

АНАЛИЗ ФАЗЫ РАССЛАБЛЕНИЯ СЕРДЦА У КРЫС

© 2023 г. В. И. Капелько¹, А. А. Абрамов¹, В. Л. Лакомкин¹. *

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
им. акад. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Скорость и глубина расслабления миокарда определяют наполнение левого желудочка (ЛЖ) в раннюю диастолу. Для анализа фазы расслабления был использован метод логарифмирования падения давления в ЛЖ у крыс. Постепенное ускорение расслабления было обнаружено при переходе от изоволюмической фазы к ауковольюмической фазе непосредственно перед открытием атриовентрикулярных клапанов. Постоянная скорости расслабления в этой фазе была обратно пропорциональна значениям минимального диастолического давления ЛЖ и конечного систолического объема ЛЖ. Результаты показывают, что постепенное ускорение расслабления происходит за счет выпрямления пружинистой структуры коннектина (титина), которая сжимается во время сокращения.

Ключевые слова: миокард, ауковольюмическая фаза, коннектин (титин)

DOI: 10.31857/S0869813923100060, EDN: VBONMG

ВВЕДЕНИЕ

Диастола сердца является важнейшей фазой сердечного цикла, она определяет степень растяжения саркомеров и силу последующего сокращения. Принято делить диастолу на 4 периода – изоволюмическое расслабление, фазы быстрого наполнения, диастаза и фазу относительно медленного наполнения при сокращении предсердий. Скорость изоволюмического расслабления определяет уровень минимального диастолического давления в левом желудочке (ЛЖ) и тем самым – скорость и величину быстрого наполнения ЛЖ при открытии атриовентрикулярных клапанов. При хронической сердечной недостаточности (ХСН) человека нарушение расслабления миокарда является серьезной проблемой [1], оно является также ключевым показателем диастолической дисфункции [2].

Расслабление миокарда представляет собой сложный процесс, в котором выделяют активный и пассивный компоненты. Активный компонент – это процесс поглощения Ca^{++} из миофибрилл главным образом в саркоплазматический ретикулум через кальциевую АТФазу SERCA2a. Он происходит с затратой АТФ, так как Ca^{++} транспортируется внутрь против высокого концентрационного градиента и требует около 30% энергии, затрачиваемой при сокращении [3]. Кроме того, удаление Ca^{++} из миоплазмы происходит также при участии натрий-кальциевого обменника сарколеммы (NCX), но этот компонент слабо выражен у крыс и мышей [4]. Пассивный компонент обеспечивает постепенное восстановление исходной

длины саркомеров, он определяется свойствами сократительных белков [5]. Это, в частности, подтверждается тем, что в большинстве экспериментальных работ показано, что скорость снижения переходного процесса кальция обычно медленнее, чем скорость расслабления [6].

подавляющее большинство работ по исследованию расслабления посвящено изучению активного компонента, поскольку он в значительной мере определяет глубину расслабления [7]. Поскольку максимальная скорость снижения давления ($-dP/dt$) зависит от величины максимального давления в ЛЖ (P_{\max}), было предложено характеризовать этот процесс индексом расслабления, представлявшим отношение $-dP/dt/P_{\max}$ [8]. Этот показатель был стабилен в пределах нормального P_{\max} , но уменьшался при высоком P_{\max} . Вскоре был разработан другой критерий — константа времени расслабления (τ), определяемая на основе логарифмирования кривой падения давления в ЛЖ [9]. Эксперименты на изолированных трабекулах отчетливо показали ускорение расслабления при увеличении частоты сокращений [10, 11]. В условиях *in vivo* это позволяет сердцу обеспечить достаточное наполнение желудочков при укороченной диастолической паузе. Однако эта закономерность у мышей и крыс *in vivo* проявляется гораздо слабее из-за ограниченного диапазона увеличения частоты сокращений. Также в этих условиях τ мало зависит от частоты сокращений, систолического давления в ЛЖ, диастолического и конечно-систолического объема ЛЖ, повышения концентрации Ca^{++} , но значительно уменьшается под влиянием норадреналина [12] или изопротеренола. Это согласуется с известными данными о способности катехоламинов ускорять поглощение Ca^{++} из миофибрилл в саркоплазматический ретикулум.

Различные способы оценки изоволюмического расслабления были применены [13], но заключительная фаза расслабления не привлекала широкого внимания. Полагают, что моноэкспоненциальный характер кривой падения давления сохраняется до завершения расслабления [9], но уже давно в опытах на сердцах морских свинок [14] и сердцах собак *in vivo* [15] было обнаружено ускоренное падение давления в этой фазе, совпадающее с начинающимся увеличением камеры ЛЖ. Эта фаза диастолы, в отличие от изоволюмической, получила название “ауксоволюмической”, поскольку расслабление происходит при переменном объеме ЛЖ. Расчет константы скорости расслабления (величины, обратной τ) на основе логарифмирования кривой давления, показал ее более высокую чувствительность к инотропным факторам по сравнению с константой в изоволюмической фазе. Однако отсутствие конкретных данных о соотношении давления и объема ЛЖ в ауксоволюмической фазе из-за отсутствовавших тогда технических возможностей ограничило возможности анализа. Только после создания высокочувствительных датчиков, позволяющих одновременно регистрировать объем ЛЖ и давление в нем с высоким временным разрешением, стало возможным проанализировать их соотношение в начальной фазе диастолы. Цель данной работы состояла в детальном анализе всей кривой расслабления и динамики начального наполнения ЛЖ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы крысы-самцы стока Wistar массой 350–400 г в возрасте 5–6 месяцев. Животных содержали в биоклинике кардиоцентра в клетках по 5 особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировался (12 ч освещения, 12 ч затемнения) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

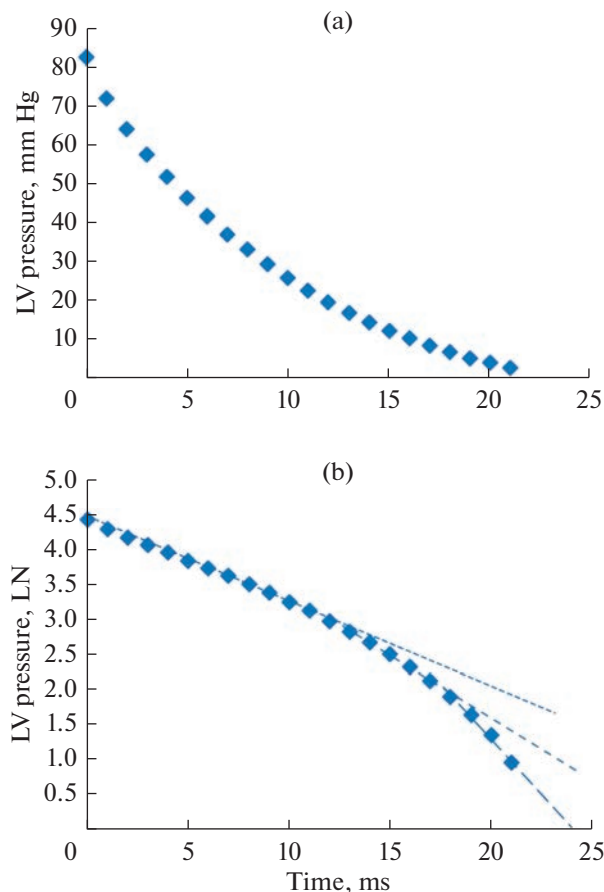


Рис. 1. Динамика падения давления в ЛЖ в обычной (а) и логарифмированной (б) шкале. 1 и 2 – изоволюметрическая фаза, 3 – ауковолометрическая фаза. Крутизна наклона при X характеризует константу скорости расслабления каждого участка.

Под золетиловым наркозом (5 мг/кг) выполняли катетеризацию ЛЖ при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018, вводимого через правую сонную артерию, и усилителя ADV500 (Transonic, Канада). Использовали программное обеспечение LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия), позволявшее рассчитывать более 20 параметров сократительной функции в ходе сердечного цикла. В целях уменьшения притока к сердцу выполняли кратковременное пережатие нижней полой вены [12]. Для статистической обработки результатов измерений использовали алгоритмы, предоставляемые программой Microsoft Excel (2013). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

Расчет констант расслабления. Для анализа используется участок давления в ЛЖ, начинающийся от момента пика скорости падения давления, который близко совпадает с моментом закрытия аортальных клапанов. Если бы расслабление на всем протяжении было экспоненциальным, то при натуральном логарифмировании кривой давления, представленной на рис. 1а, была бы прямая линия. Однако на рис. 1б видно постепенное увеличение наклона кривой, отчетливо

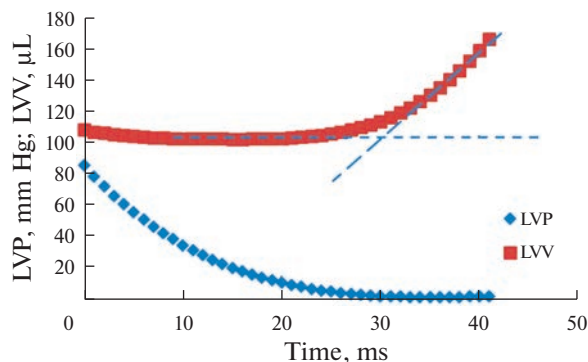


Рис. 2. Динамика падения давления в ЛЖ (внизу, ДЛЖ) и прироста объема ЛЖ (вверху, ОЛЖ). Шкала на ординате представляет величины давления (мм рт. ст.) и объема ЛЖ (мкл).

видны 3 степени наклона. В каждом участке происходит подбор линии тренда с вычислением величины достоверности аппроксимации R^2 не меньше 0.999. Наклон линии тренда на этих трех участках характеризуется величинами: 1) $y = -0.115x$ ($R^2 = 0.999$); 2) $y = -0.1569x$ ($R^2 = 0.9991$); 3) $y = -0.2102x$ ($R^2 = 0.9992$). Соответственно начальная изоволюмическая константа расслабления равна 115 с^{-1} , вторая изоволюмическая константа — 157 с^{-1} , а ауковолоумическая константа — 210 с^{-1} . Обратная величина (1000/константа наклона) характеризует константу времени расслабления (τ), и цифры приобретают обратное значение: 8.7, 6.4 и 4.7 мс. В большинстве опытов логарифмированная кривая разделяется на 3 участка, лишь в некоторых из них — на 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 показана динамика падения давления в ЛЖ и динамика изменения его объема в периоде от максимума скорости снижения давления, который обычно наблюдается при уровне давления 80–90 мм рт. ст. Отчетливо видно, что небольшое увеличение объема ЛЖ на 20 мкл примерно через 10 мс сменяется более крутым увеличением объема после открытия атриовентрикулярных клапанов. Таким образом, длительность ауковолоумической фазы в данном опыте составила около 10 мс.

Расчет константы скорости расслабления по способу, изложенному в методике, позволяет проследить динамику ее изменения в течение всей фазы падения давления в ЛЖ (рис. 3). Выделено 4 участка, первый заканчивается, когда давление снижается примерно до 20 мм рт. ст., а последний — в ауковолоумической фазе — наступает на уровне около 8 мм рт. ст., при этом ее величина почти в 2 раза меньше начальной. Следовательно, скорость снижения давления в ауковолоумической фазе возрастает почти вдвое по сравнению с начальной изоволюмической фазой.

В среднем из 16 опытов константа скорости начальной изоволюмической фазы (ИКР1) составляла $103 \pm 5 \text{ с}^{-1}$, а константа скорости ауковолоумической фазы (АКР) — $183 \pm 7 \text{ с}^{-1}$, т.е. скорость падения давления в ауковолоумической фазе была выше в 1.8 раза. Конец первоначального экспоненциального расслабления отмечен на уровне 34 ± 2 мм рт. ст., а начало ауковолоумической фазы отмечено на уровне 11 ± 1 мм рт. ст. Фракция выброса была равна $65 \pm 2\%$, а минимальное давление в ЛЖ 0.2 ± 0.4 мм рт. ст.

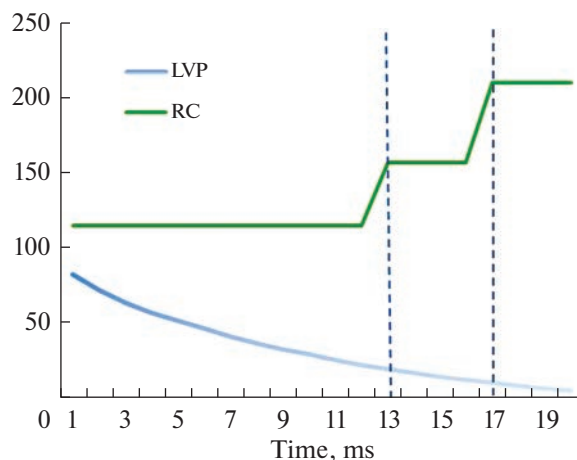


Рис. 3. Иллюстрация динамики снижения давления в ЛЖ (ДЛЖ) и константы скорости расслабления (КР) в течение расслабления в опыте, представленном на рис. 1.

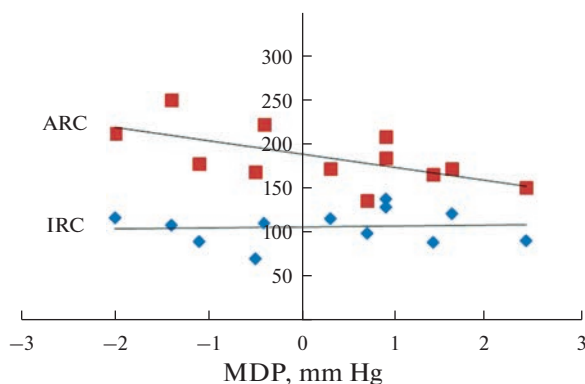


Рис. 4. Взаимосвязь между минимальным диастолическим давлением в ЛЖ (МДД) и константами ауковольюмической (АКР) и изовольюмической (ИКР) релаксации (s^{-1}) в отдельных экспериментах.

Было отмечено, что более высокие значения АКР наблюдались при более низком минимальном диастолическом давлении в ЛЖ. На рис. 4 показаны эти взаимосвязи, можно видеть, что разница между АКР и ИКР при отрицательном минимальном диастолическом давлении в ЛЖ определенно выше по сравнению с соответствующим значением при положительном минимальном диастолическом давлении в ЛЖ. В этих экспериментах была установлена отрицательная корреляция между АКР и минимальным давлением в ЛЖ ($r = -0.62$).

Также была отмечена тенденция ассоциации более высоких значений АКР с более низким конечным систолическим объемом ЛЖ. Для исследования этой связи были выполнены опыты, в которых конечносистолический объем ЛЖ уменьшали посредством кратковременного пережатия нижней полой вены. В этих опытах ($n = 11$) уменьшение конечносистолического объема среднем на $30 \pm 5\%$ сочеталось с увеличением АКР на $21 \pm 5\%$. Таким образом, ускоренное расслабление в ауковолью-

мической фазе сочетается с меньшим конечносистолическим объемом и минимальным давлением в ЛЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы подтвердили наши прежние данные об относительном ускорении снижения давления в конечной фазе расслабления [14, 15]. Определена длительность ауковольумической фазы – около 10 мс, что составляет примерно 6% общей длительности цикла для сердца крыс. Ускоренное расслабление в этой фазе естественно сочетается с более глубоким падением давления, что увеличивает градиент между предсердием и ЛЖ и способствует более быстрому наполнению ЛЖ. По существу, АКР является количественной мерой феномена присасывания (suction), возникающего вследствие эластической отдачи (elastic recoil) ЛЖ и впервые наблюдавшегося в изолированных сердцах черепах [16] и собак [17].

Логарифмическая кривая падения давления в ЛЖ характеризуется наличием по крайней мере 3 моноэкспоненциальных участков с возрастающей крутизной. Если бы основу процесса расслабления составляла бы только скорость поглощения Ca^{++} из миофибрилл, то расслабление было бы экспоненциальным на всем протяжении. Однако скорость расслабления всегда превышает скорость размыкания актомиозиновых связей [5], что указывает на включение другого компонента.

Сейчас не вызывает сомнений, что данный процесс осуществляется благодаря распрямлению пружиноподобной структуры коннектина (титина) – белка, соединяющего концы миозиновых нитей с границей саркомера – линией Z [18, 19]. Гигантская пружиноподобная структура коннектина является главным детерминантом пассивного напряжения ЛЖ в диастоле [20]. Структура коннектина сжимается во время сокращения, и чем больше саркомеры сжимаются, тем больше будет упругая сила, возвращающая их в исходное положение. В результате восстанавливающая сила, обеспечивающая феномен присасывания в ранней диастоле, прямо пропорциональна пассивной упругости кардиомиоцитов [19]. Обработка изолированных миоцитов трипсином, разрушающим только коннектин и не влияющая на сократительные белки, снижает упругость мышцы как при растяжении, так и при восстановлении прежней длины [18].

Наличие двух изоформ коннектина – более податливой изоформы N2BA и более упругой N2B ставит вопрос об их функциональном назначении. Очевидно, что сравнительно легко растяжимая изоформа N2BA обеспечивает растяжение ЛЖ при его наполнении в диастоле. В таком случае естественно предполагать, что упругая изоформа N2B, сжимаемая при сокращении, будет распрямлять саркомеры во время расслабления. В экспериментах на миоцитах с различным соотношением изоформ было установлено, что скорость восстановления исходной длины коррелирует с профилем экспрессии изоформ в миоцитах, экспрессирующих высокие уровни изоформы N2B, имеющей наибольшую восстанавливающую жесткость [1, 19, 20]. В одной из последних работ, выполненной на полностью расслабленных кардиомиоцитах из сердца человека, было установлено, что расслабление происходило быстрее при повышенной упругости миофибрилл [21]. Кроме того, содержание изоформы N2B в миокарде наивысшее у мышей и крыс [22], характеризующихся гораздо более высокой частотой сокращений, при которой очень важно обеспечивать высокую скорость расслабления для сохранения диастолической паузы.

Наши данные позволяют предполагать, что включение коннектина в этот процесс начинается во второй половине расслабления и усиливается по мере дальнейшего удаления Ca^{++} из миофибрилл, достигая максимума в ауковольумической

фазе. Очевидно, чем сильнее будет сжата пружина коннектина, тем выше будет АКР (и короче tau). Наши данные о наличии обратной связи между КСО и АКР согласуются с таким представлением, ведь меньший конечносистолический объем ЛЖ возникает при более сильном укорочении саркомеров. И напротив, при увеличении конечносистолического объема, сопряженного с уменьшением фракции выброса, пружиноподобная структура коннектина будет сжиматься меньше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано постепенное ускорение падения давления в ходе расслабления. Оно достигает максимума в ауковольюмической фазе, когда возникает феномен “восстанавливающей силы”, обеспечивающий увеличение камеры ЛЖ еще до открытия митральных клапанов. Весьма вероятно, что ускорение расслабления реализуется благодаря распрямлению более упругой изоформы коннектина N2B, и, таким образом, величина ауковольюмической константы расслабления (или tau) может характеризовать состояние данной изоформы коннектина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 18. III. 1986), положениями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Вашингтон, округ Колумбия, 2011) и другими нормами международного права, регулирующими содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования. Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ “НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова” МЗ РФ (протокол заседания № 2, от 20.03.2023 г).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РФФ № 23-15-00275).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

В.И.К. и В.Л.Л. — идея работы и дизайн экспериментов; А.А.А. и В.Л.Л. — получение данных; А.А.А. В.Л.Л и В.И.К. — обработка и представление данных; В.Л.Л, В.И.К. и А.А.А. — написание и редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Janssen PML* (2019) Myocardial relaxation in human heart failure: Why sarcomere kinetics should be center-stage. Arch Biochem Biophys 661: 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.011>
2. *Bukowski MJ, Cavanaugh B, Abbo A, Chung CS* (2023) Mechanical Control of Relaxation using Intact Cardiac Trabeculae. J Vis Exp 17: 192. <https://doi.org/10.3791/64879>
3. *Eisner DA, Caldwell JL, Trafford AW, Hutchings DC* (2020) The Control of Diastolic Calcium in the Heart: Basic Mechanisms and Functional Implications. Circ Res 126: 395–412. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119>

4. *Biesiadecki BJ, Davis JP, Ziolo MT, Janssen PML* (2014) Tri-modal regulation of cardiac muscle relaxation; intracellular calcium decline, thin filament deactivation, and cross-bridge cycling kinetics. *Biophys Rev* 6(3-4): 273–289.
<https://doi.org/10.1007/s12551-014-0143-5>
5. *Langer SF, Schmidt HD* (2003) Influence of preload on left ventricular relaxation in isolated ejecting hearts during myocardial depression. *Exp Clin Cardiol* 8: 83–90.
6. *Janssen PML, Stull LB, Marban E* (2002) Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H499–H507.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00595.2001>
7. *Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH* (2004) Diastolic heart failure—abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350: 1953–1959.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa032566>
8. *Meerson FZ, Kapelko VI* (1975) The significance of the interrelationship between the intensity of the contractile state and the velocity of relaxation in adapting cardiac muscle to function at high work load. *J Mol Cell Cardiol* 7(11): 793–806.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(75\)90131-5](https://doi.org/10.1016/0022-2828(75)90131-5)
9. *Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML* (1976) Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 58: 751–760.
<https://doi.org/10.1172/JCI1108522>
10. *Капелько ВИ, Горина МС* (1987) Кальциевая регуляция сокращения и расслабления миокарда. В кн: Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда. М. Наука. 79–112. [*Kapel'ko VI, Gorina MS* (1987) Calcium regulation of myocardial contractility function and myocardial relaxation. In: Regulation of contractile function and myocardial metabolism. M. Nauka. 79–112. (In Russ)].
11. *DeSantiago J, Maier LS, Bers DM* (2002) Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 975–984.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2034>
12. *Vitale G, Ferrantini C, Piroddi N, Scellini B, Pioner JM, Colombini B, Tesi C, Poggesi C* (2021) The relation between sarcomere energetics and the rate of isometric tension relaxation in healthy and diseased cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 42: 47–57.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09566-2>
13. *Langer SFJ* (2002) Differential laws of left ventricular isovolumic pressure fall. *Physiol Res* 51(1): 1–15.
14. *Капелько ВИ, Новикова НА* (1986) Изо- и ауково-объемные константы расслабления сердца при оценке его инотропизма. Бюлл Всесоюзн кардиол научн центра АМН СССР 1: 37–45. [*Kapel'ko VI, Novikova NA* (1986) Isovolumic and aurovolumic constants of cardiac relaxation in evaluating its inotropism. *Biull Vsesoiuz Kardiol Nauchn Tsentra AMN SSSR* 1: 37–45. (In Russ)].
15. *Orlova TsR, Kapel'ko VI* (1986) Rate constants of left ventricular relaxation: the effect of inotropic and mechanical factors. *Cardiology* 26(6): 79–83.
16. *Katz LN* (1930) The role played by the ventricular relaxation process in filling the ventricle. *Am J Physiol* 95: 542–553.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1930.95.3.542>
17. *Brecher GA* (1956) Experimental evidence of ventricular diastolic suction. *Circ Res* 4: 513–518.
<https://doi.org/10.1161/01.res.4.5.513>
18. *Helmes M, Trombitás K, Granzier H* (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79: 619–626.
<https://doi.org/10.1161/01.res.79.3.619>
19. *Preetha N, Yiming W, Helmes M, Fukuda N, Labeit S, Granzier H* (2005) Restoring force development by titin/connectin and assessment of Ig domain unfolding. *J Muscle Res Cell Motil* 26: 307–317.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9037-2>
20. *Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H* (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105: 631–638.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>
21. *Chen M-P, Kiduko SA, Saad NS, Canan BD, Kilic A, Mohler PJ, Janssen PML* (2020) Stretching single titin molecules from failing human hearts reveals titin's role in blunting cardiac kinetic reserve. *Cardiovasc Res* 116: 127–137.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvz043>
22. *Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H* (2000) Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86: 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>

Analysis of Relaxation Phase in the Rat Heart**V. I. Kapelko^a, A. A. Abramov^a, and V. L. Lakomkin^a, ****^aNational Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Healthcare, Russian Federation, Moscow, Russia***e-mail: v.lakomkin@yandex.ru*

The rate and depth of myocardial relaxation determine left ventricular (LV) filling in early diastole. To analyze the relaxation phase, the method of logarithm of LV pressure fall in rats was used. A gradual acceleration of relaxation was found during the transition from the isovolumic phase to the auxovolumic phase, immediately before the opening of the atrioventricular valves. The relaxation rate constant in this phase has been inversely correlated with the values of the minimum LV diastolic pressure and LV endsystolic volume. The results suggest that the gradual acceleration of relaxation is due to the straightening of the spring-like structure of connectin (titin), which is compressed during contraction.

Keywords: myocardium, auxovolumic phase, connectin (titin)