуправляемые ионные каналы
- (2) Показано, что каналы, реагирующие на изменение натяжения мембраны под patch-пипеткой – это ре-

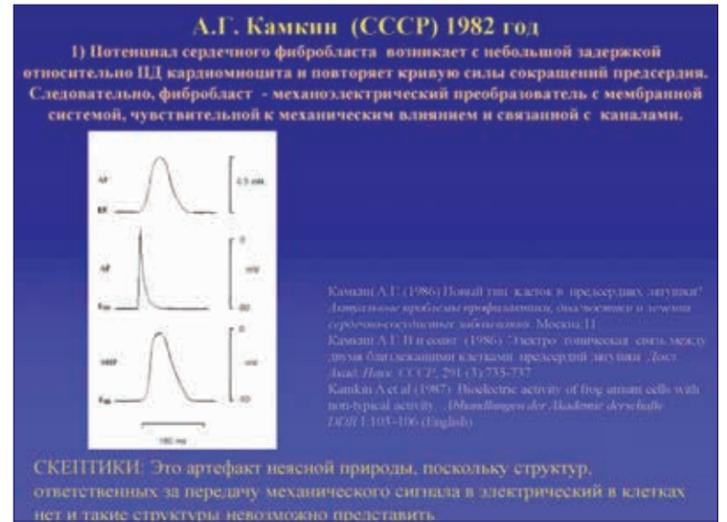


Рис. 3

Эффективность работ в этом направлении привела к созданию новых групп, изучающих молекулярную организацию MGCs. Это, например, группа В. Martinac и его последователи Р. Blount, S. Sukharev. Их область изучения стала – исследование структуры MGC на примере бактериальных каналов. Уже в период 1995-1999 годов авторы на примере некоторых бактериальных каналов определили принципиальную молекулярную организацию MGC, а к 2011 году была полностью определена структура бактериальных MGC (рис.6).

### 1.2.2. Группа А. Камкина, как основополагающая, достигла следующих результатов

Интересы лежали в области исследования суммарных МГ-токов через мембрану в конфигурации whole-cell, исследовании механоиндуцированных потенциалов в конфигурации whole-cell, исследовании механоиндуцированных потенциалов ткани микроэлектродной техникой, исследовании осцилляций внутриклеточных катионов и выход на функцию каналов в органе.

#### 1984-1999 ГОДЫ

- (1) Растянуты изолированные кардиомиоциты и экспериментально доказано возникновение МГ-токов при растяжении клеток.
- (2) Показана связь МГ-токов с механоиндуцируемы-

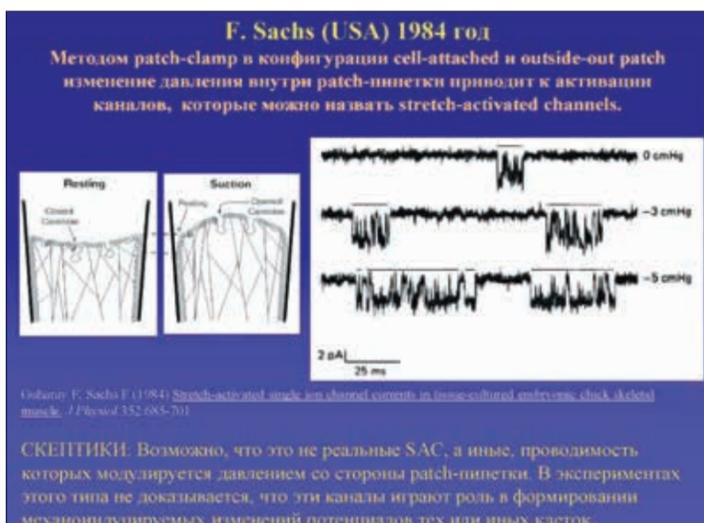


Рис. 5

и было результатом растяжения клеток миокарда.

Дальнейшее увеличение растяжения ткани, превышающее 2 mN, вызывало появление дополнительных «экстра» потенциалов действия. Экстра потенциалы действия возникали исключительно на фоне SID. При этом амплитуда каждого экстра потенциала была уменьшена, что совершенно типично для любого экстра потенциала действия на фоне деполаризации мембраны.

### FRED SACHS

В 1984 году F.Sachs (рис.1) совершенно новым для того времени методом patch-clamp в конфигурации cell-attached на фоне абсолютно случайно изменения давления внутри

звал stretch-activated channels (SAC). Позднее эти каналы были названы mechanically gated channels (MGCs).

На кардиомиоцитах желудочков MGCs впервые описал в 1988 году W. Craelius (США), и к настоящему времени они обнаружены у кардиомиоцитов во всех отделах сердца.

1.2. Принципиальные достижения, полученные лидирующими группами, при формировании представлений о MGCs, их токах и связи с потенциалами

Сфера деятельности между лидерами направлений в итоге разделилась. Max J. Lab занялся клиническими исследованиями, поскольку его лаборатория не имела современных технологий. Fred

альные mechanically gated channels (MGC).

(3) Изучены электрофизиологические свойства MGC практически всех клеток. [Sachs F, Morris CE (1999) Mechanosensitive ion channels. Rev.Physiol. Biochem. Pharmacol. 132: 1 – 77]

#### 2000-2014 ГОДЫ

(4) Показано, что K2P каналы – MGC.

[Honore' E, Patel AJ, Chemin J, Suchyna T, Sachs F. (2006) Desensitization-mechano-gated K2P channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(18):6859-6864]

(5) Показана механосенситивность ряда потенциалуправляемых и лигандуправляемых ионных каналов.

[Beyder A, Rae JL, Bernard C, Strey PR, Sachs F, Farrugia G. (2010) Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. J Physiol. 2010 588(Pt 24):4969-4985]

Эти каналы были идентифицированы и оказались MGCs (рис.7).



Рис. 6

ми изменениями потенциалов клеток.

(3) У клеток гипертрофированного миокарда наблюдается экспрессия MGC, что, например, в сердце, объясняет механизм механоиндуцированных аритмий.

[Kamkin A. et al (2000) Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy. Cardiovasc.Res. 48: 409-420].

[Kamkin A. et al (2000) Mechano-electric feedback in right atrium after left ventricular infarction in rats. J.Mol.Cell. Cardiol. 32: 465-477]

[Kamkin A. et al (2003) Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical

deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 57(3):793-803].

### 1982-1999 ГОДЫ

(4) Сердечные фибробласты – механоэлектрические преобразователи.

[Kamkin A et al. (1992) Mechanosensitive cells in the atrium of frog heart. *Exp Physiol* 77(1):213-216].

(5) Растянуты изолированные фибробласты и экспериментально доказано возникновение MG-токов.

[Kamkin A et al. (2003) Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 57(3):793-803].

(8) Найдена возможность целенаправленного изменения проводимости MGC.

[Kazanski VE et al (2010) The role of the Nitric Oxide in regulation of mechanically gated channels activity in cardiomyocytes: Investigation by means of the application of NO-donors. *BEBM* 7:4-9].

[Kazanski VE et al (2010) The role of the Nitric Oxide in regulation of mechanically gated channels activity in cardiomyocytes: Investigation of NO-synthetases contribution. *BEBM* 8:228-232].

[Abramochkin DV, Kuzmin VS, Mitrochin VM, Kalugin L, Dvorzhak A, Makarenko EY, Schubert R, Kamkin A.(2013) TNF- $\alpha$  provokes electrical abnormalities in rat atrial myocardium via a NO-



Рис. 8

(6) Установлено межклеточное взаимодействие фибробластов и кардиомиоцитов и сформулирована теория их совместной работы в норме и патологии.

[Kamkin A et al. (1994) Mechanosensitive fibroblasts in the sino-atrial node region of rat heart: interaction with cardiomyocytes and possible role. *Exp Physiol* 79(6):943-956].

### 2000-2014 ГОДЫ

(7) Впрямую установлена связь MGC с MG-токами и потенциалами клеток, т. е. решена основная проблема комплексной работы клеток.

[Kamkin A. et al (2010) Single mechano-gated channels activated by mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts from rats. *Acta Physiol (Oxf)* 199(3):277-292]

dependent mechanism. *Pflugers Arch*. 2013 Dec;465(12):1741-52].

[Abramochkin DV, Lozinsky IT, Kamkin A (2014) Influence of mechanical stress on fibroblast-myocyte interactions in mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol*. S0022-2828(13) 00369-6].

Помимо статей, с 2005 года лидерами направлений было издано 9 книг (рис.8), из них: F. Sachs – 1, B. Martinak – 1, A. Kamkin – 7.

Все работы группы вызвали и вызывают несомненный интерес мирового научного сообщества. Примеры цитируемости статей нашей группы другими авторами представлены на рис. 9.

Многие наши учебники и монографии, в которых обсуждались научные достижения рабочей группы, были изданы и в России. Примеры представлены на рис.10.

Рис. 11

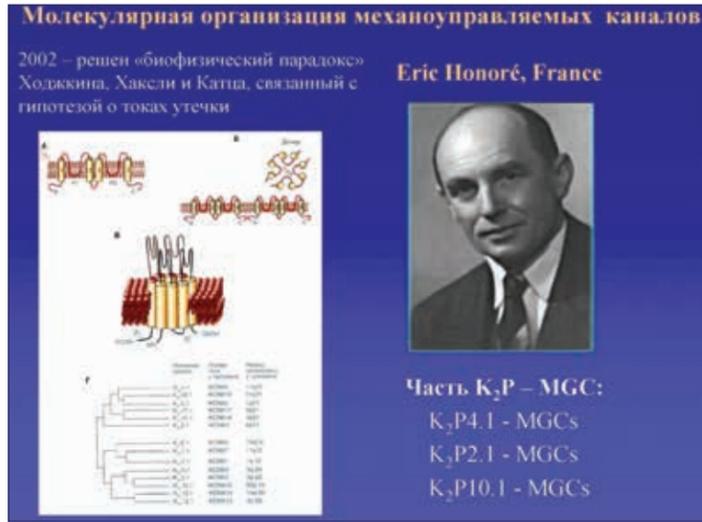


Рис. 7

## II. ОСНОВНЫЕ ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ ГРУППОЙ А. Г. КАМКИНА

Рисунок 11 демонстрирует направление исследований рабочей группы.

### 2.1. МЕХАНОИНДУЦИРОВАННЫЕ ТОКИ И ПОТЕНЦИАЛЫ КАРДИОМИОЦИТОВ

Эксперименты выполнены на сердцах лягушек, мышей, крыс, морских свинок, человека. Млекопитающие были как в здоровом, так и в патологическом состоянии.

В нормальном растворе Тироде с использованием patch-clamp в конфигурации whole-cell изолированные кардиомиоциты здорового желудка морской свинки отвечают на растяжение изменением



Рис. 10

величины потенциала покоя и длительности потенциала действия. Показано, что растяжение на 2 мм и 4 мм не меняет величину потенциала покоя и форму ПД кардиомиоцитов. Растяжение на 6 мм деполяризует покоящуюся мембрану в среднем на 3 мВ (рис.12,А), а растяжение на 8 мм деполяризует в среднем на 6 мВ (рис.12,Б). Растяжение на 8 мм удлиняют средние значения APD90 от 360 ms до 502 ms. Кроме того, растяжение на 8 мм и, далее, на 10 мм запускает экстр-ПД, которые начинаются от диастолической деполяризации.

На рис.13 А, Б, В, Г показано, что растяжение клетки здорового сердца на 6 мм вызывало появление входящего

через MGCs тока величиной 0.16 nA и дальнейшее увеличение растяжения до 8 мм,



Рис. 9

10 мм, 12 мм вызывало увеличение этого тока до 0.48 nA, 0.80 nA, 1.44 nA, соответ-

ственно. Растяжение клеток здорового сердца на 2 мм и 4 мм не приводило к какой ли-

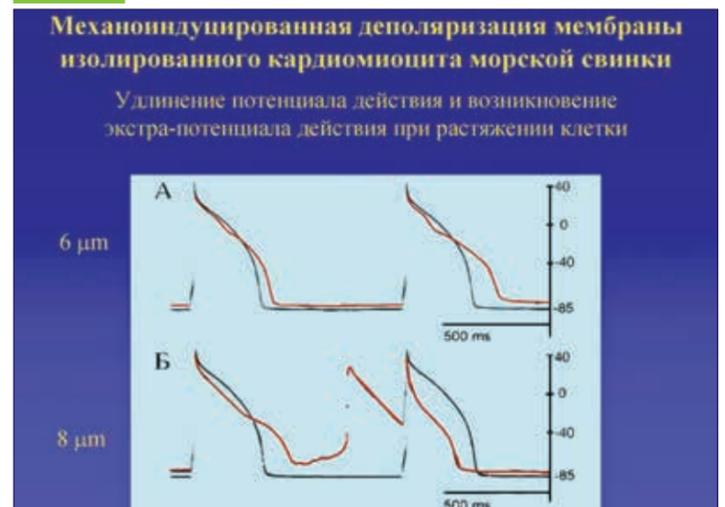
бу реакции со стороны MGCs. У растянутой до определенного значения клетки, IMGCs был постоянным в течение нескольких минут регистрации, то есть инактивация или адаптация не наблюдалась. Отсутствие инактивации MGCs в течение длительного растяжения было и у кардиомиоцитов, полученных от больных сердец.

Модуляция растяжением вольт-амперной характеристики позднего тока (П) клетки приведена на рис.14. До растяжения (белые треугольники, объединенные кривой), кривая имела типичную N-образную форму и пересекала ось потенциала при  $E_0 = -74$  mV, что соответствует потенциалу покоя клетки в условиях типичных растворов внешней и внутренней среды. Растяже-

ние клетки на 4 мм смещает величину позднего тока в более негативную область, а мембранный потенциал до  $-70$  mV, то есть в более позитивную область (черные треугольники, объединенные кривой). Растяжение до 10 мм смещает вольт-амперную характеристику клетки при негативных потенциалах еще в большую отрицательную область (красные треугольники, объединенные кривой) и деполяризует мембрану до  $-35$  mV. Значительное растяжение в 12 мм, практически устраняет N-образную форму вольт-амперной характеристики увеличивая входящий ток в негативной области и деполяризуя мембранный потенциал до  $-20$  mV (квадраты, объединенные кривой).

Таким образом, и на клетках предсердий, и на клетках желудочков был выявлен базовый мембранный неселективный катионный ток ISAC,

Рис. 12



**Ток, протекающий через MGC, увеличивается при увеличении растяжения изолированного кардиомиоцита здорового сердца**

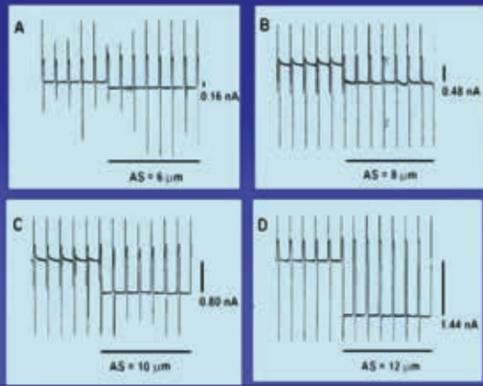


Рис. 13

который увеличивался при увеличении степени прямого растяжения клетки и уменьшался вплоть до полного исчезновения при снятии растяжения с клетки. Дальнейшие исследования были посвящены разделению этого базового тока ISAC на компоненты.

При растяжении клеток с использованием внутриклеточного имиджинга были получены данные о внутриклеточных осцилляциях ионов натрия в контрольных условиях и при растяжении кардиомиоцитов, в качестве базовых данных для продолжения работ в этой области.

Пример увеличения осцилляций внутриклеточного натрия при растяжении клетки на 4 мкм. 2G1 – контроль. 2G2 – растяжение клетки на 2 мкм (рис.15). Увеличение количества красной зоны свидетельствует об увеличе-

растяжения (1-5) препарата до 1,75 мН. Второй потенциал возникает при дости-

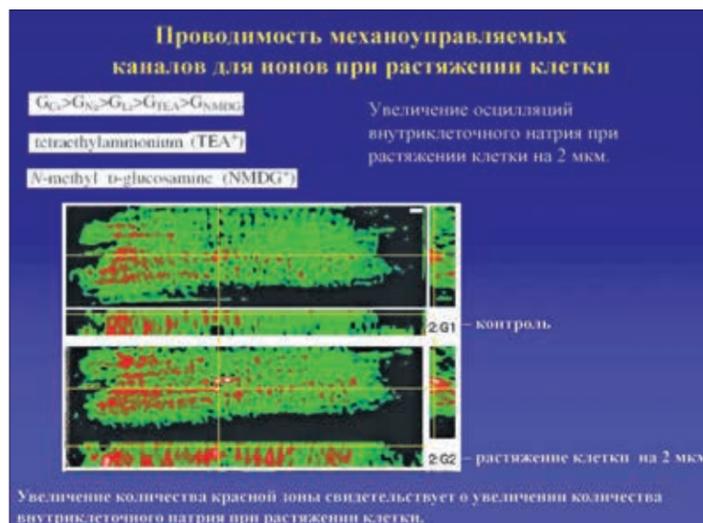


Рис. 15

жения SID критического уровня деполяризации ( $E_c = -66.6$  мВ).

появляется в течение рефрактерного периода потенциала действия, и она приводит к появлению экста потенциалов в более поздние сроки.

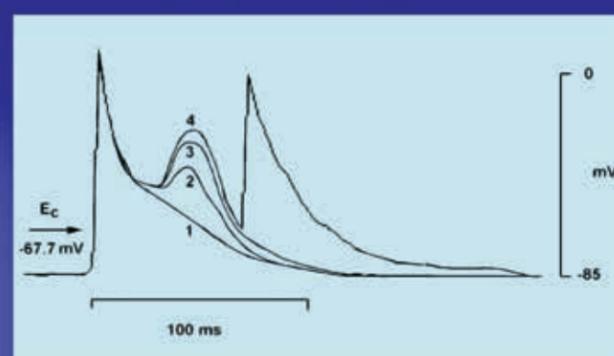
Аналогичным образом развивается динамика появления одного экста потенциала действия в правом предсердии крысы, перенесший инфаркт миокарда, при увеличении степени растяжения (1-4) препарата только до 0.2 мН.

Рис.19 показывает связь между SID на уровне APD90 и степенью растяжения препарата ткани сердца после инфаркта миокарда. Рис.19,А демонстрирует потенциалы действия, зарегистрированные при стандартном прерастяжении препарата, равном 1мН. Хотя небольшое растяжение препарата

(до 0.2 мН) в контрольной группе не вызывало SID, тот же самый уровень растяжения у животных после инфаркта миокарда вызывал появление SID (рис.19,Б). Более того, увеличение растяжения вызывало SID, которая развивалась в дополнительные потенциалы действия (рис.19,В). В этом случае экста потенциалы имели уменьшенную амплитуду потенциала действия, как это и ожидается при частично деполяризованной мембране. Растяжение препарата не изменяло APD25, APD50 была минимально укорочена в каждом эксперименте, в то время как APD90 была значительно увеличена. Необходимо подчеркнуть, что наблюдаемые изменения потенциалов в группе животных с инфарктом миокарда наступали при значительно меньшей степени растяжения препарата (0.2 мН) по сравнению с кон-

Рис. 18

**Динамика появления SID на уровне APD50 и ее роль в формировании экста-потенциала действия при различных степенях (2-4) растяжения препарата на 1.75 ± 0.04 мН**



**Модуляция базового мембранного тока изолированного кардиомиоцита под действием растяжения клетки**

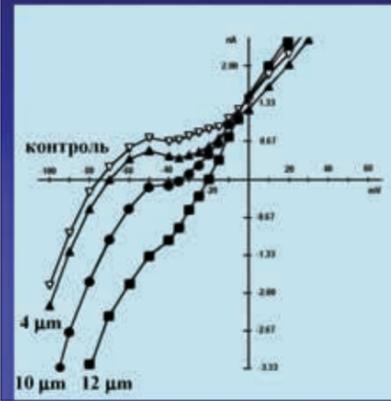


Рис. 14

тролем (2 мН). Увеличение в APD90 было следствием появления SID.

Дальнейшее растяжение, но опять значительно меньшее по величине, чем в группе здоровых животных, вызывало фибрилляцию (рис.20). Возвращение к исходной длине препарата демонстрировало полное исчезновение этих механозависимых изменений (рис.19,Г).

Как было показано выше, у изолированных кардиомиоцитов здорового сердца амплитуда ISAC увеличивалась с увеличением растяжения клеток. У клеток больных людей растяжение кардиомиоцита на 2 мм вызывало ISAC, равный примерно -116 pA, а растяжение клетки на 4 мм вызывало ISAC, равный -483 pA (рис.21).

Для сравнения, у кардиомиоцитов молодых и здоровых морских свинок ISAC вообще не возникал при растяжении

ли у всех исследуемых клеток. На растяжение величиной 6 мм клетки отвечали возникновением ISAC величиной до -300 pA, при растяжении на 8 мм ISAC был равен около -557 pA, а при растяжении на 10 мм ISAC был равен в среднем -1050 pA (рис.21).

Таким образом, кардиомиоциты больных людей имеют несравнимо большую чувствительность к растяжению, чем кардиомиоциты здоровых морских свинок. Высокая чувствительность к растяжению клеток больных людей может быть объяснена за счет гипертрофии, которая возникает в течение заболевания и экстрессии SAC.

Чтобы проверить связана ли чувствительность кардиомиоцитов к растяжению с вентрикулярной гипертрофией, изучали эффект растяжения клеток, полученных от здоровых молодых крыс, здоровых

**Два типа механоиндуцированных потенциалов (SID) на уровне APD90 (А) и на уровне APD50 (Б), которые возникают у кардиомиоцитов при растяжении ткани предсердия на фоне растяжения препарата на 1.75 ± 0.04 мН от 1 мН прерастяжения**

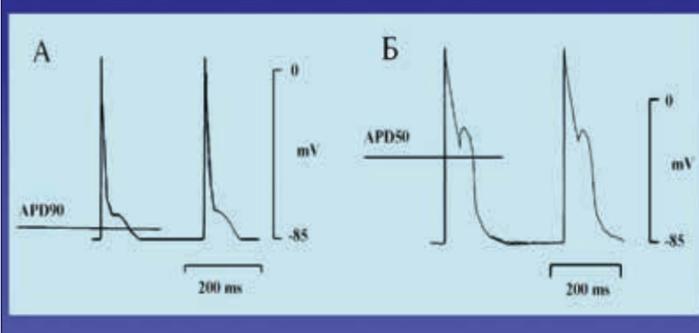


Рис. 16

нии количества внутриклеточного натрия при растяжении клетки.

После инфаркта миокарда в предсердиях обнаруживаются два типа потенциалов действия (рис.16). Первый тип удлиненных потенциалов действия оказался подобным по величине APD25 и APD50 потенциалам действия контрольной группы, но был значительно удлинен на уровне APD90 (рис.16,А). Второй тип показывал значительное увеличение в APD25, APD50 и APD90 по сравнению с контролем (рис.16,Б).

На рис.17 представлена динамика развития одного экста потенциала действия в правом предсердии крысы при увеличении степени

Аналогичным образом развивается динамика появления одного экста потенциала действия в правом предсердии крысы, перенесший инфаркт миокарда, при увеличении степени растяжения (1-5) препарата только до 0.2 мН.

На рис.18 представлена динамика развития одного экста потенциала действия кардиомиоцита правого предсердия инфарктной крысы при увеличении степени растяжения (1-4) препарата до 1,75 мН. Второй потенциал возникает после окончания периода абсолютной рефрактерности клетки при достижении в этот период SID критического уровня деполяризации ( $E_c = -67.7$  мВ). SID, которая развивается на уровне APD50,

**Динамика появления SID на уровне APD90 и ее роль в формировании экста-потенциала действия (5) при различных степенях (2-4) растяжения препарата на 1.75 ± 0.04 мН**

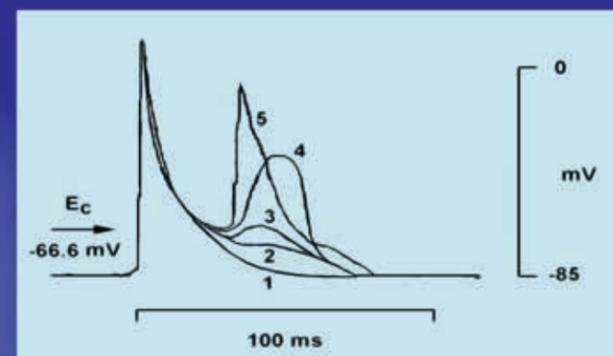


Рис. 17

на 2 мм и на 4 мм. При дальнейшем увеличении степени растяжения ISAC реагирова-

старых крыс и также от старых спонтанно гипертонивных животных (рис.21). У гипертонивных крыс не было симптомов сердечной недостаточности, однако, их сердца были гипертрофированы. Растяжение кардиомиоцитов желудочков молодых крыс (3 месяца) на 2 мм и 4 мм не приводило к появлению ISAC. При дальнейшем увеличении степени растяжения клетки ISAC регистрировали у всех исследованных клеток. Так, растяжение кардиомиоцита на 8 мм индуцирует входящий ток величиной примерно равной -269 pA (при поддерживаемом потенциале -45 мВ). Аналогичное растяжение на 8 мм кардиомиоцитов желудочков здоровых старых

крыс (15 месяцев) вызывает значительно больший ISAC, равный около -460 pA. А растяжение кардиомиоцитов желудочков старых крыс (15 месяцев) со спонтанной гипертензией вызывает ISAC, среднее значение которого равно -420 pA уже при растяжении клетки на 2 мкм. У этих же животных растяжение клеток на 4 мкм вызывало ISAC, равный -1205 pA, а на 6 мкм ISAC, равный -1500 pA.

Изменения показывают, что чувствительность клеток к растяжению увеличивается с гипертрофией (рис.22), которая развивается в течение возраста, но сильнее с гипертензией. Чувствительность к растяжению, определенная для клеток больных челове-

ческое растяжение (на 10-12 мкм).

— Этот ток создает общую деполяризацию и увеличение APD90 и APD50 как по длительности, так и по амплитуде.

— Гипертрофированный миокард, например, вследствие постинфарктного ремоделинга, реагирует появлением экстра-потенциалов действия с последующей аритмией на крайне малое растяжение

— Кардиомиоцит большого сердца реагирует выраженным увеличением входящего Na-тока через MGC даже на незначительное его растяжение вследствие увеличения экспрессии каналов при ремоделинге и возрастной или иной гипертензии.

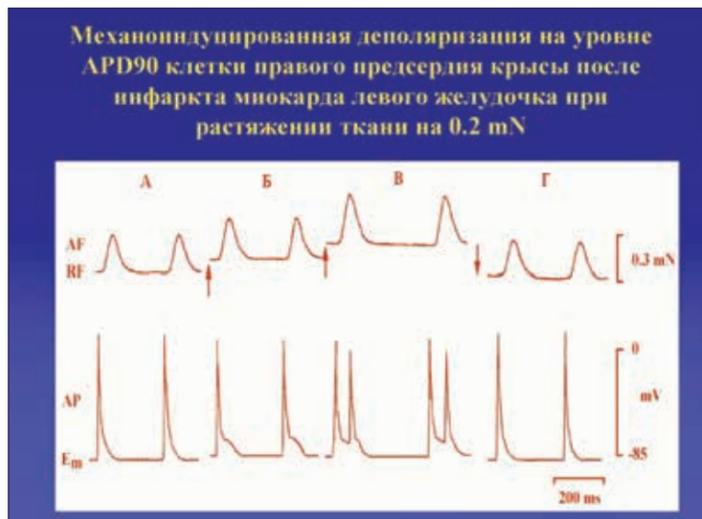


Рис. 19

шей, крыс, морских свинок, человека. Млекопитающие были как в здоровом, так и в патологическом состоянии.

Исследования ионных токов, текущих через мембрану изолированных сердечных фибробластов в покое, при растяжении и при сжатии клеток, были выполнены при помощи метода patch-clamp в конфигурации whole-cell и cell-attached. Для механического воздействия на фибробласт использовалась та же методика, что и при исследовании кардиомиоцитов.

Изолированные фибробласты имеют емкость мембраны, равную  $18 \pm 3$  pF. Сопротивление их мембраны равно  $514 \pm 11$  MW. Как было показано в предыдущих разделах, фибробласты в сердечной ткани имеют значительные различия в величинах мембранного по-

На рис.25,Б (верхняя панель) показана реакция фибробласта на его сжатие на 2 мкм по

клетки были похожи на токи в отсутствии механической деформации только в плане их развития во времени. Их амплитуды, однако, были выражено увеличены (сравните, например, наибольший ток в ответ на деполяризационный импульс до +50 mV между рис. 25,А и 25,Б). Увеличение мембранных токов под действием сжатия клетки сохранялось до тех пор, пока это сжатие поддерживалось, т.е. не было признаков адаптации. Когда механическая деформация прекращалась, токи возвращались к контрольным значениям менее, чем за 0.5 сек. Введение в перфузионную камеру  $Gd^{3+}$  в концентрации 8 mM устраняет смещение поддерживаемого тока и ингибирует токи, возникаю-



Рис. 20

ческих сердец, была сходной с величиной, полученной у кардиомиоцитов от спонтанно гипертензивных старых крыс. В целом, результаты демонстрируют, что чувствительность кардиомиоцитов к растяжению увеличивается с возрастом и крайне высока при гипертрофии сердца.

## РЕЗЮМЕ I

— Здоровый миокард реагирует на максимальное физиологическое растяжение только незначительной деполяризацией и изменением фазы реполяризации потенциала действия на уровне APD90 и APD50; редко одиночными экстра-потенциалами.

— Кардиомиоцит здорового сердца реагирует выраженным увеличением входящего Na-тока через MGC только на его максимальное физиологи-

## 2.2. МЕХАНИЗМ МЕХАНОИНДУЦИРОВАННЫХ АРИТМИЙ

### ВАЖНО

— Если принять во внимание наличие в сердце только такого механизма, реализуемого через кардиомиоциты, то совершенно очевидно, что несовместимыми с жизнью были бы не только любые патологии сердца, связанные с ремоделингом, но и занятия профессиональным спортом из-за гипертрофии миокарда и даже возраст старше 25 лет (рис.24). Поэтому, возвращаясь к рис.11, мы рассматриваем вторую систему сердца — сердечные фибробласты.

## 2.3. МЕХАНОИНДУЦИРОВАННЫЕ ТОКИ И ПОТЕНЦИАЛЫ ФИБРОБЛАСТОВ СЕРДЦА

Эксперименты выполнены на сердцах лягушек, мы-

## Зависимость механосенситивного тока от растяжения кардиомиоцитов из сердец в норме и при патологии

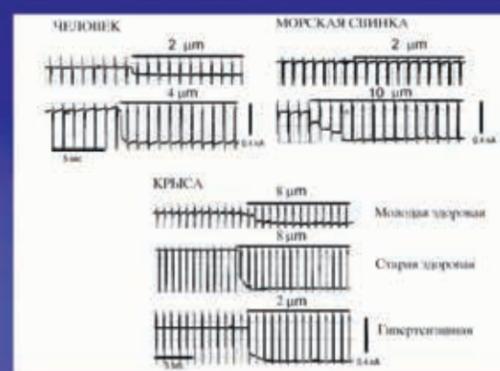


Рис. 21

сравнению с контрольной регистрацией, представленной на рис.25,А.

щие на фоне деполяризационных и гиперполяризационных импульсов (рис. 25,В).

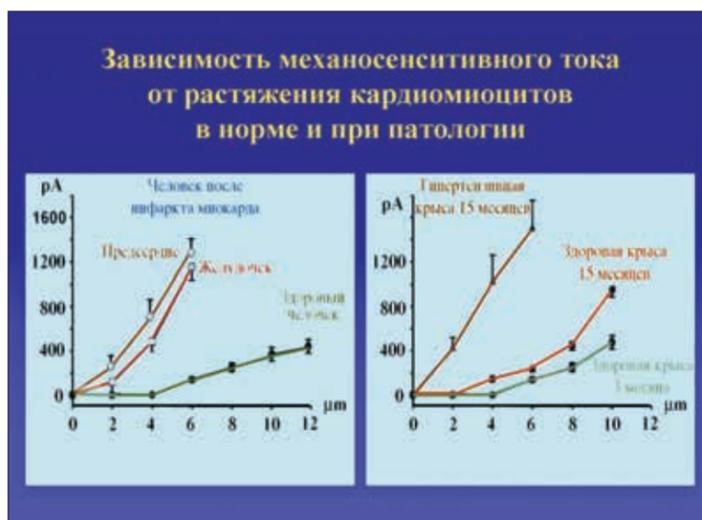


Рис. 22

тенциала (от -70 mV до -10 mV), что определяется их состоянием в ткани с позиций механической деформации. Однако, изолированные клетки не имеют выраженного разброса значений потенциала покоя. Показано, что I-V кривые, отражающие II, пересекают ось потенциала, причем точка пересечения, соответствующая потенциалу покоя, равна  $-37 \pm 3$  mV.

## СЖАТИЕ ФИБРОБЛАСТОВ УВЕЛИЧИВАЕТ МЕМБРАННУЮ ПРОВОДИМОСТЬ

При горизонтальном сжатии клетки поддерживаемый ток при поддерживаемом потенциале, равном -45 mV, становится отрицательным.

Токи, индуцированные деполяризационными импульсами, на фоне сжатия

## РАСТЯЖЕНИЕ УМЕНЬШАЕТ ПРОВОДИМОСТЬ МЕМБРАНЫ ФИБРОБЛАСТОВ

Для осуществления растяжения клеток применяли аксиальное растяжение. Рис.25 (нижняя панель) демонстрирует токи, которые были зарегистрированы в контрольных экспериментах у недеформированной клетки (рис.25,А), в экспериментах при растяжении клетки на 2 мкм (рис.25,Б) и в экспериментах с добавлением 8 mM  $Gd^{3+}$  на фоне длящегося стабильного растяжения фибробласта или фрагмента его мембраны (рис.25,В). Во-первых, из рисунка следует, что растяжение клетки сдвигает ток, регистрируемый при поддерживаемом

Рис. 24

Несовместимыми с жизнью были бы не только любые патологии сердца, связанные с ремоделингом, но и занятия профессиональным спортом из-за гипертрофии миокарда и даже возраст старше 25 лет.

Каков физиологический механизм компенсации последствий патологической деполяризации кардиомиоцитов?

### Ответ на вопрос:

принципы работы фибробластов как механо-электрических преобразователей и их межклеточного взаимодействия с кардиомиоцитами.

Рис. 23



потенциале, в позитивное направление (начало у рис.25,Б по сравнению с началом у рис.25А). Во-вторых, растяжение клетки уменьшает амплитуду токов по сравнению с контролем, как при применении деполяризующих, так и гиперполяризующих смещений потенциала относительно поддерживаемого потенциала, хотя их временная зависимость остается той же самой.

Таким образом, растяжение клетки приводит к уменьшению проводимости мембраны. Перфузия 8 mM Gd<sup>3+</sup> вызывает дальнейшее уменьшение токов через мембрану и сдвигает ток, регистрируемый при поддерживаемом потенциале, в еще более в позитивное направление.

3 μm смещает E<sub>0</sub> от -35 mV до -30 mV (рис.26А, черные треугольники, верхняя панель) и ведет к увеличению I<sub>L</sub> (I<sub>ci</sub> = -0.12 nA). Устранение этой деформации ведет к полному восстановлению I<sub>L</sub> (рис.26, Б, верхняя панель), а следующее за этим растяжение на 3 μm ведет к сдвигу E<sub>0</sub> от -35 mV до -60 mV (рис.26, В, черные треугольники, верхняя панель). Растяжение меняет I<sub>L</sub> (I<sub>strg</sub> = 0.12 nA). Этот эффект также обратим.

Рис.26,А (нижняя панель) демонстрирует влияние Gd<sup>3+</sup> (рис.26,А, черные квадраты) на I<sub>L</sub> сжатой клетки (рис.26,А, черные треугольники). А рис.26,Б (нижняя панель) демонстрирует влияние Gd<sup>3+</sup> (рис.26,Б, черные квадраты) на I<sub>L</sub> растянутой клетки

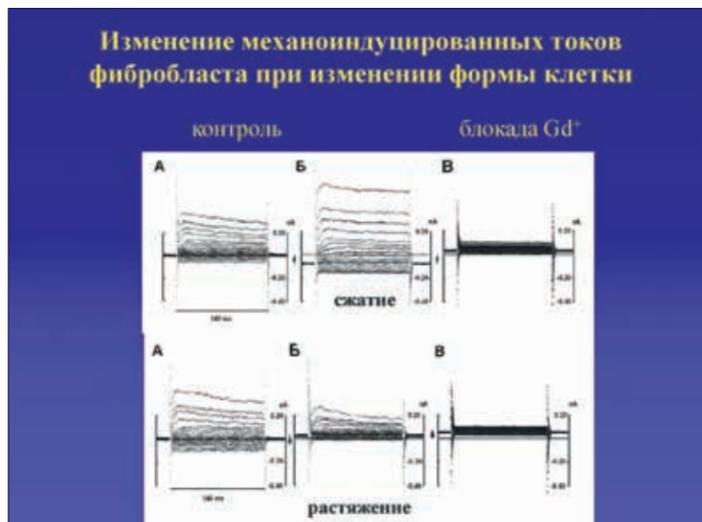


Рис. 25

Полученные результаты свидетельствуют, что фибробласты сердца не только обладают механочувствительностью, но и неселективная катионная проводимость Gns их мембраны определяется направлением приложенной силы – растяжением или сдавливанием клетки. Растяжение клетки инактивирует Gns, а сдавливание клетки активирует Gns сердечных фибробластов. Активация Gns и деполяризация мембраны изолированных фибробластов под влиянием их сдавливания совпадает с реакцией фибробластов целого сокращающегося сердца или его фрагмента в виде возникающих МПР.

Искусственное растяжение ткани спонтанно сокращающегося фрагмента правого предсердия приводит к вероятному растяжению клетки и, следовательно, к гиперполяризации мембраны

кривая). Символ (↑) показывает моменты растяжения препарата, а символ (↓) –

Е<sub>m</sub> – величина мембранного потенциала).

Поскольку блокатор механосенситивных каналов (МСК) гадолиний блокирует МПР, вызванные как спонтанными сокращениями препарата, так и его искусственным растяжением, было предположено, что МПР определяется работой МСК. В последующих работах было показано, что механическая энергия стимуляции передается на МСК при помощи цитоскелета, поскольку вещества, деполимеризующие белки микрофиламентов и микротрубочек, ингибировали амплитуду МПР.

Реакция фибробласта предсердия здоровой крысы принципиально отличается от реакции фибробласта

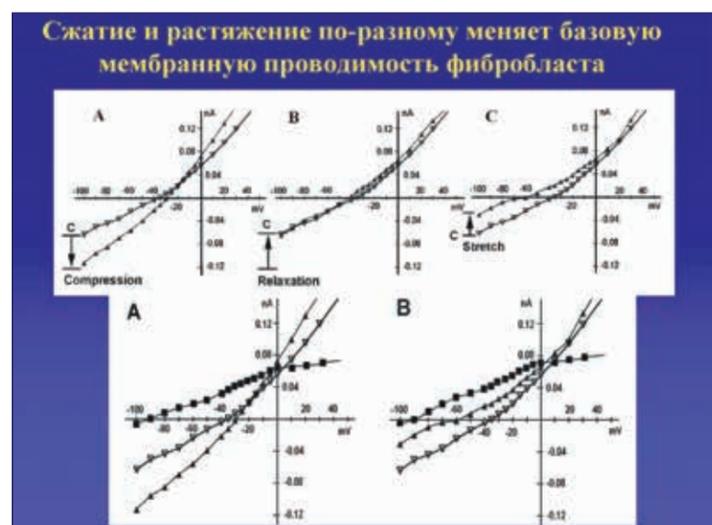


Рис. 26

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛЬТ-АМПЕРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НА ФОНЕ СЖАТИЯ И РАСТЯЖЕНИЯ КЛЕТКИ**

Токи, регистрируемые в течение последних 10 ms (I<sub>L</sub>) на фоне каждой из ступенек электрических импульсов длительностью 140 ms, были отложены по отношению к величине потенциала каждой ступеньки. Результирующая I-V кривая аномального выпрямления с током выходящего направления (рис.26А, белые треугольники, верхняя панель) в контроле пересекала ось потенциала при -35 mV (E<sub>0</sub> = -35 mV). Рис.26 (верхняя панель) демонстрирует основной эффект сжатия клетки, устранения этой деформации и последующего растяжения клетки, причем все данные зарегистрированы на одном изолированном фибробласте. Сжатие на

(рис.26,А, черные треугольники).

Исследования, выполненные на свежееизолированных фибробластах сердца, полностью подтвердили чувствительность их мембраны к механическому воздействию, которое выражается в изменении потенциала мембраны фибробласта. Эти эксперименты полностью подтвердили данные, полученные в исследованиях на многоклеточных препаратах с помощью микроэлектродного метода регистрации. Представленные данные демонстрируют, что у сердечных фибробластов механически вызванные изменения мембранного потенциала (МПР) обусловлены механической модуляцией единичной канальной проводимости (рис.27). Эта проводимость должна быть неселективной катионной проводимостью (Gns).

Рис. 29

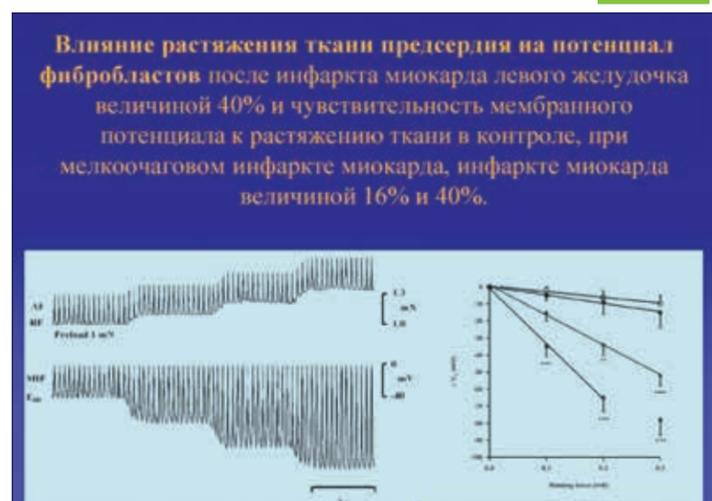


Рис. 28

ны фибробласта, что, соответственно, увеличивает амплитуду МПР тем больше, чем большую величину имеет механоиндуцированная гиперполяризация клетки (рис.5.1.9). Хотя в ряде случаев при растяжении ткани наблюдается и деполяризация мембраны некоторых фибробластов, которая, вероятно, связана со сжатием данной исследуемой клетки.

На рис.28 показана специфическая реакция фибробласта предсердия крысы на растяжение ткани при постоянной величине мембранного потенциала. Синхронная регистрация механограммы (верхняя кривая) и механоиндуцированных потенциалов фибробласта (нижняя

active force, RF – resting force, МПР – механоиндуцированный потенциал фибробласта,

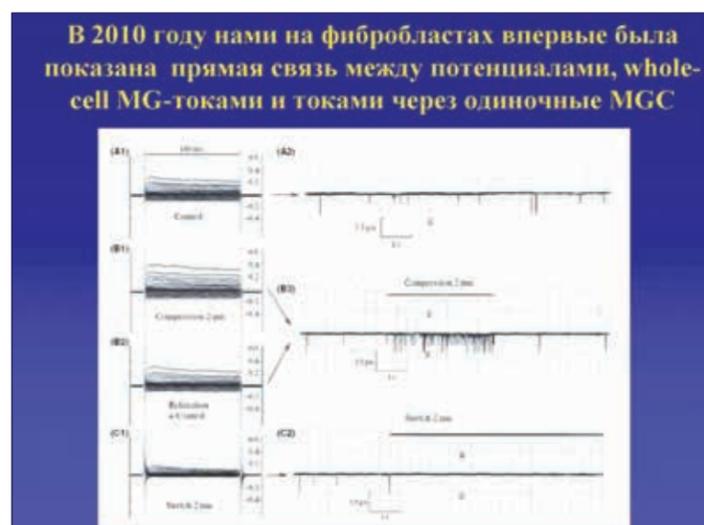


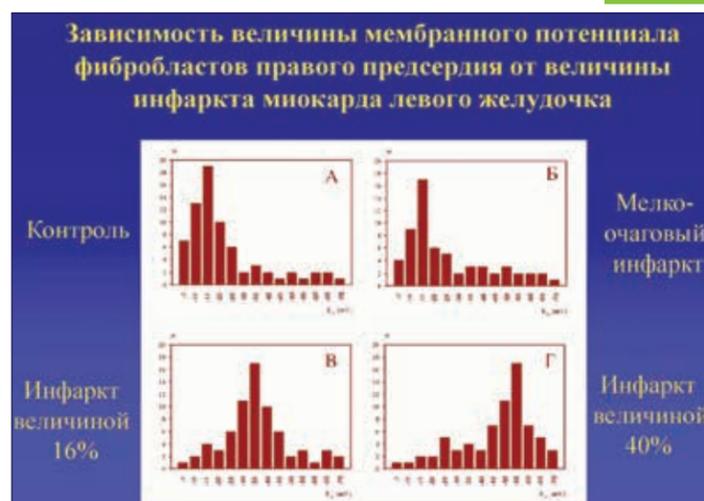
Рис. 27

момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню (AF –

предсердия крысы, перенесшей инфаркт миокарда левого желудочка (рис.29,А). На этом рисунке представлена оригинальная кривая реакции фибробласта правого предсердия крысы, перенесшей обширный инфаркт миокарда левого желудочка (40%, 20 дней) на длительное искусственное растяжение ткани. Реакция на растяжение ткани была несоизмеримо более выражена в ткани, подверженной ремоделингу. Растяжение ткани только на 0,3 mN приводило к смещению мембранного потенциала фибробласта до -100 mV.

Данные для всех групп экспериментальных животных представлены на (рис.29,Б.) В контрольных экспериментах растяжение ткани до 0.3 mN вызывало незначительное увеличение мембранного потенциала на

Рис. 30



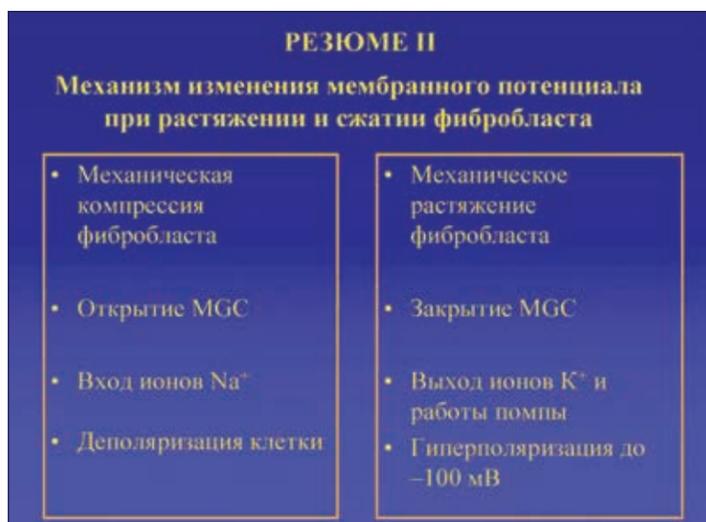


Рис.31

$-10 \pm 5$  мВ (белые кружочки). После мелкоочаговых инфарктов растяжение ткани до  $0.3$  мN вело к увеличению мембранного потенциала на  $-15 \pm 9$  мВ (черные кружочки). Если величина инфаркта равнялась примерно 16%, то фибробласты предсердия демонстрировали значительное увеличение мембранного потенциала, которое составляло  $-52 \pm 6$  мВ (черные треугольники). Реакция фибробластов на растяжение ткани на  $0.3$  мN в группе животных с обширным инфарктом, который занимал примерно 40% передней стенки левого желудочка, заключалась в увеличении мембранного потенциала на  $-78 \pm 9$  мВ (черные квадраты).

Смещение мембранного потенциала фибробласта в сторону гиперполяризации было тем большим, чем больше была зона инфаркта

говым) имели мембранный потенциал, равный  $-22.0 \pm 1.9$  мВ и  $-25.8 \pm 2.3$  мВ соответ-

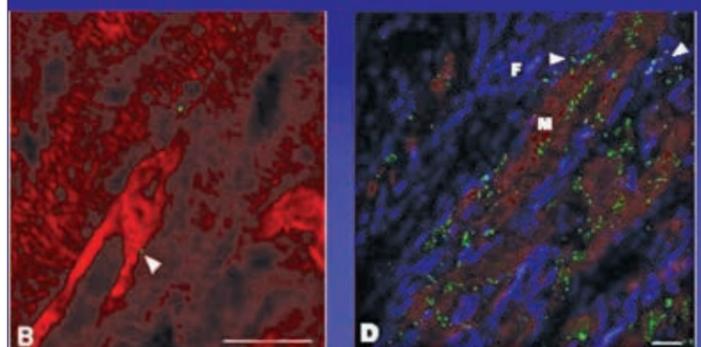


Рис. 33

ственно (рис.30,А,Б). Фибробласты предсердий животных с очаговым инфарктом

чении их растяжения, передаваться на клетки водителя ритма и замедлять развитие диастолической деполяризации в пейсмейкерных клетках. Помимо этого должен быть вызван и другой процесс – появление пейсмейкерного тока, активируемого гиперполяризацией (IF).

## РЕЗЮМЕ II

– Фибробласты являются электроневоозбудимыми, но механосенситивными клетками, мембрана которых имеет механосенситивные ионные каналы.

– Механоиндуцированный потенциал сердечных фибробластов является электрофизиологическим прояв-

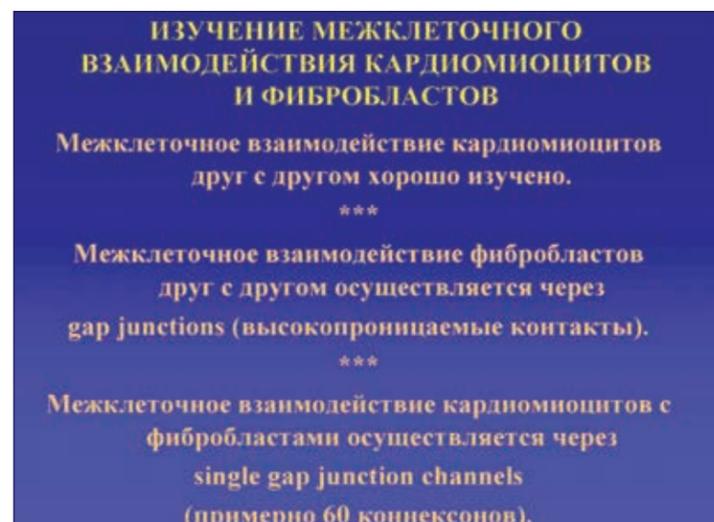


Рис. 32

мембраны, то есть гиперполяризует клетку.

– Растяжение кардиомиоцита приводит к его деполяризации, а растяжение фибробласта к его гиперполяризации. В физиологических условиях установлено некое равновесие этих процессов.

– При патологии сердца реакция на растяжение крайне выражена у обоих типов клеток. Если гиперполяризация у фибробластов больше, чем деполяризация у кардиомиоцитов, и влияние со стороны фибробластов сильнее, наблюдается урежение ритма сердца вплоть до его остановки. Если деполяризация у кардиомиоцитов больше, чем переданная от фибробластов гиперполяризация, то наблюдаются аритмии вплоть до фибрилляции сердца. В этом случае важна степень их межклеточного взаимодействия

## 2.4. МЕЖКЛЕТОЧНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ

Межклеточное электротоническое взаимодействие между кардиомиоцитами с фибробластами в сердце на этапе 80-х годов прошлого столетия отрицалось. Отрицалось также и электротоническое взаимодействие между сердечными фибробластами. Этот вид взаимодействия, осуществляемого посредством gap junctions, впервые был показан в смешанной культуре ткани, однако, нам удалось и электрофизиологическими методами, и гистоиммунохимическими методами показать наличие коннексонов, в том числе между фибробластами и кардиомиоцитами во фрагментах сердца (рис.32).

На рис.33 показано, что между кардиомиоцитами и фибробластами обнаруже-



Рис. 34

миокарда и, следовательно, последующая гипертрофия сердца. На рис.30 показано частотное распределение потенциала покоя мембраны фибробластов предсердия крыс у контрольной группы (А) и групп, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка (20 дней) и имеющих мелкоочаговый инфаркт (Б), идентифицируемый на ЭКГ, но неидентифицируемый визуально (0%), очаговый (В) инфаркт ( $16.5 \pm 0.6$  %) и обширный (Г) инфаркт ( $40 \pm 1.3$  %) левого желудочка.

Фибробласты предсердий контрольных животных и животных с неидентифицируемым визуально инфарктом миокарда (с мелкооча-

миокарда (рис.30,В) имели мембранный потенциал, равный  $-35.9 \pm 1.6$  мВ, а с обширным (рис.30,Г)  $-46.5 \pm 1.8$  мВ.

Таким образом, фибробласты сердца помимо кардиомиоцитов могут также являться субстратом механоэлектрической обратной связи в сердце (рис.31).

Изменение проводимости мембраны и сдвиги мембранного потенциала фибробластов, возникающее под влиянием механических воздействий, могут передаваться на кардиомиоциты. Например, вызванная растяжением фибробластов гиперполяризация, может, в условиях частых сокращений предсердий при увели-

лением механической стимуляции этих клеток.

– В сердечной ткани сжатие фибробластов приводит к деполяризации, а растяжение фибробластов – к гиперполяризации их мембран.

– В гипертрофированном сердце электрофизиологические параметры фибробластов и их реакция на механическое воздействие существенно меняются. При крайне малой величине растяжения ткани по сравнению с контролем чувствительность фибробластов к механическому воздействию значительно возрастает.

– Сжатие изолированных фибробластов увеличивает проводимость их мембраны, то есть деполяризует клетку.

– Растяжение изолированных фибробластов уменьшает проводимость их

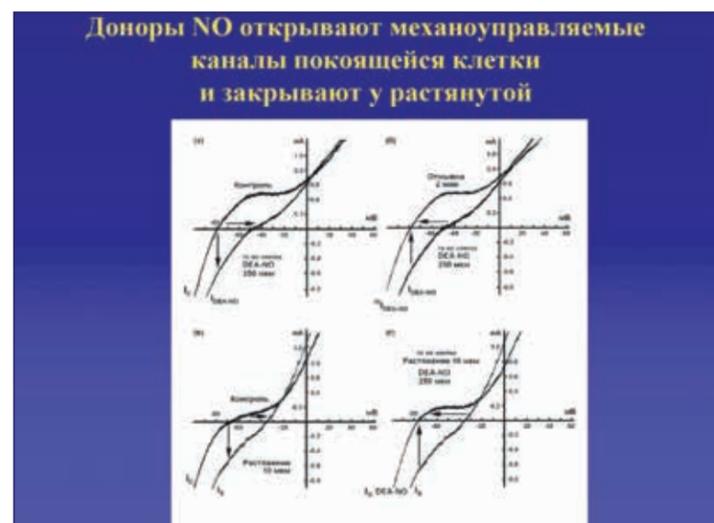


Рис. 35

и степень реакции на механический стресс у каждого типа клеток.



Рис. 36

## РЕЗЮМЕ III

– В сердце фибробласты контактируют друг с другом при помощи gap junctions. Межклеточное электротоническое взаимодействие фибробластов друг с другом было показано электрофизиологическими методами и доказано наличием коннексонов Sx40 и Sx45

– Межклеточное электротоническое взаимодействие фибробластов с кардиомиоцитами было косвенно показано электрофизиологическими методами и доказано наличием коннексона

**PTIO, связывая NO, закрывает механоуправляемые ионные каналы у растянутой**

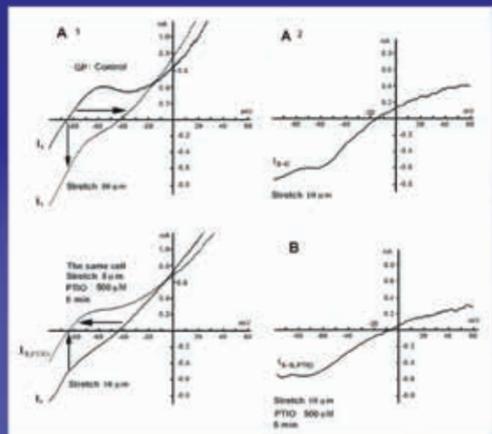


Рис. 37

**L-NAME блокирует реакцию на растяжение. У NOS1-/- и NOS2-/- мышцей реакция на растяжение кардиомиоцитов сохранена, а у NOS3-/- отсутствует**

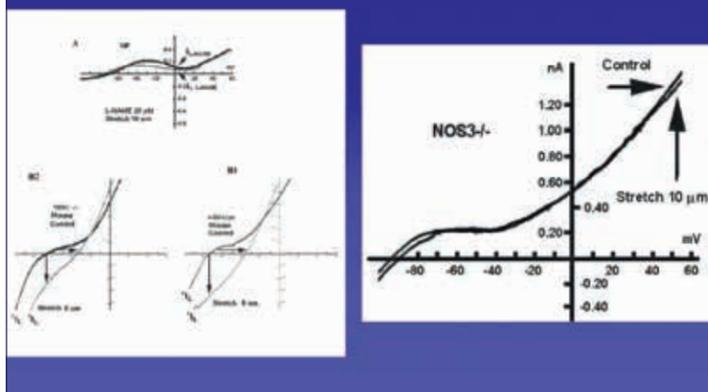


Рис. 38

**Регуляция MG-ответа клетки на растяжение ткани при действии провоспалительных интерлейкинов**

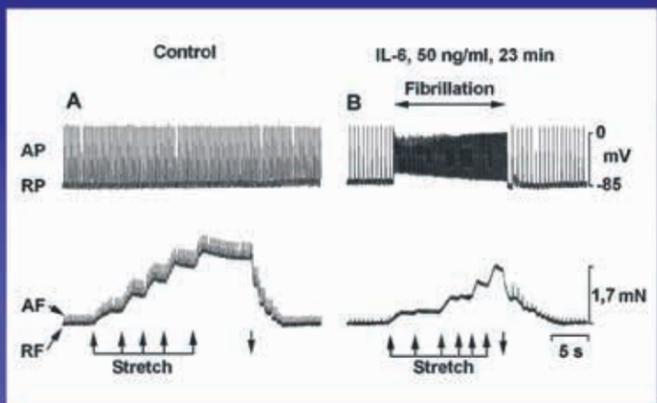


Рис. 39

**Дальнейшее направление работ – поиск соединений, которые могут целенаправленно активировать или ингибировать MGC, что имеет важнейшее значение для лечения ряда заболеваний сердца**

Сх45 между фибробластами и кардиомиоцитами.

**2.5. ПРИНЦИП РАБОТЫ СЕРДЦА**

На основании приведенных выше и других опубликованных данных был сформулирован принцип работы сердца в норме и патологии, схема которого приведена на рис.34.

**2.6. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ МЕХАНОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ ПОСРЕДСТВОМ NO**

Первый вопрос, который встает в этом направлении – а возможно ли вообще регулировать работу механоуправляемых каналов? Для этого осуществлялся поиск соединений, открывающих или закрывающих механоуправляемые каналы без деформации клетки. Впервые в мире показать это удалось нашей рабочей группе.

На изолированных кардиомиоцитах в условиях регистрации методом patch-clamp мембранных токов через ионные каналы, активирующиеся растяжением клетки (MGCs), показано, что доноры оксида азота (SNAP и DEA-NO) вызывают их активацию и появление MG токов, блокируемых Gd3+ у недеформированных клеток, в то время как у растянутых клеток, где MGCs активированы, NO-доноры вызывают их инактивацию и ингибируют проводимость каналов (рис. 35).

На препаратах правого предсердия крыс с использованием микроэлектродной техники показано, что доноры NO – SNAP и DEA-NO на фоне физиологического предрастяжения ткани вызывают изменения формы фазы

реполяризации потенциалов действия кардиомиоцитов по типу «hump-like» деполяризации с дальнейшим развитием аритмий (рис.36, левая панель). Гадолиний блокирует этот эффект, что доказывает участие механоуправляемых ионных каналов в развитии NO-индуцированных аномальностей. Увеличение концентрации SNAP или DEA-NO, а также растяжение ткани (приводящее к активации NO-синтазы), устраняет вызванную NO «hump-like» деполяризацию (рис.36, правая панель).

Таким образом, NO в низких концентрациях активирует механоуправляемые каналы кардиомиоцитов, приводя к механоиндуцированным аритмиям, а в высоких концентрациях инактивирует их.

На изолированных кардиомиоцитах мыши, крысы и морской свинки методом patch-clamp в конфигурации whole-cell изучали роль оксида азота в регуляции токов через ионные каналы, активируемые растяжением клетки (mechanically gated channels: MGCs), в том числе катион-неселективные и K+-каналы – TRPC6, TREK1 (K2P2.1) и TREK2 (K2P10.1). Показано, что у недеформированной клетки связывание эндогенного оксида азота PTIO необратимо смещает диастолический мембранный потенциал в негативную область, модулирует Kir каналы, уменьшая IK1, и блокирует MGCs. Перфузия клеток PTIO на фоне растяжения приводит к полному ингибированию MG-токов (рис.37).

Ингибиторы NO-синтазы L-NAME и L-NMMA полностью блокируют MGCs (рис.38,А, левая панель).

Растяжение кардиомиоцитов от мышцей дикого типа, а также NOS1-/- и NOS2-/- нокаутных, приводит к появлению типичных для заданной величины растяжения MG-токов (рис.38,В1,В2, левая панель). Напротив, растяжение кардиомиоцитов от NOS3-/- нокаутных мышцей не вызывает появления MG-тока (рис.38, правая панель). Результаты свидетельствуют о роли NO в регуляции активности MGCs и демонстрируют, что NOS3 доминирует как источник NO в реализации ответа кардиомиоцитов на растяжение.

**2.7. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ МЕХАНОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ ПОСРЕДСТВОМ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ**

Данные о роли IL-1a, IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, IL-17a, IL-18, TNF, VEGF в формировании электрических аномальностей у клеток и у ткани сердца, переходящих в аритмии и фибрилляцию, в основе механизма которых лежит работа ионных каналов, активирующихся растяжением клетки (MGCs) были получены впервые в мире. Также впервые показан механизм влияния интерлейкинов на механоэлектрическую обратную связь в сердце. Так, например, увеличение концентрации IL-6 на фоне крайне малого растяжения ткани, приводит к фибрилляции (рис.39). Впервые были получены данные о натриевых осцилляциях при растяжении кардиомиоцитов. Также впервые в мире была показана корреляция концентрации ряда цитокинов, например, TNF- $\alpha$ , и частота возникновения аритмий.

**БЛАГОДАРНОСТЬ ОСНОВНЫМ СОАВТОРАМ**

- Профессор Киселева И.С. (Россия)
- Профессор Ярыгин В.Н. (Россия)
- Профессор Пылаев А.С. (Россия)
- Профессор Сулягин П.В. (Россия)
- Профессор Ковальчук Л.В. (Россия)
- Доцент Лозинский И.Т. (Россия)
- Доцент Казанский В.Е. (Россия)
- Доцент Макаренко Е.Ю. (Россия)
- Доцент Лысенко Н.Н. (Россия)
- Доцент Абрамочкин Д.В. (Россия)
- Ст.н.сотр. Митрохин В.М. (Россия)
- Аспирант Калугин Л.Ю. (Россия)

- Professor Kohl P (UK)
- Professor Noble D. (UK)
- Professor Lab M.J. (UK)
- Professor Persson P.B. (Germany)
- Professor Scholz H. (Germany)
- Professor Günther J. (Germany)
- Professor Theres H. (Germany)
- Professor Wagner K.D. (Germany)
- Professor Isenberg G. (Germany)
- Professor Kirischuk S. (Germany)
- Professor Gallitelli M.F. (Germany)
- Dr. Tian Bo (KHP)

Газета Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета им. Н.И. Пирогова «Университетская Газета». Выходит с 1932 года.  
**Учредитель и Издатель:** ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России  
**Редакция:** Главный редактор: А. Г. Камкин  
Первый заместитель главного редактора: К. В. Троянов

Заместитель главного редактора: О. А. Лебель  
Ответственный секретарь: Н. Н. Игнатов  
Редактор-корректор: Л. Г. Бароян  
Дизайн: Г. Н. Иванов  
**Редакционный совет:** М. Э. Григорьев, Г. В. Порядин, И. Т. Лозинский  
**Адрес редакции:** 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

E-mail: rsmu@rsmu.ru  
Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов. Редакция не предоставляет справочной информации. Рукописи не возвращаются и не рецензируются. Материалы принимаются к публикации без выплаты авторских гонораров. Перепечатка материалов, опубликованных в «Университетской Газете», допускается только с разрешения авторов, издателя и письменного разрешения редакции. При перепечатке ссылка на «Университетскую Газету» обязательна. Эксклюзивное право на размещение информационных рекламных материалов принадлежит ООО

«Редакция журнала «Воинское братство». Тел./факс: (495)427 99 22  
E-mail: info@vojn-brat.ru  
**ГАЗЕТА РАСПРОСТРАНЯЕТСЯ БЕСПЛАТНО**  
Отпечатано в типографии ООО «Виза Стар». Подписано в печать 28 марта 2014 г. Тираж 500 экз.  
Выход в свет 31 марта 2014 г.  
© Газета Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета им. Н.И. Пирогова «Университетская Газета»  
© Дизайн и верстка ООО «Редакция журнала «Воинское братство»