РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2025, том 111, № 3, с. 522–541

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЛИНОЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КИНЕТИКИ МИОЗИНОВЫХ МОСТИКОВ НА ПЕРЕХОДНЫЕ ПРОЦЕССЫ Ca^{2+} В МИОКАРДЕ ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ И ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА КРЫС

© 2025 г. Р. В. Лисин[1,*], А. А. Балакин[1], А. И. Зудова[1], Ю. Л. Проценко[1]

[1]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия
**E-mail: lisin.ruslan@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.10.2024 г.
После доработки 20.01.2025 г.
Принята к публикации 20.01.2025 г.

Гетерометрическая регуляция (регуляция, зависящая от длины мышечных волокон) сократимости миокарда – важнейший молекулярный механизм, регулирующий насосную функцию сердца. Ионы кальция играют ключевую роль в активации и регуляции сократимости мышц. Одним из следствий растяжения миокарда, помимо изменения степени перекрытия актин-миозиновых нитей, является изменение формы и длительности кальциевого перехода (CaT) – изменения концентрации внутриклеточного кальция, связанного с сокращением миокарда. При увеличении степени растяжения миокарда длительность спада CaT уменьшается в верхней части кривой и увеличивается в нижней. С целью установления вклада кинетики миозиновых мостиков в изменения CaT были оценены зависимые от длины изменения CaT в трех состояниях кинетики миозиновых мостиков: (1) интактном, (2) замедленном под действием 1 мкМ омекамтива мекарбила (ОМ) и (3) выключенном под действием 10 мкМ блеббистатина (ББ). Обнаружено, что зависимые от длины разнонаправленные изменения спада CaT (феномен перекреста CaT) ярко выражены в миокарде правого желудочка (ПЖ) и слабо – в миокарде правого предсердия (ПП) интактных самцов крыс Wistar 9-недельного возраста. ОМ существенно замедляет скорость развития и спада механического напряжения в миокарде крыс ПП и ПЖ; усиливает зависимые от длины изменения длительности CaT; уменьшает длительность CaT на уровне 80% его амплитуды и увеличивает длительность CaT на уровне 20% амплитуды, как в ПП, так и в ПЖ. ББ практически полностью блокирует способность миокарда развивать механическое напряжение. Зависимые от длины изменения длительности CaT носят монотонный характер, исчезает феномен перекреста CaT в миокарде ПЖ. Феномен перекреста CaT в миокарде ПЖ является следствием изменения количества миозиновых мостиков, участвующих в генерации силы сокращения, скорости их циклирования и скорости распада кальций-тропониновых комплексов, а также скорости секвестрации кальция из миоплазмы. Отсутствие длинозависимых изменений CaT в миокарде ПП крыс, по-видимому, связано с более мощной и развитой кальций-секвестрирующей системой в ПП, что, вероятно, отражает функциональные различия между предсердиями и желудочками.

Ключевые слова: длинозависимость, кальциевый переход, миозиновые мостики, кинетика кальциевого перехода, омекамтив, блеббистатин, правое предсердие, правый желудочек

DOI: 10.31857/S0869813925030102, **EDN:** UGIWYV

ВВЕДЕНИЕ

В процессе гетерометрической регуляции сократимости миокарда в ответ на изменение степени актин-миозинового перекрытия происходит изменение развиваемой мышцей силы или укорочения, которое на уровне целого сердца проявляется в механизме Франка–Старлинга (изменение давления, развиваемого желудочком, в ответ на изменение его объема) [1]. В основе гетерометрической регуляции лежат молекулярно-клеточные механизмы и пространственные изменения миофибрилл и цитоскелета кардиомиоцитов. Так, при растяжении сердечной мышцы происходит следующее: увеличение числа поперечных мостиков, участвующих в силогенерации, за счет уменьшения степени двойного перекрытия актиновых нитей; изменение кооперативной активации поперечных мостиков [2]; повышение сродства тропониновых комплексов к ионам кальция [3]; сближение актиновых и миозиновых нитей [4–6]; фосфорилирование миозин-связывающего белка С и тропониновых комплексов [7, 8].

Ключевую роль в активации и регуляции сокращения мышц играют ионы кальция. Известно, что с увеличением длины саркомеров растет количество ионов Ca^{2+}, связанных с тропонином С (TnC) [3]. Показан механизм обратной связи между связыванием Ca^{2+} с TnC и прикреплением миозиновых мостиков к актину, который проявляется в положительной кооперативной активации АТФазной активности миофибрилл [9].

При изменении степени растяжения миокарда проявляется ее влияние на кинетику Ca^{2+} в кардиомиоцитах. Так, при увеличении степени растяжения миокарда выведение Ca^{2+} из цитоплазмы ускоряется в начальной фазе спада кальциевого перехода (СаТ) от пика СаТ до приблизительно половины его амплитуды и замедляется в конечной фазе спада СаТ, приблизительно от половины амплитуды СаТ до его конца. При суперпозиции кривых спада на малых и больших длинах кардиомиоцитов некоторых видов животных наблюдается перекрещивание хода этих кривых в начальной и конечной фазе спада, так называемый феномен перекреста СаТ [10, 11]. Этот феномен зарегистрирован у разных видов животных (крысы, морские свинки) в миокарде правого желудочка (ПЖ) и правого предсердия (ПП). Однако степень его выраженности в ПП различается у крыс и морских свинок. В ПП морских свинок феномен перекреста более выражен, нежели в ПП крыс [10, 11].

Длинозависимые изменения силы сокращений кардиомиоцитов определяются не только количеством и степенью Ca^{2+} активации поперечных мостиков, но и кинетикой циклирования миозиновых мостиков и/или работой кальций-секвестрирующих систем клетки [12]. Однако вклад этих механизмов в длинозависимые изменения сократимости миокарда различных отделов как интактных, так и патологически измененных сердец остается неоцененным.

Известно, что миокард предсердия существенно отличается от миокарда желудочка по составу изоформ миозинов [13–15], строению саркоплазматического ретикулума и Т-тубул [16, 17], механизмом электромеханического сопряжения [18]. Миокард предсердий обладает более выраженной кальций-секвестрирующей системой в сравнении с миокардом желудочков. Так, экспрессия SERCA2 в ~ 2.8 больше в миоцитах предсердий, а экспрессия фосфоламбана в миоцитах предсердий ниже на ~ 40% [19].

В работе приведены экспериментальные данные и анализ оценки вклада изменения кинетики циклирования миозиновых мостиков в кинетику свободного внутриклеточного Ca^{2+}. Для этого исследованы сигналы свечения кальциевого флюорофора fura-2AM (переходные процессы) в изолированных полосках миокарда ПП и ПЖ интактных крыс при разной степени активности и количестве поперечных мостиков. Проведен анализ кривых СаТ при интактной кинетике мостиков в растворе Кребса–Хенселейта (К-Х), замедленной под влиянием омекамтива мекарбила (ОМ) и полностью выключенной под влиянием блеббистатина (ББ). Таким образом, сравнительное сопоставление длинозависимых изменений кривых СаТ в предсердном и желудочко-

вом миокарде правого отдела сердца позволило косвенно оценить вклад количества мостиков, скорости их циклирования, а также кальций-секвестрирующих систем в изменение кинетики CaT.

Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка вклада разной степени активности поперечных мостиков в зависимые от длины изменения кинетики свободных ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах ПП и интактных самцов крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на изолированных полосках миокарда интактных самцов крыс Wistar, $n = 17$, возраст 9 недель, животных содержали в виварии Института в стандартных условиях (12-часовой световой день, с постоянным доступом к воде и пище).

Приготовление мышечных препаратов

За 15 мин до извлечения сердца из грудной полости животным в/м вводили ксилазин 20 мг/кг и гепарин 600 Ед/кг. Грудную полость вскрывали под ингаляционной анестезией (изофлуран 3–4% в смеси с воздухом). С целью избавления от крови сердце *in situ* (на месте) промывали плегическим раствором К-Х со сниженным содержанием Ca^{2+} (в мМ: NaCl 118, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25, $CaCl_2$ 0.2, глюкоза 11.1, инсулин 5ЕД, pH 7.35 при 25ºС, с барботированием смесью 95% O_2 и 5% CO_2). Затем сердце извлекали из грудной полости и помещали в препаровальную ванну для дальнейшего иссечения мышечных препаратов.

Трабекула ПЖ или лоскут стенки ПП (длина препаратов ($M \pm SD$) в мм ПП (3.4 ± 0.52), ПЖ (3 ± 0.87); малый диаметр ($M \pm SD$) в мкм ПП (278.6 ± 62.33), ПЖ (199.93 ± 68.71); большой диаметр ($M \pm SD$) в мкм ПП (913.5 ± 102.8), ПЖ (418.33 ± 106.76) были иссечены из сердца и закреплены к штокам датчика силы и сервомотора длины в экспериментальной ванне, перфузируемой раствором К-Х с концентрацией Ca^{2+} 2 мМ при температуре 30ºС и барботируемой смесью 95% O_2 и 5% CO_2. Мышцы стимулировали прямоугольными импульсами электрического тока длительностью 1 мс, частотой 2 Гц и амплитудой 1.5 величины порога через неполяризующиеся угольные электроды. Для измерения CaT мышцы инкубировали в растворе К-Х, содержащем 5 мкМ fura-2 AM + 0.4% w/v Pluronic F-127. Данные получены от 10 лоскутов ПП и от 10 трабекул ПЖ. Все химреактивы получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Регистрация данных

Сигналы силы, развиваемой препаратами на различной длине в изометрическом режиме и флюоресценции внутриклеточного красителя fura-2 AM, были зарегистрированы одновременно в Muscle Research System (Scientific Instruments, Гейдельберг, Германия), через ЦАП/АЦП L-502 (Л-кард, Россия) с частотой опроса 10 кГц, под управлением программного комплекса собственной разработки. Краситель возбуждали светом на двух частотах с длинами волн 340/380 нм, эмиссия красителя на длине волны 510 нм. Для сопоставления временных характеристик из сигналов CaT вычитали диастолический уровень светимости, а оставшийся сигнал нормировали на собственную амплитуду. Таким образом получали сигнал в диапазоне от 0 до 1.

Протокол "длина – сила"

Полоску миокарда предварительно устанавливали на длине, при которой она развивала минимальное активное напряжение. Затем длину полоски постепенно увели-

чивали с шагом 50 мкм. На каждом шаге дожидались стабилизации силы одиночных сокращений. Таким образом находили длину полоски (L_{max}), при которой она развивала максимальную величину активной изометрической силы (рис. 1). Дальнейшее увеличение длины полоски приводило к падению активной силы.

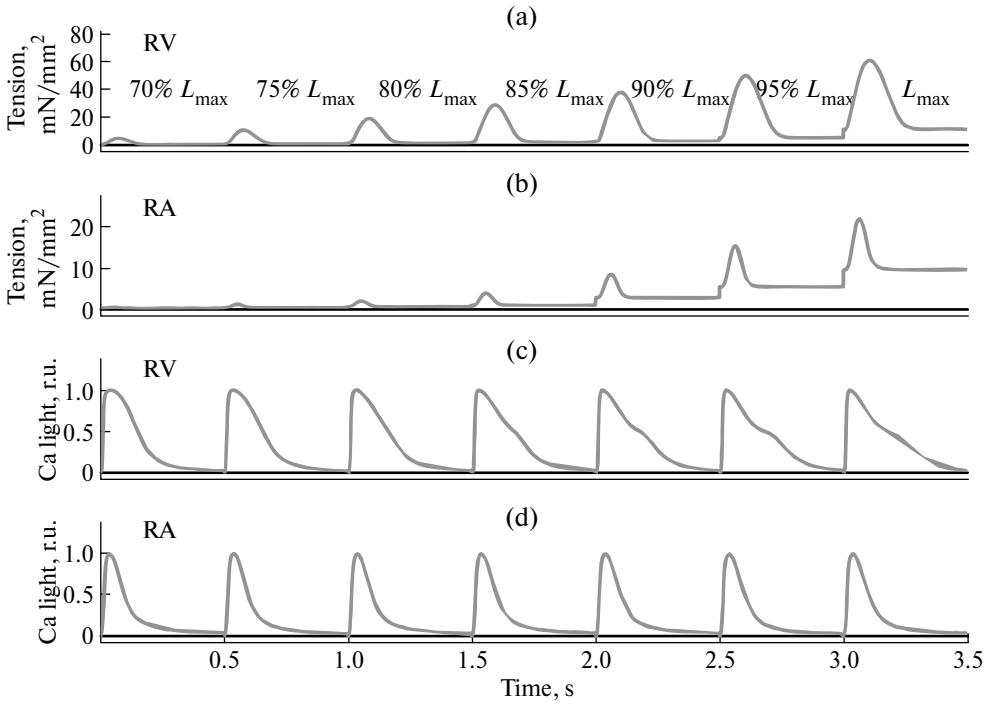

Рис. 1. Репрезентативные примеры изменения временного хода механического напряжения (a и b) и сигнала свечения CaT (c и d) в одиночном цикле “сокращение – расслабление” на изменение начальной длины полоски правого желудочка (RV) и правого предсердия (RA) крысы в растворе Кребса–Хенселейта. Частота стимуляции 2 Гц, температура 30ºC. CaT нормированы на собственную амплитуду. Относительные длины мышечных препаратов указаны на панели (a).

Измерения проводили на длинах (преднагрузках), соответствующих 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100% от $L_{max,}$ с одновременной регистрацией свечения fura-2 AM (рис. 1). Далее мышечный препарат инкубировали в течение 30 мин в растворе К-Х с добавлением ОМ (MedChemExpress Monmouth Junction, NJ, США) в концентрации 1 мкМ. После инкубации повторно проводили регистрацию протокола “длина – сила”. Затем мышечный препарат инкубировали в течение 30 мин в растворе К-Х с добавлением ББ (Sigma – Aldrich) в концентрации 10 мкМ с последующей регистрацией протокола “длина – сила”.

Данные величин изометрической силы и CaT, полученные на разных преднагрузках, использованы для построения зависимости “активное напряжение – деформация” (“длина – сила”) и зависимостей амплитудно-временных характеристик CaT. Механическое напряжение получали путем нормирования величины силы на площадь поперечного сечения препарата. Площадь рассчитывали по формуле $S = \pi ab/4$, где a и b – большой и малый диаметры эллипса.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в блоках программы, разработанных на языке программирования Python, модуль Scipy.stats. Были применены: тест Шапиро–Уилка – для проверки нормальности распределения; тест Левена – для проверки равенства дисперсий; ANOVA Фридмана и апостериорный попарный тест Коновера с поправкой на множественные сравнения Benjamini/Hochberg (non-negative) – для зависимых выборок; критерий Уилкоксона – для зависимых выборок, с поправкой Хольма на множественное сравнение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Репрезентативные записи кривых изометрических сил и свечения CaT полосок миокарда ПП и ПЖ на длине L_{max} изображены на рис. 2. ОМ в концентрации 1 мкМ замедлял расслабление изометрического напряжения как полосок ПП, так и трабекул ПЖ (рис. 2a, b, красный цвет), сглаживал спад CaT трабекул ПЖ (рис. 2d, красный цвет). ББ в концентрации 10 мкМ подавлял развитие механического напряжения в препаратах миокарда как ПП, так и ПЖ (рис. 2a, b), при этом сигнал Ca^{2+} переходного процесса (CaT) сохранялся (рис. 2c, d), но менял свой вид (ниже дано более подробное описание).

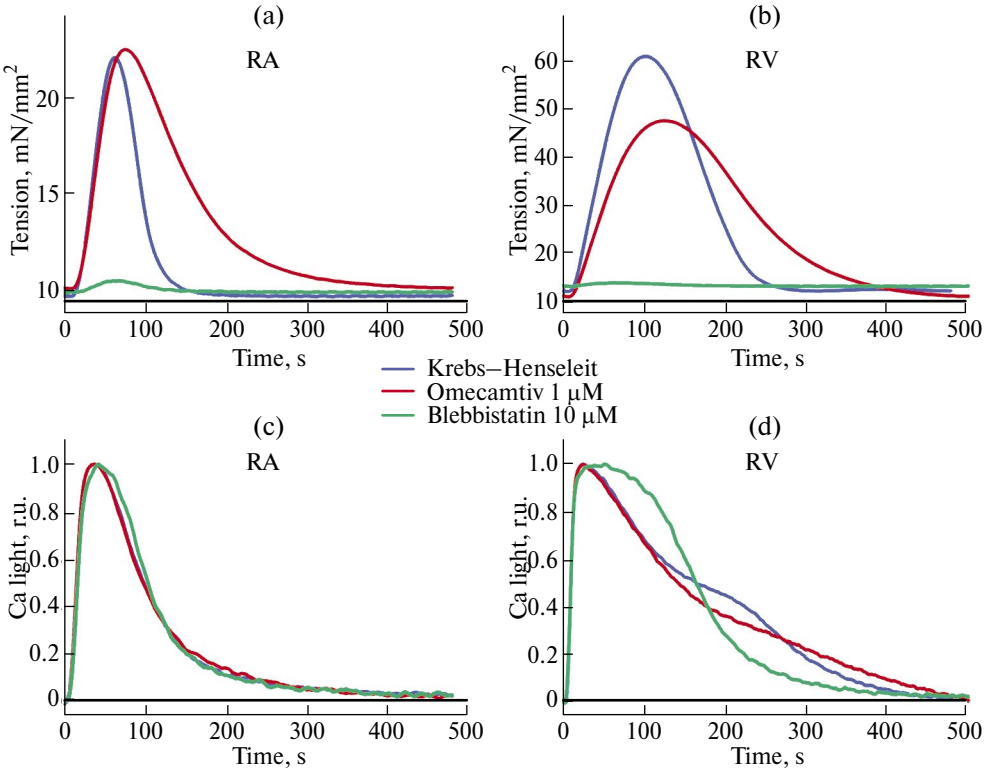

Рис. 2. Репрезентативные траектории механического напряжения (a и b) и соответствующие им CaT (c и d) в одиночных изометрических сокращениях препаратов правого предсердия (RA) и правого желудочка (RV) на длине L_{max} в растворах Кребса–Хенселейта (синий), омекамтива мекарбила 1 мкМ (красный) и блеббистатина 10 мкМ (зеленый). Частота стимуляции 2 Гц, температура 30ºС. r.u. – относительные единицы.

Влияние омекамтива и блеббистатина на связь "длина – сила"

В растворах К-Х и ОМ с увеличением степени растяжения полосок ПП и ПЖ увеличивается развиваемое активное механическое напряжение (рис. 3a, b). Воздействие ОМ и ББ по-разному влияет на амплитуду изометрического напряжения во всем диапазоне исследуемых длин трабекул ПЖ и полосок ПП ($p < 0.01$, ANOVA Фридмана). Раствор ОМ в концентрации 1 мкМ подавляет амплитуду изометрического напряжения трабекул ПЖ (рис. 3b), но статистически значимые различия обнаружены только на длине L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Увеличение амплитуды изометрического напряжения полосок ПП под действием ОМ (рис. 3b) во всем диапазоне исследуемых длин 0.7–1 L_{max} статистически не значимо ($p > 0.05$, тест Коновера). Воздействие 10 мкМ ББ существенно подавляет развитие изометрического напряжения относительно амплитуды напряжения в растворах К-Х и ОМ как у трабекул ПЖ (рис. 3a), так и у полосок ПП (рис. 3b), различия статистически значимы во всем диапазоне исследуемых длин 0.7–1 L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Так, значения (Q1, Me, Q3) активного напряжения на длине L_{max} в мН/мм^2 составили: ПЖ К-Х (30.83, 48.22, 52.6), ПЖ ОМ (22.88, 31.82, 39.87), ПЖ ББ (0.86, 1.32, 1.66), ПП К-Х (3.49, 4.93, 5.73), ПП ОМ (3.57, 5.24, 8.12), ПП ББ (0.09, 0.18, 0.28).

Влияние ОМ на скорость развития и спада механического напряжения

Для оценки степени влияния ОМ на скорость циклирования мостиков использовали нормированную величину максимальной скорости развития и спада механического напряжения $((dP/dt)_{max})/P_{max})$, где P_{max} – максимальное напряжение. Действие ОМ (1 мкМ) статистически значимо снижало нормированную величину максимальной скорости развития напряжения во всем диапазоне исследуемых длин 0.7–1 L_{max} полосок ПП (рис. 4a) и трабекул ПЖ (рис. 4b) ($p < 0.01$, критерий Уилкоксона). Значение медианы $((dP/dt)_{max})/P_{max})$ развития напряжения на длине L_{max} уменьшилось на ~ 11.5% и ~ 10.4% по сравнению с таковыми в растворе К-Х для ПЖ и ПП соответственно и составило в 1/с: (Q1, Me, Q3) ПЖ К-Х (9.05, 17.81, 20.26), ПЖ ОМ (7.3, 15.77, 17.3), ПП К-Х (25.26, 27.49, 31.49), ПП ОМ (22.34, 24.64, 29.33). Кроме того, ОМ статистически значимо снижал нормированную величину максимальной скорости расслабления во всем диапазоне исследуемых длин 0.7–1 L_{max} как у полосок ПП (рис. 4c), так и у трабекул ПЖ (рис. 4d) ($p < 0.01$, критерий Уилкоксона). Значение медианы нормированной величины максимальной скорости расслабления на длине L_{max} уменьшилось на 37.4% и 48.9% для ПЖ и ПП соответственно и составило в 1/с: (Q1, Me, Q3) ПЖ К-Х (5.31, 8.85, 10.77), ПЖ ОМ (3.58, 5.54, 6.22), ПП К-Х (20.62, 21.33, 22.1), ПП ОМ (9.15, 10.91, 15.14).

Влияние растяжения на CaT в миокарде предсердия и желудочка

В наших экспериментах в трабекулах ПЖ крыс вследствие выраженного влияния растяжения на форму CaT в растворах К-Х (рис. 5b) и ОМ (рис. 5d) наблюдался феномен перекреста спада кривых CaT. Однако в растворе ББ показано отсутствие такового влияния (рис. 5f). Суть феномена заключается в систематическом укорочении длительности CaT в верхней части амплитуды и увеличении длительности CaT в нижней части амплитуды CaT вследствие повышения степени растяжения мышцы, как показано стрелками на рис. 5d. Этот феномен отсутствует в сигналах CaT полосок предсердия (рис. 5a, c, e).

Длительность CaT на уровне 20% и 80% амплитуды (T dur 20 CaT и T dur 80 CaT) позволяет количественно оценить изменение длительности CaT, что отражает скорость систем, секвестрирующих кальций, на конкретной длине в разные фазы цикла "сокращение – расслабление" и сопоставить при разных фиксированных длинах полосок миокарда.

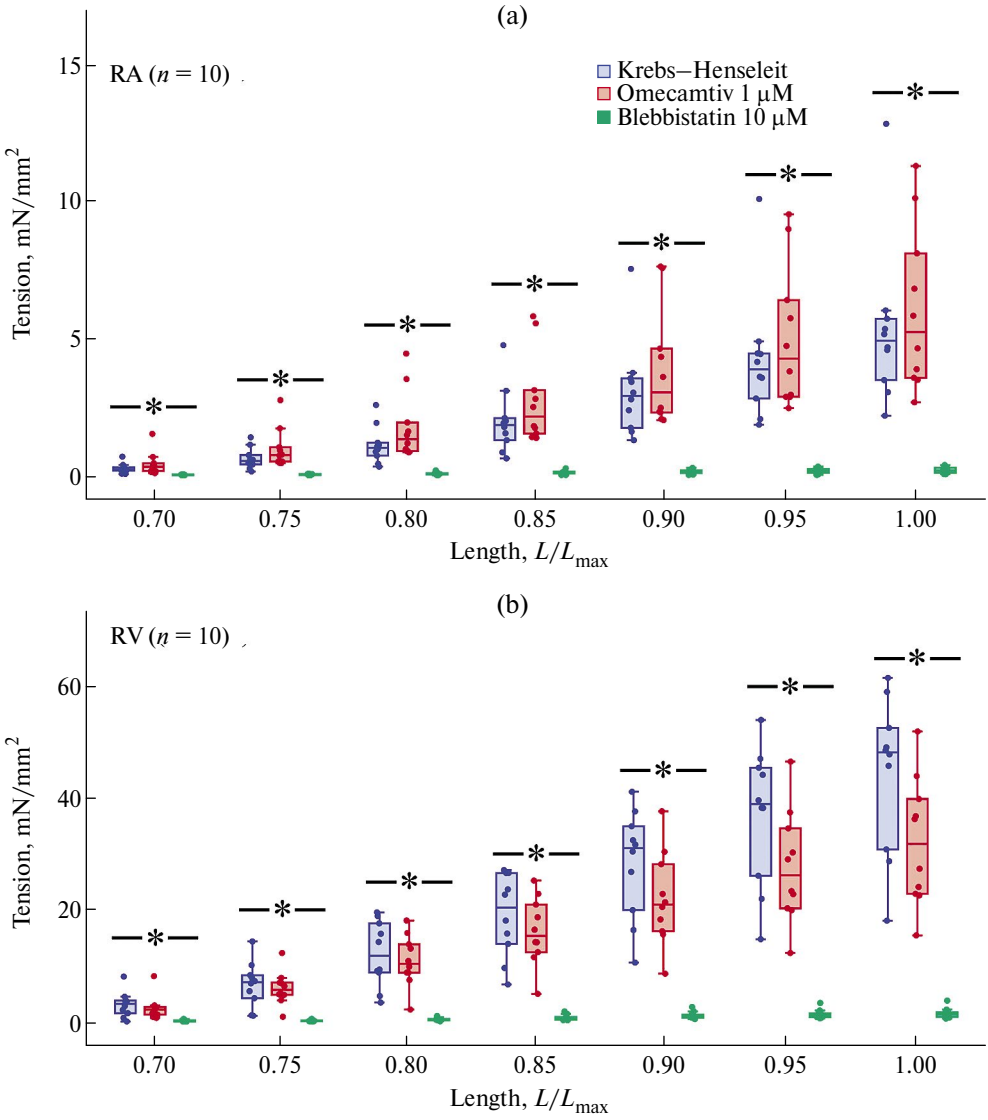

Рис. 3. Зависимость величины активного механического напряжения от длины (преднагрузки) полосок миокарда правого предсердия (a) и правого желудочка (b) крыс в растворе Кребса–Хенселейта (синий), омекамтива мекарбила 1 мкМ (красный) и блеббистатина 10 мкМ (зеленый). Частота стимуляции 2 Гц, температура 30ºС. * – $p < 0.01$, ANOVA Фридмана, влияние фактора раствора (действие омекамтива мекарбила 1 мкМ и блеббистатина 10 мкМ) на активное напряжение при конкретной преднагрузке. Данные представлены в виде диаграмм рассеяния с наложенными на них ящичными диаграммами, где Q1 – нижняя граница ящика, Q3 – верхняя граница ящика, медиана – горизонтальная черта внутри ящика, усы ящика – минимум и максимум значений, точки за границами усов – выбросы.

Влияние растяжения на длительность CaT на уровне 20 % его амплитуды (T dur 20 CaT)

В растворе К-Х с растяжением полосок ПП уменьшается разброс значений величины T dur 20 CaT (рис. 6c, синий цвет, $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Однако апостериорное попарное сравнение величин длительности CaT на уровне 20% его ам-

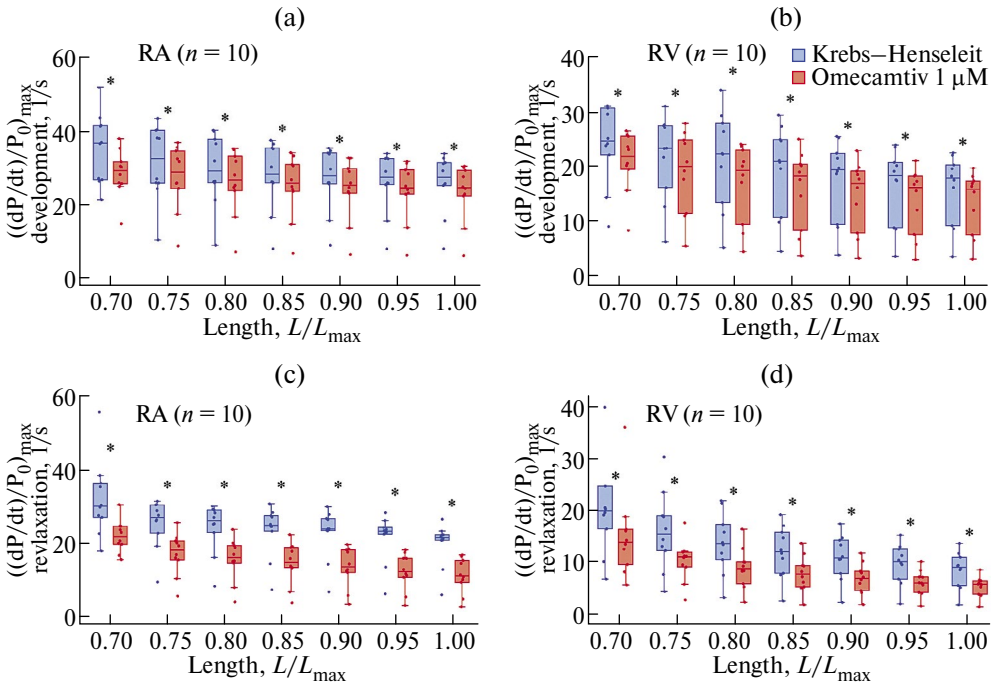

Рис. 4. Зависимость нормированной величины максимальной скорости развития (a и b) и расслабления механического напряжения (c и d) от длины (преднагрузки) полосок миокарда правого предсердия RA (a, c) и правого желудочка RV (b, d) крыс в растворе Кребса–Хенселейта (синий), омекамтива мекарбила 1 мкМ (красный). Частота стимуляции 2 Гц, температура раствора 30ºC. Данные представлены в виде диаграмм рассеяния с наложенными на них ящичными диаграммами, где Q1 – нижняя граница ящика, Q3 – верхняя граница ящика, медиана – горизонтальная черта внутри ящика, усы ящика – минимум и максимум значений, точки за границами усов – выбросы. * – $p < 0.01$, критерий Уилкоксона, влияние ОМ на $((dP/dt)/P_{max})_{max}$ на конкретной преднагрузке.

плитуды между разными длинами полосок ПП не выявляет статистически значимых различий. В растворе ОМ увеличение длины полосок ПП приводит к статистически значимому увеличению T dur 20 CaT (рис. 6c, красный цвет, табл. 1). Кроме того, обнаружены различия значений длительности CaT на уровне 20% его амплитуды между разными длинами полосок ПП с максимальной разницей между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается зависимое от длины увеличение медианы T dur 20 CaT на 8.58% относительно медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (129, 137, 145) на длине 0.7 L_{max} и (139, 148.75, 168) на длине L_{max}. В растворе ББ растяжение полосок ПП не приводит к видимым изменениям длительности CaT на уровне 20% его амплитуды (рис. 6c, зеленый цвет), хотя фактор растяжения статистически значим ($p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Однако апостериорный попарный тест Коновера не выявил статистически значимых различий значений T dur 20 CaT полосок ПП между их разными длинами.

В растворе К-Х растяжение трабекул ПЖ приводит к статистически значимому увеличению длительности CaT на уровне 20% его амплитуды (рис. 6d, синий цвет, табл. 1). Обнаружены различия значений T dur 20 CaT между разными длинами трабекул ПЖ с максимальной разницей этих величин между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается увеличение значения медианы длительности CaT на уровне 20% его амплитуды на ~ 38.43% относительно медианы на длине

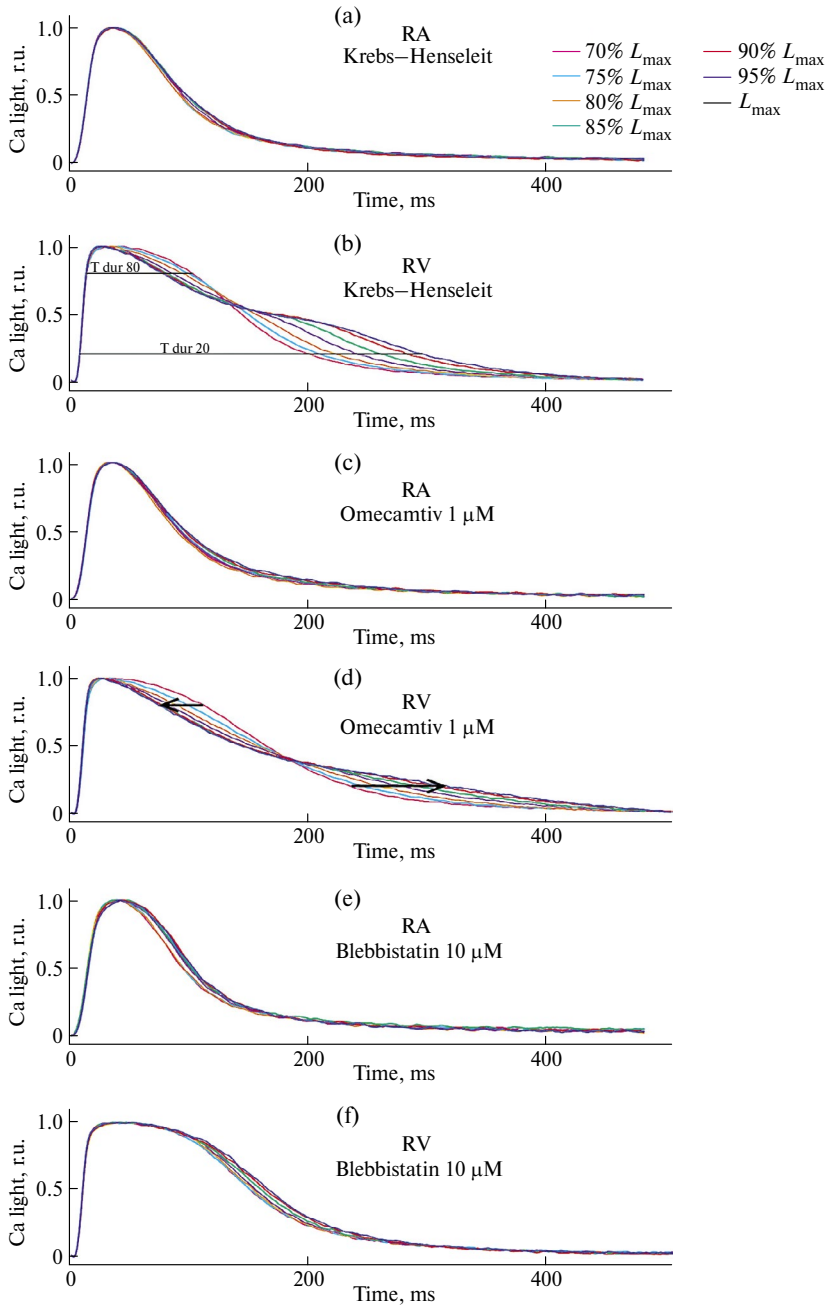

Рис. 5. Суперпозиция репрезентативных кривых кальциевых переходных процессов (CaT) в растворе Кребса–Хенселейта (a и b); растворе, содержащем 1 мкМ омекамтива мекарбила (c и d); и растворе, содержащем 10 мкМ блеббистатина (e и f), на разных длинах полосок миокарда правого предсердия RA (a, c, e) и правого желудочка RV (b, d, f) сердец интактных крыс. Величины длин и соответствующий им цвет указаны в легенде. Частота стимуляции 2 Гц, температура раствора 30ºC. На панели (b) показана схема расчета T dur 20 и T dur 80 длительности CaT на уровне 20% и 80% его амплитуды. Стрелки на панели (d) указывают сдвиг сигнала CaT при увеличении степени растяжения трабекулы ПЖ относительно сигнала CaT на наименьшей длине мышцы, r.u. – относительные единицы.

0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (192, 207.5, 219) на длине 0.7 L_{max} и (256, 287.25, 302) на длине L_{max}. В растворе ОМ увеличение длины трабекул ПЖ приводит к статистически значимому увеличению T dur 20 CaT (рис. 6d, красный цвет, табл. 1). Обнаружены различия значений T dur 20 CaT между разными длинами трабекул ПЖ. Максимальная разница этих величин выявлена между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается увеличение значения медианы T dur 20 CaT на ~32.75% относительно медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (204, 226.75, 234) на длине 0.7 L_{max} и (269.5, 301, 306.5) на длине L_{max}. В растворе ББ с растяжением трабекул ПЖ увеличивается длительность CaT на уровне 20% его амплитуды (рис. 6d, зеленый цвет, $p < 0.001$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Обнаружены различия значений T dur 20 CaT между разными длинами трабекул ПЖ с максимальной разницей этих величин между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается увеличение значения медианы длительности CaT на уровне 20% его амплитуды на 9.58% относительно значения медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (198.5, 217.2, 228.5) на длине 0.7 L_{max} и (218, 238, 242) на длине L_{max}.

Таблица 1. Результаты статистического исследования влияния растяжения (фактор – длина, L/L_{max}) на T dur 20 CaT и T dur 80 CaT. ANOVA Фридмана

Показатель	Коэффициент конкордации Кендалла	Степени свободы	χ^2	*p* -значение	*n*	Раствор	Группа
T dur 20 CaT	0.21	6	12.82	**< 0.05**	10	К-Х	ПП
	0.96		57.46	**< 0.001**		К-Х	ПЖ
	0.47		28.06	**< 0.001**		ОМ	ПП
	0.76		45.76	**< 0.001**		ОМ	ПЖ
	0.28		15.33	**0.02**		ББ	ПП
	0.67		40.45	**< 0.001**		ББ	ПЖ
T dur 80 CaT	0.07	6	4.33	0.63	10	К-Х	ПП
	0.44		26.14	**< 0.001**		К-Х	ПЖ
	0.31		18.59	**0.01**		ОМ	ПП
	0.44		26.25	**< 0.001**		ОМ	ПЖ
	0.25		13.46	**< 0.01**		ББ	ПП
	0.71		42.61	**< 0.001**		ББ	ПЖ

Влияние растяжения на длительность CaT на уровне 80 % его амплитуды (T dur 80 CaT)

Растяжение полосок ПП в растворе К-Х не влияет на величину T dur 80 CaT (рис. 6a, синий цвет, табл. 1). В растворе ОМ с увеличением длины полосок ПП статистически значимо уменьшается значение длительности CaT на уровне 80% его амплитуды (рис. 6a, красный цвет, табл. 1). Обнаружены различия величин T dur 80 CaT между разными длинами полосок ПП с максимальной разницей между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается уменьшение значения медианы длительности CaT на уровне 80% его амплитуды на ~ 11.63% относительно значения медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (45, 48, 49.2) на длине 0.7 L_{max} и (42, 43, 45) на длине L_{max}. Растяжения полосок ПП в растворе ББ не приводят к видимым изменениям длительности CaT на уровне 80% его ампли-

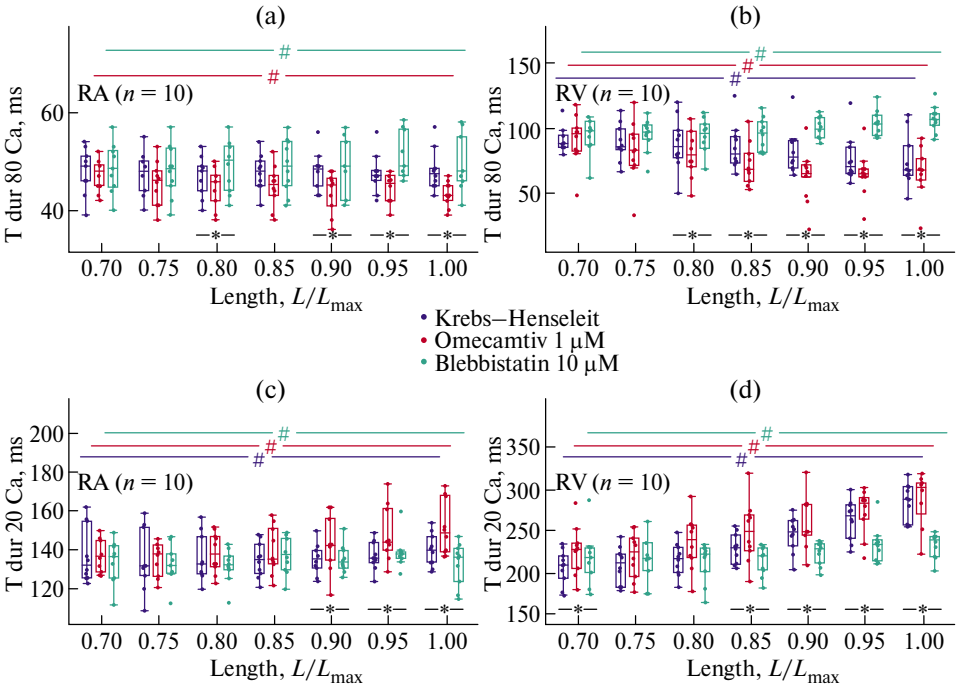

Рис. 6. Зависимость величины T dur 20 CaT и T dur 80 CaT (длительность CaT на уровне 20 и 80%) от длины полосок миокарда правого предсердия (a и c) и правого желудочка (b и d) крыс в растворе Кребса–Хенселейта (синий), в растворе, содержащем 1 мкМ омекамтива мекарбила (красный), и в растворе, содержащем 10 мкМ блеббистатина (зеленый). Частота стимуляции 2 Гц, температура раствора 30ºC. Данные представлены в виде диаграмм рассеяния с наложенными на них ящичными диаграммами, где Q1 – нижняя граница ящика, Q3 – верхняя граница ящика, медиана – горизонтальная черта внутри ящика, усы ящика – минимум и максимум значений, точки за границами усов – выбросы. # – $p < 0.01$, ANOVA Фридмана, фактор – длина мышцы; * – $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, фактор – действие растворов ОМ и ББ.

туды (рис. 6a, зеленый цвет), хотя фактор растяжения статистически значим ($p < 0.01$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Апостериорное попарное сравнение Коновера не выявило статистически значимых различий значений T dur 80 CaT между разными парами длин полосок ПП.

Растяжение трабекул ПЖ в растворе К-Х приводит к уменьшению значения длительности CaT на уровне 80% его амплитуды (рис. 6b, синий цвет, $p < 0.001$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Обнаружены различия величин T dur 80 CaT между разными длинами трабекул ПЖ с максимальной разницей между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается уменьшение значения медианы длительности CaT на уровне 80% его амплитуды на ~ 29.94% относительно значения медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (86, 88.75, 95) на длине 0.7 L_{max} и (64, 68.3, 87) на длине L_{max}. В растворе ОМ увеличение длины трабекул ПЖ приводит к уменьшению T dur 80 CaT (рис. 6b, красный цвет, $p < 0.001$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Обнаружены различия величин длительности CaT на уровне 80% его амплитуды между разными значениями пар длины трабекул ПЖ с максимальной разницей между крайними значениями длины ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается уменьшение значения медианы T dur 80 CaT на ~ 41.08% относительно значения медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (83, 96.5, 100.8) на длине 0.7 L_{max} и (60.5, 68.4, 77) на длине L_{max}. В растворе ББ растяжение тра-

бекул ПЖ приводит к увеличению длительности CaT на уровне 80% его амплитуды (рис. 6b, зеленый цвет, $p < 0.001$, ANOVA Фридмана, табл. 1). Обнаружены статистически значимые различия величин T dur 80 CaT между разными длинами трабекул ПЖ. При этом максимальная разница найдена между крайними значениями длин ($p < 0.05$, тест Коновера). На длине L_{max} наблюдается увеличение значения медианы T dur 80 CaT на ~ 9.28% относительно значения медианы на длине 0.7 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (88, 98.6, 106) на длине 0.7 L_{max} и (103, 107.25, 112) на длине L_{max}.

Влияние ОМ и ББ на T dur 20 CaT и T dur 80 CaT на фиксированных длинах

Рассмотрим влияние фактора кинетики циклирования миозиновых мостиков в трех состояниях: интактная кинетика мостиков в растворе К-Х, замедленная под действием ОМ и выключенная под действием ББ, на длительность CaT на уровне 80% его амплитуды и на длительность CaT на уровне 20% его амплитуды при разной фиксированной длине полосок ПП и трабекул ПЖ.

Показано, что изменение кинетики циклирования миозиновых мостиков оказывает влияние на T dur 80 CaT полосок ПП на длинах 0.8, 0.9, 0.95 и 1 L_{max} (рис. 6a, $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 2). Замедление циклирования миозиновых мостиков уменьшает T dur 80 CaT, а выключение миозиновых мостиков ее увеличивает. Апостериорное попарное сравнение Коновера выявило различия значений длительности CaT на уровне 80% его амплитуды полосок ПП в растворах ОМ и ББ на длинах, равных 0.95 и 1 L_{max}, и между растворами К-Х и ОМ на длине L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Максимальная разница наблюдается на длине L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (45, 47.5, 48.5) для К-Х, (42, 43, 45) для ОМ и (46, 48, 55) для ББ.

В трабекулах ПЖ изменение кинетики циклирования миозиновых мостиков (ОМ и ББ) также оказывает влияние на длительность CaT на уровне 80% его амплитуды на длинах 0.8–1 L_{max} (рис. 6b, $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 2). Замедление циклирования миозиновых мостиков уменьшает длительность CaT на уровне 80% его амплитуды, а выключение миозиновых мостиков ее увеличивает. Апостериорное попарное сравнение выявило различия значений длительности CaT на уровне 80% его амплитуды в растворах К-Х и ОМ на длинах 0.85–0.95 L_{max}, в растворах ОМ и ББ на длинах 0.8–1 L_{max}, в растворах К-Х и ББ на длинах 0.95 и 1 L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Максимальная разница влияния растворов наблюдается на длине 0.95 L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (65.5, 71, 86) для К-Х, (63, 65.5, 69) для ОМ и (95, 104.2, 111) для ББ.

Влияние изменения кинетики циклирования миозиновых мостиков на длительность CaT на уровне 20% его амплитуды полосок ПП также выявлено на длинах 0.9, 0.95 и 1 L_{max} (рис. 6c, $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 2). Замедление циклирования миозиновых мостиков увеличивает T dur 20 CaT, а выключение миозиновых мостиков уменьшает эту величину. Однако апостериорное попарное сравнение выявило статистически значимые различия значений длительности CaT на уровне 20% его амплитуды в растворах К-Х и ОМ только на длинах 0.95 L_{max} и 1 L_{max}, а в растворах ОМ и ББ только на длине 1 L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Максимальная разница наблюдается на длине L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (134, 140, 147) для К-Х, (139, 148.75, 168) для ОМ и (124, 136.5, 141) для ББ.

Обнаружено влияние изменения кинетики циклирования миозиновых мостиков на длительность CaT на уровне 20% его амплитуды трабекул ПЖ на длинах 0.7, 0.85–1 L_{max} (рис. 6d, $p < 0.05$, ANOVA Фридмана, табл. 2). Замедление циклирования миозиновых мостиков увеличивает T dur 20 CaT, а выключение миозиновых мостиков уменьшает длительность CaT на уровне 20% его амплитуды. Апостериорное попарное сравнение выявило различия значений длительности CaT на уровне 20% его амплитуды в растворах К-Х и ОМ на длине 0.7 L_{max}, в растворах ОМ и ББ на длинах 0.85–1 L_{max}

и в растворах К-Х и ББ на длине L_{max} ($p < 0.05$, тест Коновера). Максимальная разница относительно ББ наблюдается на длине L_{max}. Значения (Q1, Me, Q3) составили в мс (256, 287.25, 302) для К-Х, (269.5, 301, 306.5) для ОМ и (218, 238, 242) для ББ.

Таблица 2. Результаты статистического исследования влияния кинетики циклирования миозиновых мостиков (действие ОМ и ББ) на T dur 20 CaT и T dur 80 CaT. ANOVA Фридмана

Коэффициент конкордации Кендалла	Степени свободы	χ^2	*p*-значение	*n*	Длина, L/L_{max}	Группа	Показатель
0.18	2	3.26	0.2	10	0.7	ПП	T dur 20 CaT
0.02	2	0.36	0.84	10	0.75		
0.24	2	4.79	0.09	10	0.8		
0.04	2	0.84	0.66	10	0.85		
0.39	2	7.74	**0.02**	10	0.9		
0.43	2	8.6	**0.01**	10	0.95		
0.66	2	13.28	**< 0.01**	10	1		
0.47	2	9.38	**0.01**	10	0.7	ПЖ	T dur 20 CaT
0.19	2	3.8	0.15	10	0.75		
0.2	2	4.05	0.13	10	0.8		
0.49	2	9.8	**0.01**	10	0.85		
0.57	2	11.4	**< 0.01**	10	0.9		
0.43	2	8.6	**0.01**	10	0.95		
0.76	2	15.2	**< 0.001**	10	1		
0.09	2	1.56	0.46	10	0.7	ПП	T dur 80 CaT
0.27	2	5.4	0.07	10	0.75		
0.32	2	6.32	**0.04**	10	0.8		
0.21	2	4.27	0.12	10	0.85		
0.31	2	6.16	**0.05**	10	0.9		
0.66	2	13.28	**< 0.01**	10	0.95		
0.63	2	12.6	**< 0.01**	10	1		
0.13	2	2.51	0.28	10	0.7	ПЖ	T dur 80 CaT
0.25	2	5	0.08	10	0.75		
0.39	2	7.8	**0.02**	10	0.8		
0.63	2	12.6	**< 0.01**	10	0.85		
0.91	2	18.2	**< 0.001**	10	0.9		
1	2	20	**< 0.001**	10	0.95		
0.72	2	14.31	**< 0.001**	10	1		

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прирост амплитуды механического напряжения при растяжении полосок миокарда ПП и ПЖ в основном определяется увеличением числа актомиозиновых контактов вследствие изменения степени перекрытия толстых и тонких нитей, уменьшения двойного перекрытия актиновых нитей, усиления кооперативности. При этом наблюдаются длинозависимые изменения формы CaT в миокарде ПЖ крыс [20, 21] и ПП и ПЖ морских свинок [10]. В этих работах авторы фокусируют внимание на изменении длительности CaT, вызванной растяжением мышцы, в нижней половине спада сигнала. Это изменение связывают с диссоциацией ионов кальция из кальций-тропониновых комплексов (Ca^{2+}+TnC) во время расслабления изометрического напряжения мышцы. В нашей работе мы обращаем внимание на феномен перекреста CaT (рис. 5d). Суть феномена заключается в последовательном уменьшении длительности CaT в верхней части его амплитуды и увеличении длительности CaT в нижней его части с увеличением длины кардиомиоцитов. Перекрест CaT отчетливо выражен в трабекулах ПЖ крыс (рис. 5b) и сглажен в миокарде полосок ПП крыс (рис. 5a). Суть феномена, а также полученный результат для трабекул ПЖ и предполагаемый молекулярный механизм, лежащий в основе феномена, представлены в графической схеме на рис. 7.

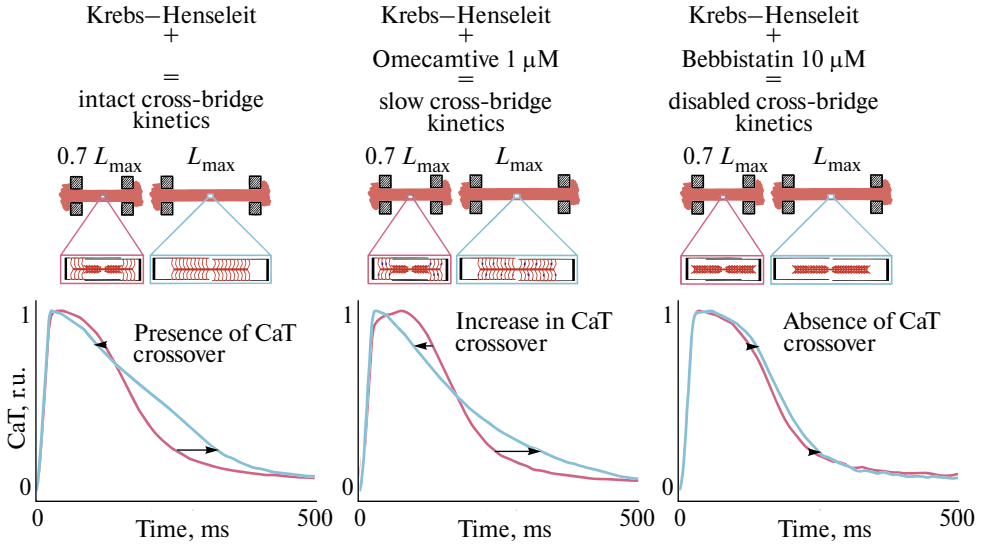

Рис. 7. Эффект длины мышцы и скорости циклирования поперечных мостиков на CaT. Графическая схема эксперимента и полученных результатов для трабекул ПЖ.

ОМ (1 мкМ) применяли как инструмент для оценки влияния замедления циклирования миозиновых мостиков на кинетику внутриклеточного Ca^{2+}, отражающейся на кривой кальциевого перехода. Нами установлено снижение максимальной величины скорости развития изометрического напряжения и скорости его расслабления под действием ОМ (1 мкМ) как для полосок ПП, так и для трабекул ПЖ (рис. 4). Это хорошо объясняется тем фактом, что ОМ, связываясь со специфическим карманом молекулы миозина, дозозависимо увеличивает время жизни миозинового мостика в сильносвязанном состоянии и укорачивает шаг миозинового мотора [22, 23]. Все это

приводит к замедлению кинетики циклирования миозиновых мостиков. Кроме того, удлиняя время жизни мостика, прикрепленного к актину [22], ОМ в свою очередь приводит к увеличению чувствительности TnC к Ca^{2+} [24–26] и тем самым увеличивает вероятность связывания Ca^{2+} с TnC. Этим эффектом усиления Ca^{2+} буфера на фоне действующего поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом можно объяснить обнаруженное нами уменьшение длительности начальной фазы Ca^{2+} перехода на уровне 80% амплитуды под действием ОМ (рис. 5b, d и рис. 6a, b). В фазу расслабления мостики открепляются от тонкой нити, позволяя диссоциировать ионам кальция от TnC [27], что является причиной увеличения длительности CaT на уровне 20% амплитуды (рис. 5b, d). Замедление кинетики миозиновых мостиков, вызванное ОМ, усиливает феномен перекреста в правом желудочке.

Известно, что ББ предотвращает укорочение саркомеров кардиомиоцитов мышей [28], крыс, кроликов [29] и человека [30], при этом не влияет на амплитуду CaT и не вызывает изменений в трансмембранном потенциале действия [30] даже при использовании в концентрации 10 мкМ [28, 29]. Поэтому мы применяли ББ как селективный разобщитель электромеханического сопряжения [31] с целью оценки длинозависимых изменений CaT, которые происходят без влияния механической активности поперечных мостиков. Воздействие ББ в концентрации 10 мкМ на трабекулы ПЖ крыс приводит к исчезновению перекреста CaT (рис. 5f). Если замедление кинетики миозиновых мостиков, вызванное ОМ, как мы уже описали, усиливает феномен перекреста в правом желудочке, уменьшая длительность начальной фазы CaT на уровне 80% амплитуды в диапазоне 0.85–0.95 L_{max}, то выключение циклирования миозиновых мостиков, вызванное ББ, элиминирует феномен перекреста, уменьшая длительность CaT на уровне 20% амплитуды и увеличивая длительность CaT на уровне 80% амплитуды в этом диапазоне длин.

Длинозависимые изменения длительности CaT в ПЖ под действием ББ сохраняются (рис. 6b, d), но носят монотонный характер (рис. 5f). А именно, длительность CaT увеличивается на всех уровнях амплитуды CaT с увеличением степени растяжения мышц, хотя это длинозависимое увеличение длительности CaT при воздействии ББ выражено в меньшей степени, чем в растворе К-Х или под действием ОМ в нижней половине спада CaT. Это свидетельствует о наличии механизмов, не связанных с влиянием миозиновых мостиков. Возможно, оно связано с влиянием растяжения на константы связывания и распада комплексов Ca^{2+}TnC и/или изменением функционирования сарко-эндоплазматической АТФазы 2 (SERCA2). Отсутствие различий в длительности CaT на длине 0.7 L_{max} между растворами К-Х и ББ для трабекул ПЖ объясняется малым количеством миозиновых мостиков, способных прикрепиться к тонкой нити, поскольку на этой длине трабекулы развивают минимальную изометрическую силу, что связано с высокой степенью двойного перекрытия актиновых нитей на малых длинах [32] и инактивацией актина [33]. С другой стороны, на длине L_{max} в саркомерах наблюдается минимальное двойное перекрытие актиновых нитей или его отсутствие. Т. е. максимальное количество миозиновых мостиков способно прицепиться к тонкой нити, поэтому для трабекул ПЖ мы наблюдаем наличие статистически значимой разницы между длительностью CaT в условиях нормальной кинетики миозиновых мостиков (раствор К-Х) и длительностью CaT в условиях выключенной кинетики миозиновых мостиков (раствор ББ).

Эти результаты дают основание полагать, что наблюдаемое длинозависимое изменение длительности CaT на разных уровнях его амплитуды (феномен перекреста CaT) зависит от количества силогенерирующих миозиновых мостиков и скорости их циклирования, а именно от связывания и диссоциации ионов кальция регуляторными белками. С увеличением степени растяжения мышцы увеличивается количество мостиков, способных прикрепиться к актину. Это в свою очередь приводит к увеличению вероятности связывания ионов Ca с TnC за счет кооперативных

эффектов [3, 34–36], поэтому мы наблюдаем разницу в длительности CaT на уровне 80% амплитуды (соответствует фазе развития напряжения на длине L_{max}) между CaT на длинах мышцы 0.7 и 1 L_{max} (рис. 5b). Таким образом, с увеличением числа циклирующих мостиков начинает проявляться их влияние на процесс секвестрации ионов кальция в саркоплазму.

Известно, что перекрест CaT выражен также в полосках ПП морских свинок [10]. Однако перекрест отсутствует в CaT полосок ПП крыс в условиях нашего эксперимента (в растворах К-Х и ББ). Это может быть связано с более быстрым выведением ионов Ca из цитоплазмы кардиомиоцитов предсердий крыс, поскольку в миоцитах предсердий крыс экспрессия SERCA2 в ~ 2.8 раза выше, чем в кардиомиоцитах желудочков, в то же время экспрессия фосфоламбана (PLB – белка, подавляющего SERCA2) ниже на ~ 40% [19]. Любопытно, что длительность CaT под действием ББ не отличается от таковой в растворе К-Х. Т. е. прикрепление миозиновых мостов к тонкой нити не влияет на длительность CaT в полосках ПП крыс, в отличие от полосок ПП морских свинок. Однако под действием ОМ при замедлении циклирования мостиков на длине L_{max} появляются статистически значимые, хоть и небольшие различия в длительности CaT как относительно сохраненной кинетики в растворе К-Х, так и относительно выключенной кинетики миозиновых мостиков в растворе ББ (рис. 6a, c, табл. 2).

Исключение промежуточного контура регуляции силы в предсердии в виде влияния мостиков на CaT можно объяснить во многом распределенной структурой саркоплазматического ретикулума [18]. Это способствует более быстрому расслаблению механического напряжения, поскольку после систолы предсердия происходит его растяжение во время систолы желудочка. Остаточная жесткость не полностью расслабленного предсердия может препятствовать систоле желудочка и наполнению предсердия в фазу резервуара. Как показывают гемодинамические исследования на животных, предсердия играют важную роль в точной регулировке объема крови, загружаемого в каждую камеру желудочка, и предваряют каждое систолическое сокращение. Как показано, систола предсердий увеличивает наполнение и работоспособность левого желудочка [37–40].

ВЫВОДЫ

Для трабекул ПЖ интактных самцов крыс впервые установлено, что длинозависимые изменения кальциевого переходного процесса (CaT) зависят от степени активации миозиновых мостиков. В условиях интактной активности миозиновых мостиков зарегистрирован феномен перекреста траекторий сигналов CaT, полученных при разной степени растяжения мышц. Замедление циклирования миозиновых мостиков приводит к усилению выраженности перекреста CaT. Блокировка циклирования миозиновых мостиков приводит к исчезновению перекреста CaT. Следовательно, в феномене перекреста CaT проявляется скорость циклирования миозиновых мостиков и деятельность систем, секвестрирующих кальций. Показаны длинозависимые изменения длительности CaT при выключенной кинетике миозиновых мостиков.

Для полосок ПП сердец интактных самцов крыс впервые установлено, что длинозависимые изменения CaT обнаружены только при замедлении кинетики миозиновых мостиков. В условиях как интактной активности кинетики миозиновых мостиков, так и при выключенном циклировании миозиновых мостиков отсутствует феномен перекреста траекторий сигналов CaT, полученных при разной степени растяжения мышц. Замедление миозиновых мостиков приводит к появлению длинозависимых изменений CaT по типу слабовыраженного перекреста. Отсутствие длинозависимых изменений CaT в полосках ПП крыс, по-видимому, связано с более развитой кальций-секвестрирующей системой в ПП в сравнение с кальций-секвестрирующей системой в ПЖ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р. В. Л., Ю. Л. П.), сбор данных (Р. В. Л., А. А. Б.), обработка данных (Р. В. Л., А. И. З.), написание и редактирование манускрипта (Р. В. Л., А. А. Б., А. И. З., Ю. Л. П.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 24-24-20063) и Правительства Свердловской области.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты были проведены в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, протокол № 06-24 от 20 сентября 2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kosta S, Dauby PC* (2021) Frank-Starling mechanism, fluid responsiveness, and length-dependent activation: Unravelling the multiscale behaviors with an in silico analysis. PLoS Comput Biol 17: e1009469. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009469
2. *Reda SM, Gollapudi SK, Chandra M* (2019) Developmental increase in β-MHC enhances sarcomere length-dependent activation in the myocardium. J Gen Physiol 151: 635–644. https://doi.org/10.1085/jgp.201812183
3. *Hofmann PA, Fuchs F* (1987) Effect of length and cross-bridge attachment on Ca^{2+} binding to cardiac troponin C. Am J Physiol 253: C90–C96. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.1.C90
4. *Fuchs F, Smith SH* (2001) Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. News Physiol Sci 16: 5–10. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.1.5
5. *Moss RL, Fitzsimons DP* (2002) Frank-Starling Relationship. Circ Res 90: 11–13. https://doi.org/10.1161/res.90.1.11
6. *Ait-Mou Y, Hsu K, Farman GP, Kumar M, Greaser ML, Irving TC, de Tombe PP* (2016) Titin strain contributes to the Frank-Starling law of the heart by structural rearrangements of both thin- and thick-filament proteins. Proc Natl Acad Sci USA 113: 2306–2311. https://doi.org/10.1073/pnas.1516732113
7. *Wijnker PJM, Sequeira V, Foster DB, Li Y, Dos Remedios CG, Murphy AM, Stienen GJM, van der Velden J* (2014) Length-dependent activation is modulated by cardiac troponin I bisphosphorylation at Ser23 and Ser24 but not by Thr143 phosphorylation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 306: H1171–H1181. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00580.2013
8. *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
9. *Morimoto S, Ohtsuki I* (1994) Ca^{2+} binding to cardiac troponin C in the myofilament lattice and its relation to the myofibrillar ATPase activity. Eur J Biochem 226: 597–602. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20085.x

10. *Lisin R, Balakin A, Mukhlynina E, Protsenko Y* (2023) Differences in Mechanical, Electrical and Calcium Transient Performance of the Isolated Right Atrial and Ventricular Myocardium of Guinea Pigs at Different Preloads (Lengths). Int J Mol Sci 24: 15524. https://doi.org/10.3390/ijms242115524
11. *Lookin O, Balakin A, Protsenko Y* (2023) Differences in Effects of Length-Dependent Regulation of Force and Ca^{2+} Transient in the Myocardial Trabeculae of the Rat Right Atrium and Ventricle. Int J Mol Sci 24: 8960. https://doi.org/10.3390/ijms24108960
12. *Lookin O* (2020) The use of Ca-transient to evaluate Ca^{2+} utilization by myofilaments in living cardiac muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol 47: 1824–1833. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13376
13. *Chizzonite RA, Everett AW, Prior G, Zak R* (1984) Comparison of myosin heavy chains in atria and ventricles from hyperthyroid, hypothyroid, and euthyroid rabbits. J Biol Chem 259: 15564–15571.
14. *Narolska NA, van Loon RB, Boontje NM, Zaremba R, Penas SE, Russell J, Spiegelenberg SR, Huybregts JM, Visser FC, de Jong JW, van der Velden J, Stienen GJM* (2005) Myocardial contraction is 5-fold more economical in ventricular than in atrial human tissue. Cardiovasc Res 65: 221–229. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.029
15. *Gerzen OP, Lisin RV, Balakin AA, Mukhlynina EA, Kuznetsov DA, Nikitina LV, Protsenko YL* (2023) Characteristics of the right atrial and right ventricular contractility in a model of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. J Muscle Res Cell Motil 44(4): 299–309. https://doi.org/10.1007/s10974-023-09651-7
16. *Smyrnias I, Mair W, Harzheim D, Walker SA, Roderick HL, Bootman MD* (2010) Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation. Cell Calcium 47: 210–223. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.10.001
17. *Bootman MD, Smyrnias I, Thul R, Coombes S, Roderick HL* (2011) Atrial cardiomyocyte calcium signalling. Biochim Biophys Acta 1813: 922–934. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.030
18. *Maxwell JT, Blatter LA* (2017) A novel mechanism of tandem activation of ryanodine receptors by cytosolic and SR luminal Ca^{2+} during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. J Physiol 595: 3835–3845. https://doi.org/10.1113/JP273611
19. *Walden AP, Dibb KM, Trafford AW* (2009) Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol 46: 463–473. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.11.003
20. *Jiang Y, Patterson MF, Morgan DL, Julian FJ* (1998) Basis for late rise in fura 2 R signal reporting $[Ca^{2+}]$i during relaxation in intact rat ventricular trabeculae. Am J Physiol 274: C1273–C1282. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1273
21. *Lookin O, Protsenko Y* (2019) The lack of slow force response in failing rat myocardium: role of stretch-induced modulation of Ca-TnC kinetics. J Physiol Sci 69: 345–357. https://doi.org/10.1007/s12576-018-0651-3
22. *Woody MS, Greenberg MJ, Barua B, Winkelmann DA, Goldman YE, Ostap EM* (2018) Positive cardiac inotrope omecamtiv mecarbil activates muscle despite suppressing the myosin working stroke. Nat Commun 9: 3838. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06193-2
23. *Shchepkin DV, Nabiev SR, Nikitina LV, Kochurova AM, Berg VY, Bershitsky SY, Kopylova GV* (2020) Myosin from the ventricle is more sensitive to omecamtiv mecarbil than myosin from the atrium. Biochem Biophys Res Commun 528: 658–663. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.108
24. *Gollapudi SK, Reda SM, Chandra M* (2017) Omecamtiv Mecarbil Abolishes Length-Mediated Increase in Guinea Pig Cardiac Myofiber Ca^{2+} Sensitivity. Biophys J 113: 880–888. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.002
25. *Kampourakis T, Zhang X, Sun Y-B, Irving M* (2018) Omecamtiv mercabil and blebbistatin modulate cardiac contractility by perturbing the regulatory state of the myosin filament. J Physiol 596: 31–46. https://doi.org/10.1113/JP275050
26. *Nakanishi T, Oyama K, Tanaka H, Kobirumaki-Shimozawa F, Ishii S, Terui T, Ishiwata S, Fukuda N* (2022) Effects of omecamtiv mecarbil on the contractile properties of skinned porcine left atrial and ventricular muscles. Front Physiol 13: 947206. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.947206
27. *Little SC, Biesiadecki BJ, Kilic A, Higgins RSD, Janssen PML, Davis JP* (2012) The rates of Ca^{2+} dissociation and cross-bridge detachment from ventricular myofibrils as reported by a fluorescent cardiac troponin C. J Biol Chem 287: 27930–27940. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337295

28. *Dou Y, Arlock P, Arner A* (2007) Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. Am J Physiol Cell Physiol 293: C1148–C1153. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00551.2006
29. *Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Rosen MR, Balke CW, Efimov IR* (2007) Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. Heart Rhythm 4: 619–626. https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2006.12.047
30. *Li W, Luo X, Ulbricht Y, Guan K* (2021) Blebbistatin protects iPSC-CMs from hypercontraction and facilitates automated patch-clamp based electrophysiological study. Stem Cell Res 56: 102565. https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102565
31. *Farman GP, Tachampa K, Mateja R, Cazorla O, Lacampagne A, de Tombe PP* (2008) Blebbistatin: Use as inhibitor of muscle contraction. Pflugers Arch – Eur J Physiol 455: 995–1005. https://doi.org/10.1007/s00424-007-0375-3
32. *Kossmann CE, Huxley HE* (1961) The Contractile Structure of Cardiac and Skeletal Muscle. Circulation 24: 328–335. https://doi.org/10.1161/01.CIR.24.2.328
33. *Trombitás K, Tigyi-Sebes A* (1984) Cross-bridge interaction with oppositely polarized actin filaments in double-overlap zones of insect flight muscle. Nature 309: 168–170. https://doi.org/10.1038/309168a0
34. *Dobesh DP, Konhilas JP, de Tombe PP* (2002) Cooperative activation in cardiac muscle: Impact of sarcomere length. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282: H1055–H1062. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00667.2001
35. *Smith L, Tainter C, Regnier M, Martyn DA* (2009) Cooperative cross-bridge activation of thin filaments contributes to the Frank-Starling mechanism in cardiac muscle. Biophys J 96: 3692–3702. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.018
36. *Khokhlova A, Konovalov P, Iribe G, Solovyova O, Katsnelson L* (2020) The Effects of Mechanical Preload on Transmural Differences in Mechano-Calcium-Electric Feedback in Single Cardiomyocytes: Experiments and Mathematical Models. Front Physiol 11: 171. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00171
37. *Alenezi F, Rajagopal S* (2021) The right atrium, more than a storehouse. Int J Cardiol 331: 329–330. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.01.069
38. *Korakianitis T, Shi Y* (2006) Effects of atrial contraction, atrioventricular interaction and heart valve dynamics on human cardiovascular system response. Med Eng Phys 28: 762–779. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2005.11.005
39. *Jasaityte R, Claus P, Teske AJ, Herbots L, Verheyden B, Jurcut R, Rademakers F, D'hooge J* (2013) The Slope of the Segmental Stretch-Strain Relationship as a Noninvasive Index of LV Inotropy. JACC: Cardiovasc Imag 6: 419–428. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.10.022
40. *Gaynor SL, Maniar HS, Prasad SM, Steendijk P, Moon MR* (2005) Reservoir and conduit function of right atrium: Impact on right ventricular filling and cardiac output. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H2140–H2145. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00566.2004

Study of the Influence of Long-Dependent Changes in Myosin Bridge Kinetics on Calcium Transient in the Myocardium of the Right Atrium and Right Ventricle of Rats

R. V. Lisin[a, *], A. A. Balakin[a], A. I. Zudova[a], and Yu. L. Protsenko[a]

[a]*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

[*]*e-mail: lisin.ruslan@gmail.com*

Heterometric regulation of myocardial contractility is the most important property regulating the pumping function of the heart. Calcium ions play a key role in the activation and regulation of muscle contraction. In addition to changes in the degree of actin-myosin filament overlap, one consequence of myocardial stretch is a length-dependent change in the shape and duration of the intracellular calcium transient (CaT). As the degree of myocardial stretch increases, the duration of the CaT decreases in the upper half of the CaT decline and increases in the lower half. To determine the contribution of myosin bridge kinetics to CaT changes, length-dependent changes in CaT were assessed in three states of myosin bridge kinetics; (1) intact, (2) slowed under the influence of omecamtiv mecarbil 1 μM (OM), and (3) blocked under the influence of blebbistatin 10 μM (BB). It was found that length-dependent multidirectional changes in CaT decay (CaT crossover phenomenon) were pronounced in the right ventricular (RV) myocardium and weak in the right atrial (RA) myocardium of intact male nine-week-old Wistar rats. OM significantly slows the rate of tension development and decline in myocardium of RA and RV rats; enhances length-dependent changes in CaT duration; OM decreases the duration of CaT at 80% of its amplitude and increases the duration of CaT at 20% of its amplitude in both RA and RV. BB almost completely abolishes the ability of the myocardium to develop tension; length-dependent changes in CaT duration are monotonous, CaT crossover in RV myocardium disappears. The phenomenon of CaT crossover in the myocardium of the RV is a consequence of the attachment and detachment of myosin bridges to the thin filament. The absence of length-dependent changes in CaT in rat RA myocardium seems to be associated with a more developed calcium sequestering system in RA, in comparison with the calcium sequestering system in RV.

Keywords: length dependence, calcium transient, omecamtiv mecarbil, blebbistatin, right atrium, right ventricle