

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

## ОСОБЕННОСТИ ДЛИНОЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КАЛЬЦИЕВОГО ПЕРЕХОДА В МИОКАРДЕ ЖЕЛУДОЧКА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© 2025 г. Р. В. Лисин<sup>1, \*</sup>, А. А. Балакин<sup>1</sup>, Д. А. Кузнецов<sup>1</sup>,

А. И. Зудова<sup>1</sup>, Ю. Л. Проценко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

\*E-mail: [lisin.ruslan@gmail.com](mailto:lisin.ruslan@gmail.com)

Поступила в редакцию 08.07.2025 г.

После доработки 07.08.2025 г.

Принята к публикации 09.08.2025 г.

Проблеме сердечно-сосудистой регуляции при старении уделяется недостаточно внимания, несмотря на высокую социальную значимость. Общность патогенеза нарушений сердечно-сосудистой регуляции у экспериментальных животных и у пожилых людей делает актуальным изучение механизмов регуляции сократимости миокарда в сравнительном эксперименте на лабораторных животных разного возраста. Для определения особенностей изменения длинозависимых механизмов регуляции сократимости здорового миокарда при старении были оценены характеристики механической и электрической активности и кинетики внутриклеточной концентрации ионов кальция (кальциевый переход или CaT) в одиночных сокращениях миокарда правого желудочка групп молодых (1 месяц) и старых (2.5 года) крыс. Эксперименты проведены на трабекулах правого желудочка сердец самцов крыс стока Wistar. В изометрическом режиме сокращения при разной степени растяжения были зарегистрированы показатели механического напряжения, CaT и трансмембранных потенциалов действия (ПД). Экспериментально установлено, что миокард старых животных характеризуется меньшей амплитудой изометрического напряжения, меньшей величиной скорости развития изометрического напряжения, более длительным ПД по сравнению с молодыми животными. Впервые установлены возрастные особенности длинозависимых изменений при суперпозиции кривых CaT, полученных на разных преднагрузках миокарда желудочка. У старых животных длительность спада CaT на уровне 30% его амплитуды значительно больше, чем у молодых. Методом разности кривых кальциевых переходов показано влияние преднагрузки на кинетику ионов кальция в кардиомиоцитах многоклеточных полосок миокарда желудочка крыс разного возраста. Так, относительная величина амплитуды и площади сегмента III кривых разностей CaT значительно больше у молодых животных по сравнению со старыми.

**Ключевые слова:** возрастные изменения, кальциевый переход, потенциал действия, длинозависимость

**DOI:** 10.7868/S2658655X25090077

## ВВЕДЕНИЕ

Исследования механизмов регуляции различных функций сердечно-сосудистой системы представляют высокую социальную значимость, и особое значение они приобретают в проблеме здоровья пожилых людей [1]. Патология сердечно-сосудистой системы и в XXI веке остается лидирующей в структуре заболеваемости и смертности, в том числе в Российской Федерации [2]. Несмотря на тесную связь между старением и сердечно-сосудистыми заболеваниями, на удивление мало исследований, посвященных непосредственно сердечной недостаточности и сосудистой дисфункции, на моделях старения и пожилых испытуемых [3]. Исследования причин и особенностей механизмов развития сердечной патологии и регуляции сократимости на моделях и у лиц пожилого возраста актуальны в связи с растущей во всем мире популяцией этой группы людей и в предположении об общности механизмов патогенеза у людей и моделей животных.

Физиологические и биохимические исследования показали, что стареющий миокард характеризуется изменениями сократительных свойств сердца, структуры потенциала действия (ПД) и механизмов регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ , аналогичными тем, которые наблюдались после гипертрофии как левого, так и правого желудочков при перегрузке давлением [4, 5].

При сердечной недостаточности нарушаются механизмы длинозависимой регуляции сократимости миокарда. Так, у пациентов с диагнозом хроническая сердечная недостаточность со сниженной толерантностью к физической нагрузке не увеличился ударный объем при увеличении венозного возврата, вызванного физической нагрузкой [6]. Кроме того, в биоптатах миокарда больных с сердечной недостаточностью показано отсутствие увеличения силы и изменения чувствительности к ионам кальция при растяжении [7].

Клеточные механизмы гетерометрического контура регуляции сократимости сердца реализуют изменение величины силы, скорости и длительности механического напряжения, мембранного потенциала и кальциевой кинетики в ответ на изменение длины саркомеров миокарда желудочка и предсердия и лежат в основе функционирования закона Франка – Старлинга [8]. Полнота или степень реализации этого механизма зависит от множества причин, в том числе и от изменения чувствительности миофиламентов к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [9], а также может зависеть от возрастных пост-трансляционных модификаций и нарушений внутриклеточного гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ранее в экспериментах с изолированными полосками миокарда желудочка самцов крыс мы обнаружили отчетливое разнонаправленное влияние степени растяжения миокарда на разные участки кривой спада кальциевого перехода (CaT). Особенно четко это проявлялось при суперпозиции кривых CaT на малой и большой длине в миокарде желудочка в виде характерного перекреста, однако в полосках предсердия этот феномен отсутствовал [10]. Кроме того, показано, что при развитии легочно-сердечной недостаточности сглаживаются длинозависимые изменения CaT в миокарде крыс [11]. В связи с тем, что механизмы электромеханического сопряжения изменяются при старении таким же образом, как и при патологии сердца, вызванной перегрузкой давлением [4, 5], в настоящей работе продолжено исследование этого феномена в миокарде желудочков самцов крыс разного возраста.

Цель исследования – установить особенности длинозависимых механизмов регуляции сократимости здорового миокарда по характеристикам силы, электрической активности и кинетики внутриклеточной циркуляции ионов кальция в кардиомиоцитах многоклеточных препаратов желудочка групп молодых и старых животных.

Понимание этих механизмов имеет ключевое значение для разработки эффективных стратегий лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с изменениями сократимости миокарда в зависимости от возраста и состояния сердечной мышцы.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животных содержали в виварии института в стандартных условиях (12-часовой световой цикл, свободный доступ к воде и пище). Количество животных в группах было выбрано с учетом достаточной достоверности полученных результатов и гуманного обращения. Эксперименты проведены на здоровых аутбредных самцах крыс стока Wistar в возрасте 1 месяц ( $n = 5$ , молодые) и 2.5 года ( $n = 7$ , старые). Эти возрастные группы выбраны для удобства проведения экспериментов с учетом возможности выделения мышечных образцов миокарда достаточного размера. За 15 мин до умерщвления животным в/м инъектировали гепарин (600 ЕД/кг) и ксилазин 1 (20 мг/кг), непосредственно перед извлечением сердца использовали изофлуран ингаляционно (3–4% в смеси с воздухом). Вскрывали грудную полость, перерезали сосуды нижней доли левого легкого для обеспечения оттока крови из сердечно-сосудистой системы. Для промывания сердца от крови через сосудистую систему в полость левого желудочка инъектировали около 40 мл гипокальциевого модифицированного раствора Кребса–Хенселейта (К–Х) (в мМ): NaCl 118.5; NaHCO<sub>3</sub> 14.5; KCl 4.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; MgSO<sub>4</sub> 1.2; глюкоза 11.1; CaCl<sub>2</sub> 0.2; 2,3-бутандион моноксим (BDM) 30 (Sigma-Aldrich); инсулин 5U; pH = 7.4. BDM необходим для предотвращения механических повреждений препарата миокарда во время процедуры выделения [12, 13]. После промывки сердце удаляли и погружали в чашку Петри с раствором той же композиции для препарирования.

Изолированные трабекулы правого желудочка (ПЖ) длиной 2–4 мм и толщиной малого диаметра 75–200 мкм механически фиксировали с помощью клипс к штокам датчика силы и сервомотора длины в изолированной термостатируемой ванночке, проточно-перфузируемой перистальтическими насосами модифицированным раствором К–Х (CaCl<sub>2</sub> 1.8 мМ) при температуре 30 °С. Мышцы возбуждали электрическими сверхпороговыми (~1.5 раза) прямоугольными импульсами длительностью ~1 мс через неполяризующиеся угольные электроды с частотой 2 Гц.

*Регистрация механической активности изолированных препаратов миокарда*

Механический ответ изолированных препаратов миокарда ПЖ регистрировали в изометрическом режиме нагрузок с помощью тензодатчиков C05M-3-A (НПО “Автоматика”, Россия) через АЦП/ЦАП L-502 (L-CARD, Россия), подключенный к персональному компьютеру. Это позволило регистрировать сигналы силы сокращения с точностью  $\pm 0.01$  мН и управлять линейными сервомоторами с точностью  $\pm 1$  мкм и частотой 10 кГц. Для онлайн-измерений использовался собственный программный комплекс для ОС Windows 7.

*Связь длина–сила*

После достижения устойчивого режима сократимости на произвольной длине отдельно каждой полоски миокарда приблизительно в течение одного часа от момента монтажа регистрировали одиночные сокращения в изометрическом режиме. По команде на сервомотор длина препарата постепенно, ступенчато увеличивалась с шагом 50 мкм от  $L_0$  (длины провиса) до  $L_{\max}$  (длины насыщения активной силы по амплитуде). После этого проводили регистрацию исследуемых характеристик в диапазоне деформаций 0.7–1.0  $L_{\max}$  с шагом 0.05  $L_{\max}$ . Сопоставление характеристик механической функции разных образцов мышц производили по величине механического напряжения (отношение величины силы мышцы к площади ее поперечного сечения, в кПа).

*Регистрация электрической активности препаратов миокарда*

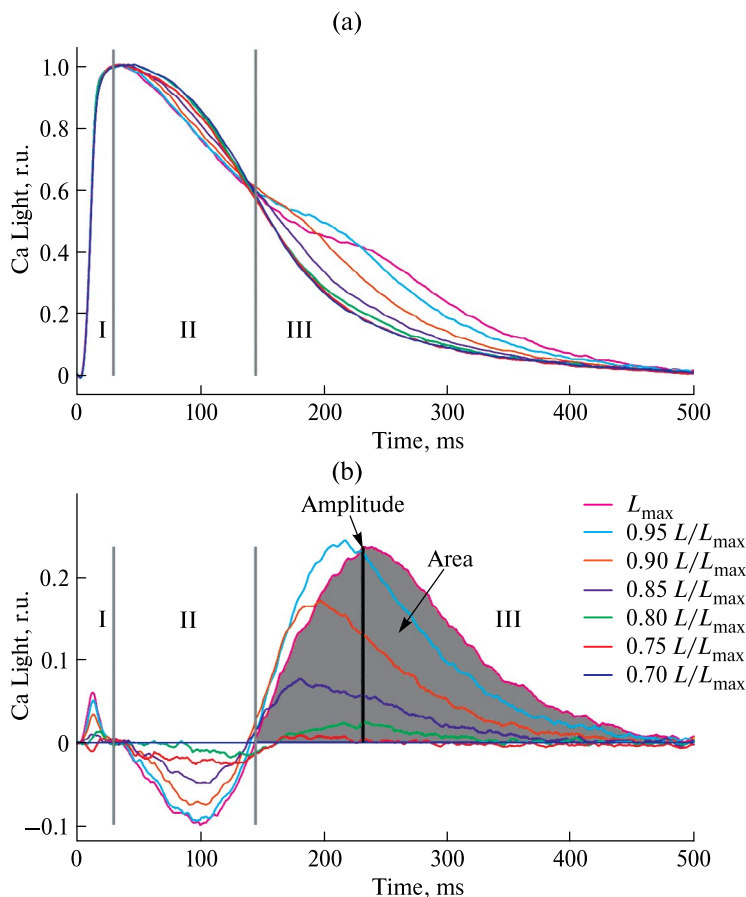
Трансмембранные потенциалы действия кардиомиоцитов регистрировали в изолированных многоклеточных полосках желудочков плавающими стеклянными микроэлектродами (10–15 МОм), соединенными с высокоомным усилителем Intracellular Electrometer IE-210 (Warner Instrument Corporation, США). Заготовки боросиликатных микропипеток готовили с помощью KOPF needle/pipette puller model 730 (David KOPF Instruments, Калифорния, США). Изготовленные микропипетки заполняли трехмолярным раствором KCl с помощью вакуумного насоса и водяной бани. Далее микроэлектроды подключали к внешнему согласующему блоку измерительной системы с помощью тонкого хлорсеребряного провода. Выносной блок согласователя измерительной системы крепили на микроманипуляторе (NARISHIGE, Model MM-3, Япония). Потенциал действия регистрировали на пяти уровнях растяжения (0.8, 0.85, 0.9, 0.95 и  $1.0 L_{\max}$ ) изолированных мышечных препаратов правого желудочка.

*Регистрация флуоресценции внутриклеточного красителя fura-2 AM*

Изменение относительной концентрации ионов свободного кальция (кальциевого перехода, CaT) в цитозоле кардиомиоцитов изолированных многоклеточных полосок правого желудочка во время сокращения регистрировали с помощью свечения кальций-связывающего флуоресцентного красителя fura-2/AM (5 мкМ, Sigma-Aldrich, США) и Pluronic F-127, способствующего проникновению флуорофора сквозь плазматическую мембрану (0.2%, Sigma-Aldrich, США). Перфузию этим раствором производили в темноте в течение 40 мин, после чего омывающий раствор вновь заменяли на стандартный раствор Кребса без флуорофора. Измерения начинали через 30 мин после замены раствора. Оптическую регистрацию свечения флуорофора в мышце выполняли с помощью системы для исследования мышечной активности (Muscle Research System, Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия) на базе инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения флуорофора fura-2/AM использовали широкополосную ртутную лампу и систему вращающихся узкополосных светофильтров с длиной волны пропускания 340 и 380 нм (Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия). Световой поток эмиссии флуорофора направляли на светоделительный кубик с полосой пропускания 510/590 нм (FilterSet #21HE, Carl Zeiss, Германия). Одновременную регистрацию механического ответа и кривую кальциевого перехода в мышце с временным дискретом 1 мс выполняли с помощью АЦП/ЦАП L-502 (L-CARD, Россия), связанного с персональным компьютером. Для онлайн-измерений использовали собственный пакет программного обеспечения, работа которого была реализована в ОС Windows 7. Измерения выполнены при частоте электрической стимуляции 2 Гц и температуре раствора 30 °С.

Кривая кальциевого перехода отражает изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме кардиомиоцитов в ходе изометрического сокращения многоклеточных полосок миокарда. При анализе влияния изменения длины мышечных полосок на кинетику разных участков спада кальциевого перехода оценивали влияние величины преднагрузки на характер и степень утилизации кальция миофиламентами разработанным и верифицированным нами ранее методом разности кривых кальциевых переходов. Суть метода состоит в определении разницы амплитуд участков Ca-переходов (нормированных на собственную амплитуду) (рис. 1а), возникающих при растяжении миокарда относительно Ca-перехода на малой длине [14]. Метод позволяет анализировать кинетику кальций-тропонинового взаимодействия в разные фазы CaT, т.е. до пика кальциевого перехода и после этого пика. Этим методом выделили три сегмента: I (положительный) – соответствует процессу увеличения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле в ответ на стимул, II – отрицательный, соответствует началу процесса взаимодействия кальция с миофиламентами и поглощению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля контрактильными белками

и III – положительный, соответствует процессу диссоциации  $\text{Ca}^{2+}$  от контрактильных белков и его выведению из межмиофиламентарного пространства (рис. 1b).



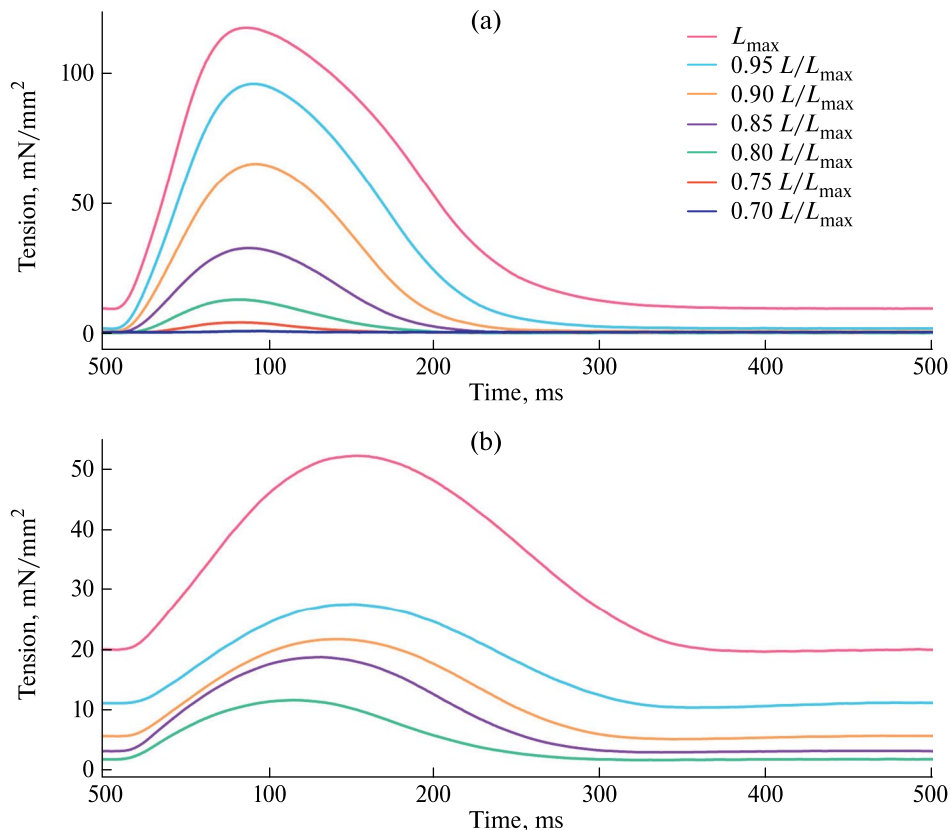
**Рис. 1.** Метод кривых разностей. (а) – суперпозиция репрезентативных записей CaT, нормированных на собственную амплитуду, полученных при разных длинах полоски миокарда правого желудочка группы молодых (1 месяц) самцов крыс. (б) – суперпозиция кривых разностей CaT. I, II, III – сегменты CaT. Величины длин обозначены разными цветами и приведены справа в легенде к рисунку. Раствор К-Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц.

### 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. Поскольку данные не имели нормального распределения, то применяли непараметрический U-тест Манна–Уитни для оценки различий между возрастными группами на разных длинах. Для оценки влияния возраста применяли непараметрический тест ANOVA Фридмана с последующим попарным апостериорным сравнением Коновера и использованием поправки Хольма на множественные сравнения. Различия при  $p < 0.05$  считались статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

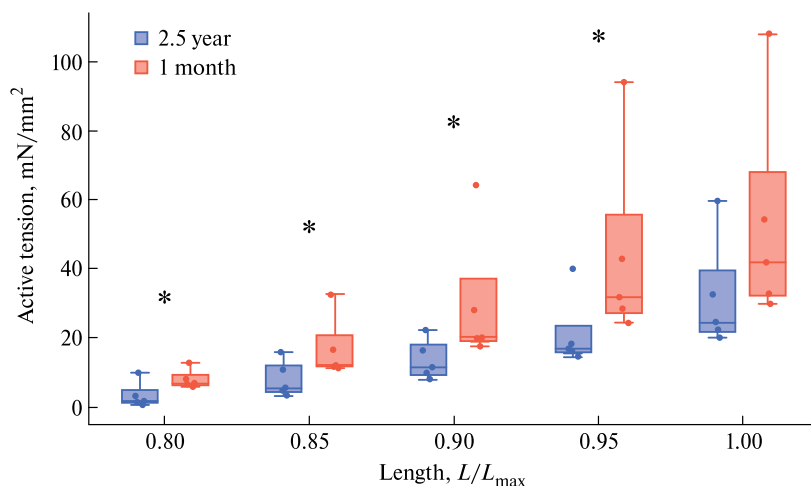
*Сравнительное исследование характеристик механического напряжения полосок миокарда желудочка от величины преднагрузки в изометрическом режиме*



**Рис. 2.** Суперпозиции репрезентативных записей механического напряжения в изометрическом режиме, полученных при различных длинах полоски миокарда правого желудочка групп молодых (1 месяц, панель (а)) и старых (2.5 года, панель (b)) самцов крыс. Величины длин обозначены разными цветами и приведены справа в легенде к рисунку. Раствор К-Х,  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц.

При суперпозиции кривых одиночного сокращения в изометрическом режиме на разных длинах полосок миокарда правого желудочка молодых крыс обнаружили почти двукратное превышение величины изометрического напряжения и существенно меньшую длительность одиночного цикла по сравнению с таковыми у старых крыс (рис. 2, 3).

Наибольшие изменения величины активного напряжения в изометрическом режиме при действии механизмов гетерометрической регуляции силы (аналог закона Франка–Старлинга) наблюдаются между группами молодых и старых животных. Практически во всем диапазоне длин миокарда амплитуда активного механического напряжения в полосках старых крыс достоверно ниже, чем у молодых (рис. 3). Так, величина механического напряжения (отношения величин силы к площади поперечного сечения полоски) при величине преднагрузки  $0.95 L_{\max}$  в препаратах желудочка группы молодых крыс 1-месячного возраста достигает Ме (Q1, Q3) 31.4 (27.0, 55.3) кПа, а у старых при достижении возраста 2.5 года падает до Ме (Q1, Q3) 16.5 (15.3, 23.4) кПа (рис. 3).



**Рис. 3.** Графики зависимости величин активного изометрического напряжения полоски миокарда правого желудочка самцов крыс от длины. Группы: молодые (1 месяц,  $n = 5$ ) – красный цвет, старые (2.5 года,  $n = 5$ ) – синий цвет. Раствор К–Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц. \* – различия между группами статистически значимы при  $p < 0.05$ , Манна–Уитни U-тест. Данные представлены в виде ящичных диаграмм, совмещенных с диаграммами рассеяния, ящик – 25–75%, горизонтальная черта внутри ящика – медиана, усы – минимум и максимум, точки – индивидуальные значения.

С увеличением длины полосок миокарда правого желудочка крыс обеих возрастных групп максимальная величина скорости развития и расслабления механического напряжения падает (рис. 4). В абсолютных значениях нормированные на амплитуду сокращения величины максимальной скорости развития и расслабления ( $(dF/dT) / F_{max}$ ) полосок миокарда молодых крыс на больших длинах достоверно выше, чем таковые в группе старых крыс (рис. 4).

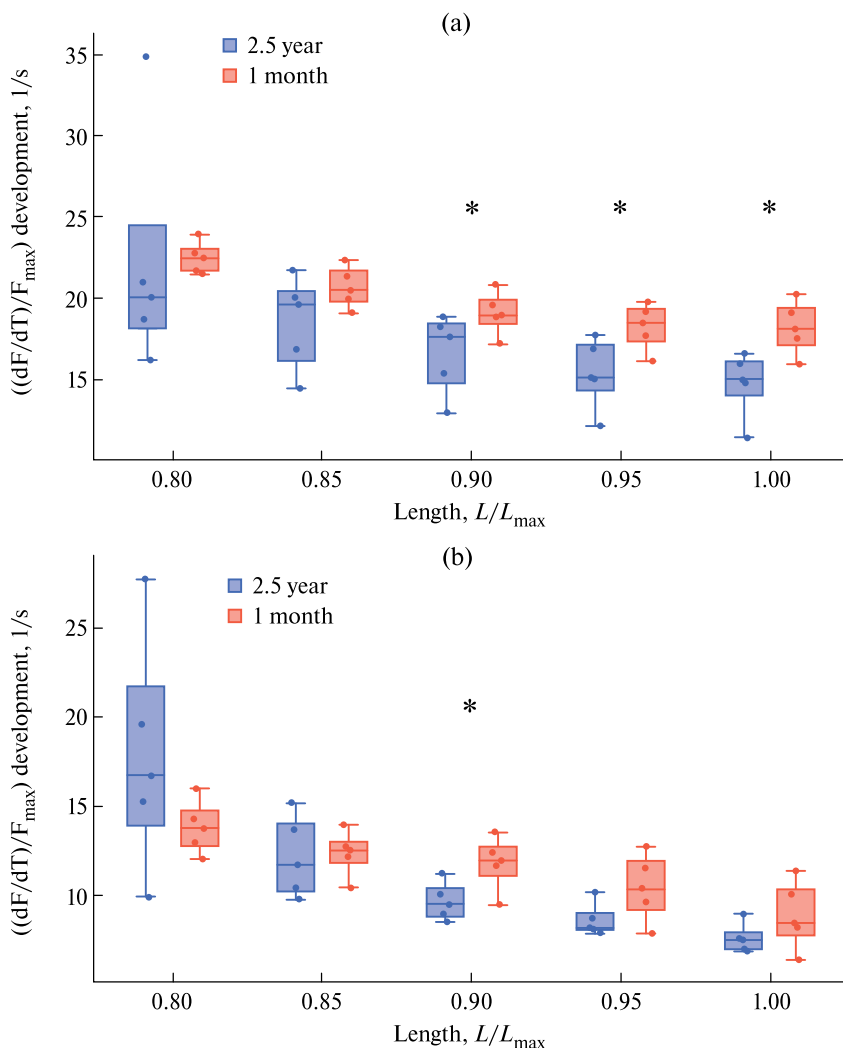
Следовательно, и временные характеристики механического ответа (такие как время достижения максимума (ВДМ) величины механического напряжения и времени расслабления на уровне половины амплитуды (T50)) больше в группе крыс старшего возраста во всем диапазоне длин полосок (рис. 5).

Так, на длине  $0.95 L_{max}$  Ме (Q1, Q3) ВДМ одиночных изометрических сокращений полосок желудочка старых крыс равны 113 (102.8, 134.3) мс, а молодых 95 (89.5, 99.75) мс. T50 на длине  $0.95 L_{max}$  у старых крыс Ме (Q1, Q3) 87 (77, 93.8) мс, а у молодых – 75 (65.3, 82.3) мс на этой же длине.

#### *Сравнительное исследование характеристик трансмембранного потенциала действия кардиомиоцитов полосок миокарда желудочка от величины преднагрузки в изометрическом режиме*

Траектории трансмембранных ПД в кардиомиоцитах желудочков старых крыс характеризуются несколько более крутой фазой начальной реполяризации и существенно более замедленной фазой конечной реполяризации по сравнению с ПД группы молодых крыс (рис. 6).

Отмеченные особенности развития траектории ПД сохраняются при всех значениях длины. Увеличенная длительность ПД с возрастом более выражено проявляется в кардиомиоцитах желудочка и не зависит от величины преднагрузки (длины) (рис. 6). Отсюда следует, что вклад изменения длительности трансмембранного потенциала действия в прирост амплитуды механического напряжения в кардиомиоцитах правого желудочка практически отсутствует в этих возрастных группах самцов крыс.

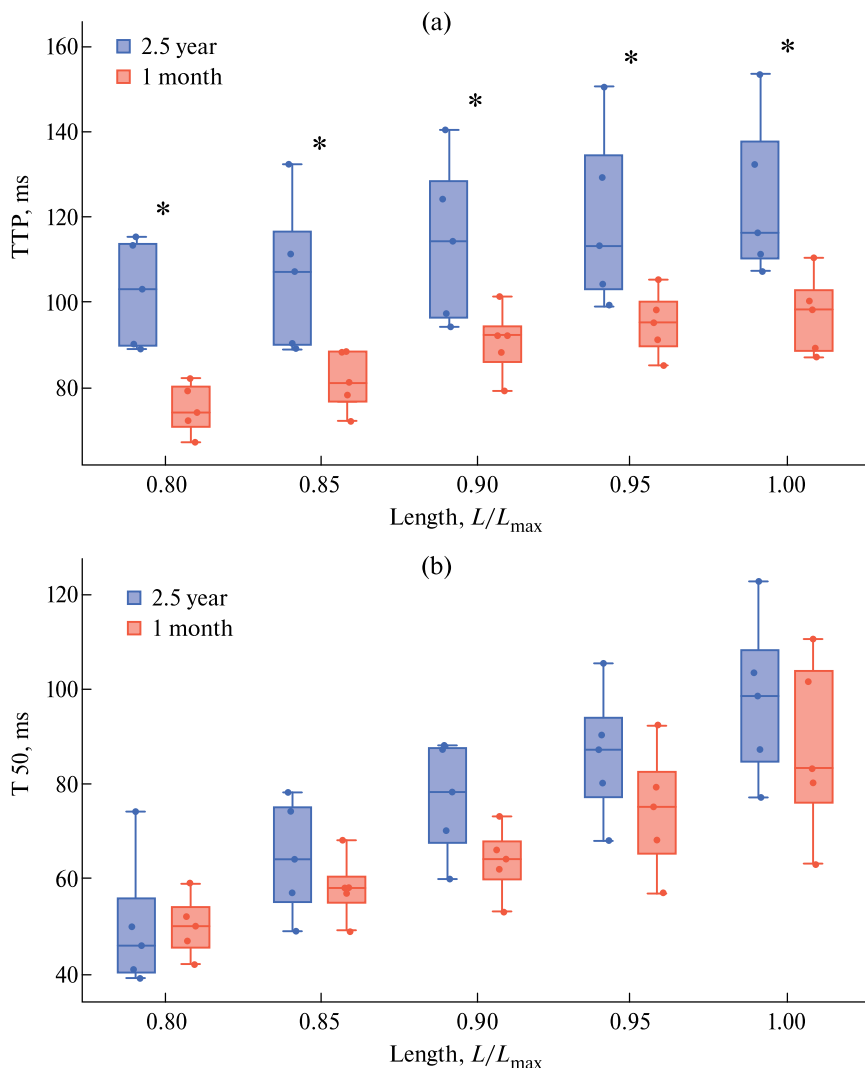


**Рис. 4.** Зависимости величин максимальной скорости развития (а) и расслабления (б) активного изометрического напряжения полоски миокарда правого желудочка самцов крыс от длины. Группы: молодые (1 месяц,  $n = 5$ ) – красный цвет, старые (2.5 года,  $n = 5$ ) – синий цвет. Раствор К–Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц. \* – различия между группами статистически значимы при  $p < 0.05$ , Манна–Уитни U-тест. Данные представлены в виде ящичных диаграмм, совмещенных с диаграммами рассеяния, ящик – 25–75%, горизонтальная черта внутри ящика – медиана, усы – минимум и максимум, точки – индивидуальные значения.

#### *Сравнение сократительных свойств и характеристик кальциевого перехода трабекул правого желудочка здоровых крыс разных возрастных групп*

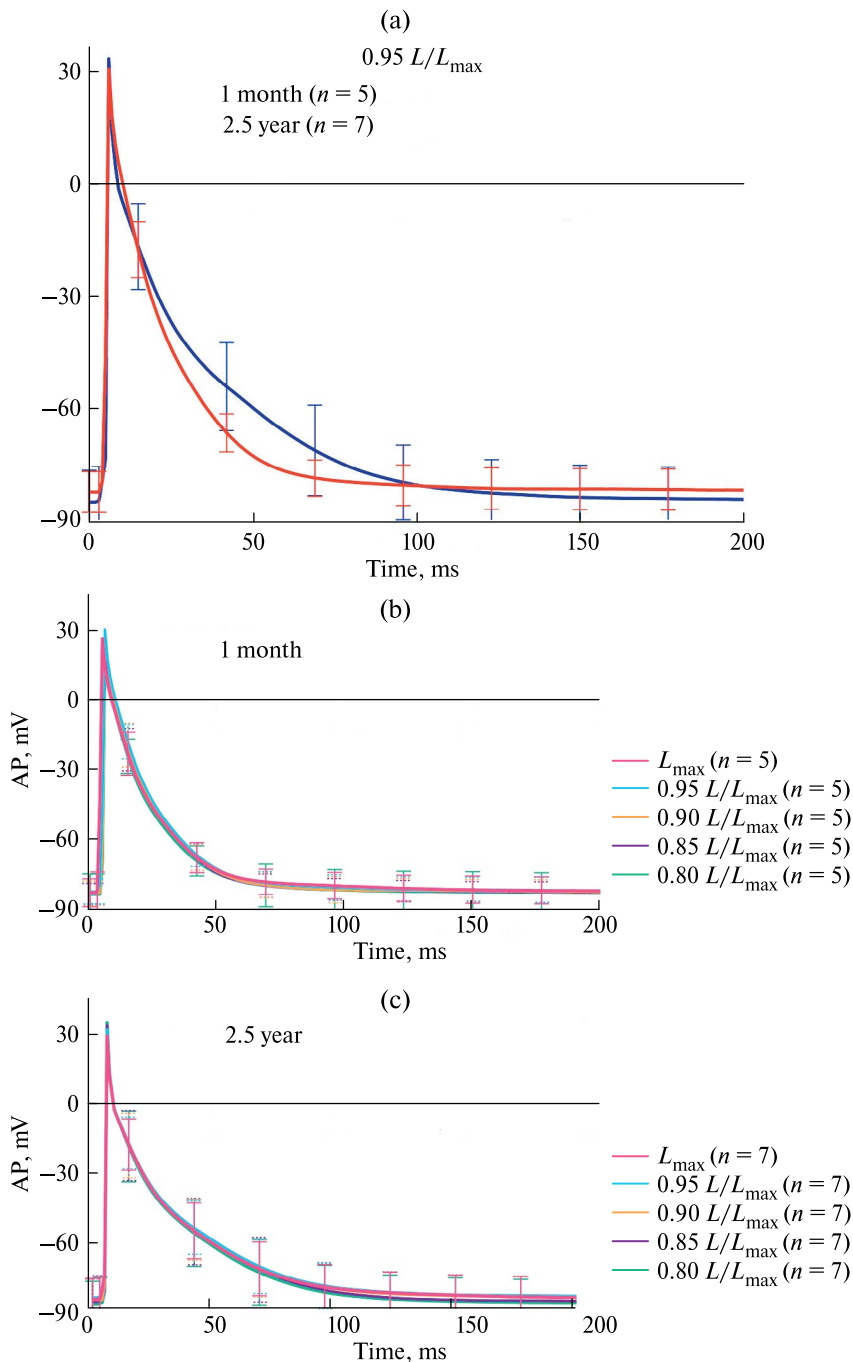
Высокая вариабельность абсолютных значений амплитуды СаТ и диастолического уровня кальция в разных препаратах миокарда связана с ограничением методики. Вариабельность обусловлена разной геометрией полосок (толщиной и длиной), площадью свечения и эффектом смещения исследуемого участка миокарда при сокращении. Поэтому, как и большинство современных авторов, для оценки использовали нормированные значения параметров СаТ на величину собственной амплитуды сигнала свечения (рис. 7).



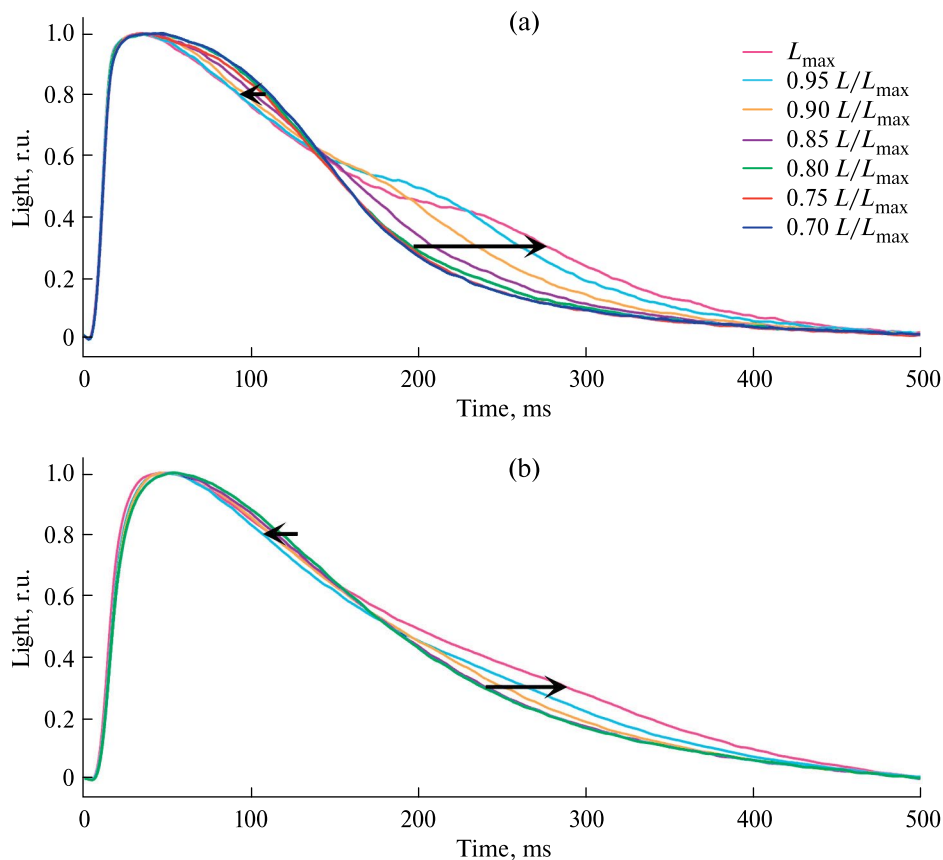


**Рис. 5.** Диаграммы зависимости времени достижения максимума силы ВДМ (а) и времени до половины амплитуды расслабления T50 (б) изометрических сокращений миокарда правого желудочка от длины препарата миокарда самцов крыс. Группы: молодые (1 месяц,  $n = 5$ ) – красный цвет, старые (2.5 года,  $n = 5$ ) – синий цвет. Раствор К–Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц. \* – различия между группами статистически значимы при  $p < 0.05$ , Манна–Уитни U-тест. Ящичные диаграммы совмещены с диаграммами рассеяния, ящик – 25–75%, горизонтальная черта внутри ящика – медиана, усы – минимум и максимум, точки – индивидуальные значения.

Для оценки изменения длительности CaT в верхней половине амплитуды использовали показатель времени спада CaT от пика на 30% амплитуды (T30 Ca). Увеличение преднагрузки не оказывает статистически значимого влияния на T30 Ca в обеих исследуемых возрастных группах,  $p > 0.05$ , ANOVA Фридмана. T30 Ca у полосок желудочка больше в группе старых крыс 2.5-летнего возраста по сравнению с группой молодых крыс. При этом статистически значимые различия получены для преднагрузок  $0.8\text{--}0.95 L_{\max}$  (рис. 8а). На преднагрузке  $0.95 L_{\max}$  разница медиан T30 Ca между группами была около 9%, так, Me (Q1, Q3) в мс составили 86 (80.8, 102) для старых крыс и 79 (77, 83) для



**Рис. 6.** Трансмембранные потенциалы действия. (а) – суперпозиция усредненных траекторий трансмембранного потенциала действия в изометрическом режиме кардиомиоцитов изолированных полосок трабекул правого желудочка самцов крыс на длине полосок миокарда 0.95  $L_{\max}$ . Группы: молодые (1 месяц) – красный цвет, старые (2.5 года) – синий цвет. Справа суперпозиция усредненных ПД на разных длинах в группах молодых (b) и старых (c) крыс. Раствор К-Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц. Приведена величина среднего значения  $\pm SD$ .

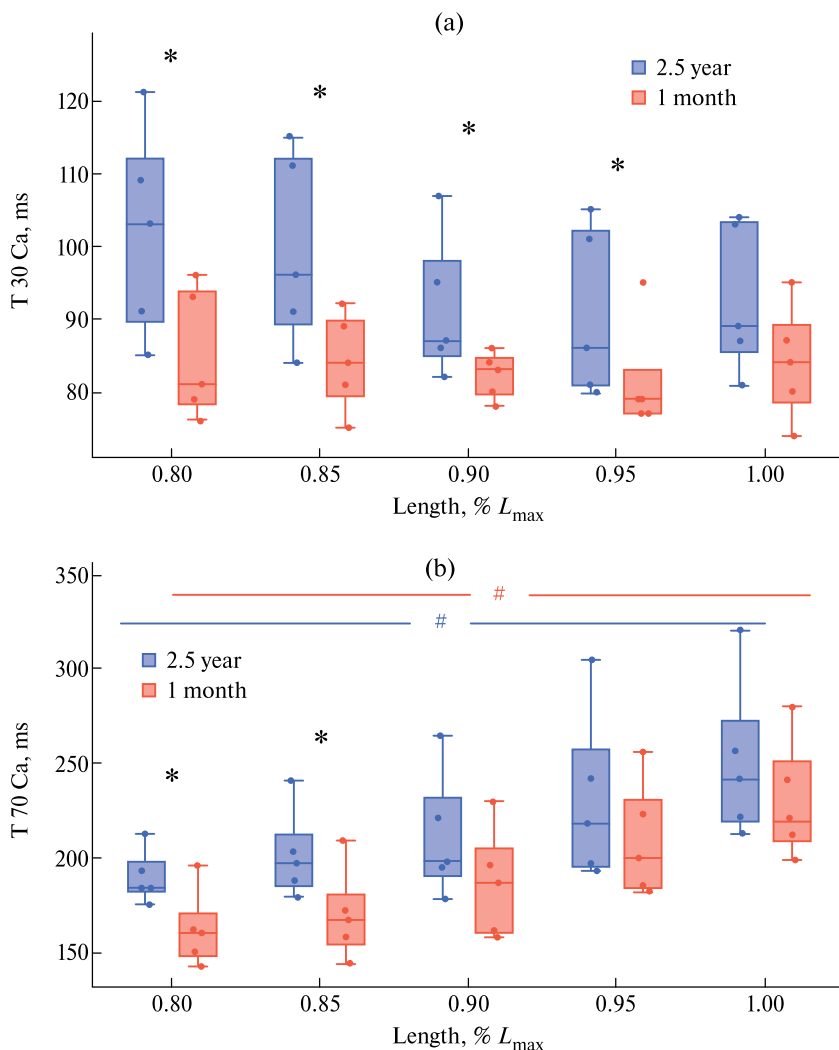


**Рис. 7.** Суперпозиция репрезентативных траекторий CaT на разных длинах (см. легенду) в изометрическом режиме сокращения изолированных трабекул правого желудочка молодых крыс – 1 месяц (а) и старых – 2.5 года (б). Раствор К–Х,  $t = 30^\circ\text{C}$ , частота стимуляции 2 Гц. Стрелками показаны направления изменения сегментов CaT с увеличением длины полосок.

молодых крыс. Для оценки изменения CaT в нижней половине амплитуды использовали показатель времени спада CaT от пика на 70% амплитуды (T70 Ca). Увеличение преднагрузки статистически значимо увеличивало T70 Ca в обеих исследуемых возрастных группах,  $p < 0.05$ , ANOVA Фридмана. T70 Ca больше в группе старых крыс 2.5-летнего возраста по сравнению с группой молодых крыс. Однако статистически значимые различия получены только для преднагрузок 0.8 и  $0.85 L_{\max}$  (рис. 8б).

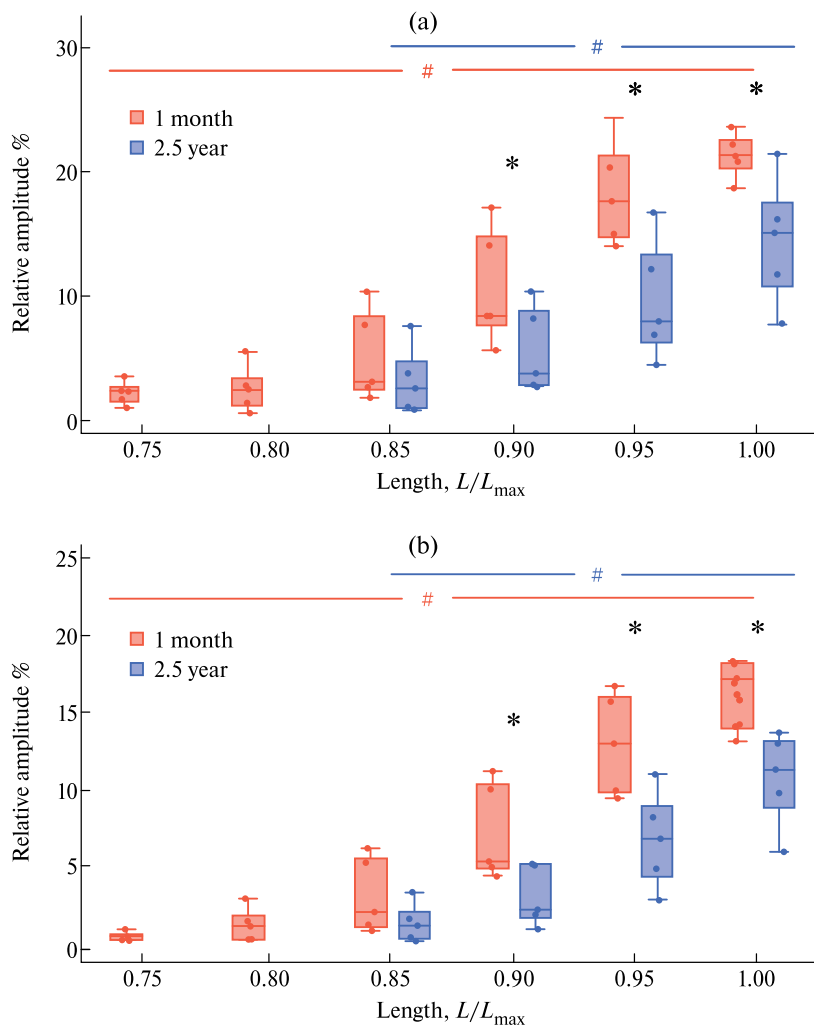
Увеличение преднагрузки (длины) сопровождается ростом величины вариации относительной амплитуды и площади сегмента (II) кривых разностей CaT обеих возрастных групп. Однако это не оказывает статистически значимого влияния на величины относительной амплитуды и площади сегмента (II) кривых разностей CaT обеих возрастных групп, ANOVA Фридмана,  $p > 0.05$ . Кроме того, не обнаружено статистически значимых различий как относительной амплитуды, так и площади сегмента (II) кривых разностей CaT между группами, Манна–Уитни U-тест,  $p > 0.05$ .

Увеличение преднагрузки (длины) статистически значимо увеличивало относительную амплитуду и площадь сегмента (III) кривых разностей CaT в полосках миокарда обеих возрастных групп (рис. 9а, б), ANOVA Фридмана,  $p < 0.05$ . В диапазоне преднагрузок 0.9–1  $L_{\max}$  выявлены статистически значимые различия как для относительной



**Рис. 8.** Графики зависимости времени спада на 30% амплитуды CaT (a) и времени спада на 70% амплитуды CaT (b) от величины преднагрузки, полученные для трабекул правого желудочка крыс разных возрастных категорий: молодых (1 месяц,  $n = 5$ ) – красный цвет и старых (2.5 года,  $n = 5$ ) – синий цвет. \* – различия между группами статистически значимы при  $p < 0.05$ , Манна–Уитни U-тест. # – различия для разных длин статистически значимы при  $p < 0.05$ , ANOVA Фридмана. Данные представлены в виде ящичных диаграмм, совмещенных с диаграммами рассеяния, ящик – 25–75%, горизонтальная черта внутри ящика – медиана, усы – минимум и максимум, точки – индивидуальные значения.

амплитуды, так и для относительной площади сегмента (III) кривых разностей CaT между группами молодых и старых крыс (рис. 9a, b), Манна–Уитни U-тест,  $p < 0.05$ . Так, например, медиана относительной амплитуды сегмента (III) кривых разностей CaT на длине  $L_{max}$  на 29.3% меньше в группе старых крыс по сравнению с молодыми, Me (Q1, Q3) в % составили: 15 (10.7, 17.4) для старых крыс и 21.2 (20.2, 22.4) для молодых крыс. Медиана относительной площади сегмента (III) кривых разностей CaT на длине  $L_{max}$  на 34.3% меньше в группе старых крыс по сравнению с молодыми, Me (Q1, Q3) в % составили: 11.3 (8.9, 13.2) для старых крыс и 17.2 (14, 18.3) для молодых крыс.



**Рис. 9.** Графики зависимости амплитуды сегмента III кривых разностей кальциевых переходов (а), относительной площади сегмента III кривых разностей кальциевых переходов (б), полученных для мышц правого желудочка здоровых крыс разных возрастных категорий: молодых (1 месяц,  $n = 5$ ) – красный цвет и старых (2.5 года,  $n = 5$ ) – синий цвет. Амплитуда/относительная площадь кривой разности кальциевых переходов для каждой данной преднагрузки представлены в условных величинах относительно амплитуды/интегральной величины кальциевого перехода при этой же преднагрузке. \* – различия между группами статистически значимы при  $p < 0.05$ , Манна–Уитни U-тест. # – различия между разными длинами статистически значимы при  $p < 0.05$ , ANOVA Фридмана. Данные представлены в виде ящичных диаграмм, совмещенных с диаграммами рассеяния, ящик – 25–75%, горизонтальная черта внутри ящика – медиана, усы – минимум и максимум, точки – индивидуальные значения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании были применены разные методические подходы, которые позволяют косвенно изучать проявление различных по природе молекулярно-клеточных механизмов регуляции сократительной активности в миокарде: изменение длительности мембранного потенциала кардиомиоцитов, кооперативную активацию миофиламентов

и кальций-тропониновое взаимодействие при изменении степени актин-миозинового перекрестия (в протоколе “длина–сила”) и внутриклеточный кальциевый цикл.

В работе [15] было показано, что в папиллярных мышцах левого желудочка, выделенных у 6-, 15-, 27- и 32-месячных крыс Sprague-Dawley, в миотермических экспериментах при 27 °C при частоте стимулов 0.167 Гц, в изотонических экспериментах производимая работа (в диапазоне постнагрузок) была значительно снижена для группы от 27 до 32 месяцев, составляя всего 52% от производительности 6-месячной группы. Этот результат был обусловлен уменьшением как степени укорочения мышц, 66% от 6- и 15-месячных крыс, так и максимальной развиваемой силы. Уменьшение работы сопровождалось параллельным снижением энергопотребления (энтальпии) и, следовательно, чистый механический КПД (работа/активная энтальпия  $\times 100\%$ ) не изменился. Не было изменений в механических характеристиках или эффективности сердечной мышцы у молодых (6-месячных) или взрослых (15-месячных) крыс. Однако у старых и стареющих крыс (27–32-месячных) наблюдалось выраженное снижение развития напряжения и способности к сокращению, приводящее к падению производимой работы. Механическая и сократительная эффективность тем не менее оставались неизменными в пожилом возрасте. Эти результаты напоминают данные, полученные при гипертрофии перегрузки давлением [15].

Нами впервые показано существенное преобладание величины механического напряжения в полосках правого желудочка молодых крыс в сравнении со старыми (рис. 3).

Показанное нами замедление реполяризации ПД согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями. Так, например, возрастные изменения длительности ПД наблюдаются в миокарде желудочков [16], предсердий [17], а также в нервных клетках неокортекса человека [18]. Вероятно, увеличение длительности ПД при старении является общим свойством возбудимых тканей.

Известно, что за фазу реполяризации ПД отвечают в основном исходящий потенциал-зависимый медленный калиевый ток, обратный захват ионов Са из цитоплазмы в саркоплазматический ретикулум (СР) насосом SERCA2 и выход Са наружу через Na/Ca обменник. Логично предположить, что уменьшение исходящего калиевого тока должно привести к увеличению длительности ПД, однако в литературе имеются противоречивые данные на этот счет. Так, возрастное снижение амплитуды и изменение формы плато ПД связывают с увеличением преходящих, направленных наружу, токов в миокарде предсердий пожилых людей. Кроме того, блокада потенциал-зависимых калиевых каналов 4-аминопиридином приводила не только к увеличению амплитуды ПД в миокарде предсердий пожилых и молодых людей, но и к уменьшению длительности APD90 [19]. Стоит отметить, что эти данные получены на образцах патологически измененного миокарда, полученных в ходе хирургических операций. По другим данным, в кардиомиоцитах желудочка крыс наблюдается уменьшение плотности исходящего калиевого тока с возрастом [20].

Возрастное снижение активности SERCA2, секвестрирующей  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде грызунов, было хорошо документировано как биохимическими исследованиями изолированных везикул SR, так и биофизическими исследованиями сердечных препаратов [21–23]. Эти данные свидетельствуют о вкладе кальциевого тока в замедление ПД.

Отметим, что обнаруженное отсутствие влияния изменения длины полосы миокарда правого желудочка контрольной группы самцов крыс разного возраста на длительность ПД позволяет исключить его из рассмотрения внутриклеточных механизмов длинозависимой регуляции сокращений крыс (рис. 6b, c). При этом выявлены возрастные изменения длительности ПД (рис. 6a), которые согласуются с результатами, полученными на предсердном миокарде [17].

Возрастные изменения в циклировании кальция были четко задокументированы несколькими группами [24–26]. При стимулировании  $\beta$ -адренорецепторов были показаны возрастные изменения в кальциевом переходе на фоне пониженной способности

к увеличению кальциевого перехода в стареющих сердцах [26]. Наблюдаются изменения в клеточной кинетике  $\text{Ca}^{2+}$  [25, 26], но данные в отношении систолического  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  не согласуются [27], скорость оборота поперечных мостиков снижается [28, 29].

Возрастные различия характеристик спада кальциевого перехода статистически значимы в верхней части CaT, T30 Ca миокарда ПЖ молодых крыс. Так, на длине  $0.95 L_{\max}$  длительность CaT приблизительно на 9% короче такового у старых крыс (рис. 8a). Это может свидетельствовать о более быстром связывании ионов Ca регуляторными белками тонкой нити и/или выведении ионов Ca из цитоплазмы (фаза II). Также стоит отметить отсутствие влияния длины на время спада CaT на 30% амплитуды в миокарде ПЖ как молодых, так и старых крыс. Несмотря на наличие статистически значимых различий длительности спада CaT в верхней половине его амплитуды между группами, в нижней части амплитуды CaT различия найдены только в начальном диапазоне длин ( $0.8\text{--}0.85 L_{\max}$ ) (рис. 8b). Следовательно, при степени растяжения миокарда более  $0.85 L_{\max}$  диссоциация ионов Ca от регуляторных белков тонкой нити не зависит от возрастных изменений, что косвенно отражается в отсутствии значимых различий показателей расслабления механического напряжения ( $(dF/dT)/F_{\max}$ , relaxation, T50) на длинах, близких к  $L_{\max}$  (рис. 4, 5). Влияние растяжения на длительность CaT в нижней части его амплитуды (фаза III), напротив, выявлено для обеих исследуемых групп (рис. 8b). Помимо длительности CaT, мы оценили длинозависимые амплитудные изменения нормированных CaT с помощью метода разности кривых CaT. Обнаружено, что в миокарде обеих исследуемых групп растяжение не оказывает влияния на относительные амплитуду и площадь сегмента II, ответственного за связывание ионов Ca с регуляторными белками тонкой нити. Кроме того, нет статистически значимой разницы этих показателей между группами молодых и старых крыс.

Однако, несмотря на отсутствие межгрупповой разницы показателей длительности спада CaT в нижней половине его амплитуды (T70 Ca), наблюдается существенная межгрупповая разница для показателей относительных амплитуды и площади сегмента III, отвечающего за диссоциацию ионов Ca от регуляторных белков тонкой нити (рис. 9a, b). Итак, изменение длительности спада (T70 Ca) и амплитуды III сегмента разницы CaT в миокарде ПЖ молодых крыс более чувствительно к растяжению. Вероятно, это связано с тем, что процесс распада комплексов тропонина C + Ca ( $\text{TnC} + \text{Ca}$ ) и секвестрации Ca саркоплазматическим ретикуломом в миокарде ПЖ слабо связан с возрастными изменениями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что наиболее выраженные изменения в зависимости силы изометрических сокращений от длины полосок миокарда правого желудочка молодых крыс происходят при больших величинах длины относительно группы старых крыс. Величина механического напряжения желудочка молодых крыс превышает напряжение миокарда в группе старых крыс.

Впервые обнаружено замедление длительности и скорости развития механического напряжения в полосках правого желудочка старых крыс, по сравнению с группой молодых крыс, во всем диапазоне длин. Однако время расслабления изометрического напряжения до половины амплитуды и максимальная скорость расслабления практически не зависят от возраста.

Трансмембранные потенциалы действия в кардиомиоцитах правого желудочка проявляются в замедлении фазы медленной реполяризации с возрастом.

Скорость связи Ca с TnC не зависит от длины и у молодых, и у старых, но зависит от возраста.

Скорость распада  $\text{Ca} + \text{TnC}$  комплексов зависит от длины и у молодых, и у старых животных. Эта зависимость более выражена у молодых животных. Однако скорость распада  $\text{Ca} + \text{TnC}$  комплексов не зависит от возраста при растяжении миокарда, близком к  $L_{\max}$ .

## ВЫВОДЫ

Из совокупности полученных данных можно сделать общий вывод, что миокард правого желудочка крыс претерпевает существенные изменения с возрастом: снижается скорость развития изометрического напряжения, увеличивается длительность потенциала действия и кальциевого перехода. Зависимость параметров механического напряжения миокарда с возрастом сохраняется, хотя и слегка подавлена.

## ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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 Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Руководством по использованию лабораторных животных и уходу за ними Национального института здравоохранения США (публикация NIH № 85-23, с поправками 1985 г.) и в соответствии с правилами этического комитета Института иммунологии и физиологии, 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. *Saner H* (2005) [Cardiovascular system and aging]. *Ther Umsch* 62: 827–835.  
<https://doi.org/10.1024/0040-5930.62.12.827>
2. *Иванов ДО, Орел ВИ, Александрович ЮС, Пшениснов КВ, Ломовцева РХ* (2019) Заболевания сердечно сосудистой системы как причина смертности в Российской Федерации: пути решения проблемы. Медицина и организация здравоохранения 4: 4–12. [*Ivanov DO, Orel VI, Aleksandrovich YuS, Pshenisnov KV, Lomovceva RH* (2019) Cardiovascular diseases as a cause of mortality in the Russian Federation: ways to solve the problem. *Medicina i organizaciya zdravooohraneniya* 4: 4–12. (In Russ)].
3. *Herman AB, Occean JR, Sen P* (2021) Epigenetic dysregulation in cardiovascular aging and disease. *J Cardiovasc Aging* 1: 10.  
<https://doi.org/10.20517/jca.2021.16>
4. *Lakatta EG, Yin FC* (1982) Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *Am J Physiol* 242: H927–H941.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1982.242.6.H927>



5. *Weisser-Thomas J, Nguyen Q, Schuettel M, Thomas D, Dreiner U, Grohé C, Meyer R* (2007) Age and hypertrophy related changes in contractile post-rest behavior and action potential properties in isolated rat myocytes. *Age (Dordr)* 29: 205–217.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-007-9040-1>
6. *Kusunose K, Yamada H, Nishio S, Ishii A, Hirata Y, Seno H, Saijo Y, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Soeki T, Wakatsuki T, Sata M* (2017) RV Myocardial Strain During Pre-Load Augmentation Is Associated With Exercise Capacity in Patients With Chronic HF. *JACC Cardiovasc Imaging* 10: 1240–1249.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2017.03.022>
7. *Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E* (1994) The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circulat Res* 74(5): 959–969.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.74.5.959>
8. *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>
9. *Wang X, Kallish N, Solaro RJ, Dong W-J* (2025) Ca<sup>2+</sup> sensitivity changes in skinned myocardial fibers induced by myosin–actin crossbridge-independent sarcomere stretch: Role of N-domain of MyBP-C. *J Mol Cell Cardiol* 202: 24–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2025.03.004>
10. *Лисин РВ, Балакин АА, Зудова АИ, Проценко ЮЛ* (2025) Исследование влияния длинозависимых изменений кинетики миозиновых мостиков на переходные процессы Ca<sup>2+</sup> в миокарде правого предсердия и правого желудочка крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 111(3): 522–541. [*Lisin RV, Balakin AA, Zudova AI, Protsenko YuL* (2025) Effect of Length-Dependent Changes in Myosin Cross-Bridge Kinetics on Calcium Transients in Right Atrial and Right Ventricular Myocardium of Rats. *Russ J Physiol* 111(3): 522–541. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813925030102>
11. The length-dependent activation of contraction is equally impaired in impuberal male and female rats in monocrotaline-induced right ventricular failure – Lookin – 2015 – Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology – Wiley Online Library.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1440-1681.12471>. Accessed 7 Aug 2025
12. *Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR* (1990) The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflugers Arch* 416: 219–221.  
<https://doi.org/10.1007/BF00370248>
13. *Kettlewell S, Walker NL, Cobbe SM, Burton FL, Smith GL* (2004) The electrophysiological and mechanical effects of 2,3-butane-dione monoxime and cytochalasin-D in the Langendorff perfused rabbit heart. *Exp Physiol* 89: 163–172.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2003.026732>
14. *Lookin O* (2020) The use of Ca-transient to evaluate Ca<sup>2+</sup> utilization by myofilaments in living cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 47: 1824–1833.  
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13376>
15. *Kiriazis H, Gibbs CL* (2000) Effects of aging on the work output and efficiency of rat papillary muscle. *Cardiovasc Res* 48: 111–119.  
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00144-9)
16. *Weisser-Thomas J, Nguyen Q, Schuettel M, Thomas D, Dreiner U, Grohé C, Meyer R* (2007) Age and hypertrophy related changes in contractile post-rest behavior and action potential properties in isolated rat myocytes. *Age (Dordr)* 29: 205–217.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-007-9040-1>
17. *Huang C, Ding W, Li L, Zhao D* (2006) Differences in the aging-associated trends of the monophasic action potential duration and effective refractory period of the right and left atria of the rat. *Circ J* 70: 352–357.  
<https://doi.org/10.1253/circj.70.352>
18. *Szegedi V, Tiszlavicz Á, Furdan S, Douida A, Bakos E, Barzo P, Tamas G, Szucs A, Lamsa K* (2024) Aging-associated weakening of the action potential in fast-spiking interneurons in the human neocortex. *J Biotechnol* 389: 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.04.020>

19. *Escande D, Loisanse D, Planche C, Coraboeuf E* (1985) Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. *Am J Physiol* 249: H843–H850.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.249.4.H843>
20. *Walker KE, Lakatta EG, Houser SR* (1993) Age associated changes in membrane currents in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 27: 1968–1977.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/27.11.1968>
21. *Kaplan P, Jurkovicova D, Babusikova E, Hudecova S, Racay P, Sirova M, Lehotsky J, Drgova A, Dobrota D, Krizanova O* (2007) Effect of aging on the expression of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transport proteins in a rat heart. *Mol Cell Biochem* 301: 219–226.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-007-9414-9>
22. *Taffet GE, Tate CA* (1993) CaATPase content is lower in cardiac sarcoplasmic reticulum isolated from old rats. *Am J Physiol* 264: H1609–H1614.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.5.H1609>
23. *Xu A, Narayanan N* (1998) Effects of aging on sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am J Physiol* 275: H2087–H2094.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.6.H2087>
24. *Froehlich JP, Lakatta EG, Beard E, Spurgeon HA, Weisfeldt ML, Gerstenblith G* (1978) Studies of sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in young adult and aged rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 10: 427–438.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(78\)90364-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(78)90364-4)
25. *Orchard CH, Lakatta EG* (1985) Intracellular calcium transients and developed tension in rat heart muscle. A mechanism for the negative interval-strength relationship. *J Gen Physiol* 86: 637–651.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.86.5.637>
26. *Xiao RP, Spurgeon HA, O'Connor F, Lakatta EG* (1994) Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling. *J Clin Invest* 94: 2051–2059.  
<https://doi.org/10.1172/JCI117559>
27. *Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P* (1998) Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol* 30: 519–535.  
<https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0616>
28. *Fitzsimons DP, Patel JR, Moss RL* (1999) Aging-dependent depression in the kinetics of force development in rat skinned myocardium. *Am J Physiol* 276: H1511–H1519.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1511>
29. *Van der Velden J, Moorman AF, Stienen GJ* (1998) Age-dependent changes in myosin composition correlate with enhanced economy of contraction in guinea-pig hearts. *J Physiol* 507(Pt 2): 497–510.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.497bt.x>

## Features of Length-Dependent Changes in Calcium Transients in the Ventricular Myocardium in Rats of Different Ages

R. V. Lisin<sup>a,\*</sup>, A. A. Balakin<sup>a</sup>, D. A. Kuznetsov<sup>a</sup>, A. I. Zudova<sup>a</sup>, and Yu. L. Protsenko<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

*\*e-mail: lisin.ruslan@gmail.com*

The problem of cardiovascular regulation during aging has received insufficient attention, despite its high social significance. The common pathogenesis of cardiovascular regulation disorders in experimental animals and in elderly people makes it relevant to study the mechanisms of myocardial contractility regulation in a comparative experiment on laboratory animals of different ages. In order to establish the features of length-dependent mechanisms of healthy myocardial contractility regulation during aging, length-dependent changes in the characteristics of force, electrical activity and changes in the intracellular concentration of calcium ions (calcium transient or CaT) in the myocardium of the right ventricle of groups of young (1 month) and old (2.5 years) rats were assessed. The experiments were carried out on the trabeculae of the right ventricle of the hearts of male Wistar rats. In the isometric contraction mode, with varying degrees of stretching, the indices of mechanical tension, CaT and transmembrane action potentials (AP) were recorded. It has been experimentally established that old animal has a smaller amplitude of isometric tension, a lower rate of development of isometric tension, and a longer AP in comparison with young animals. For the first time, age-related features of length-dependent changes in the CaT curves obtained at different preloads of the ventricular myocardium, with their superposition, have been established. In old animals, the duration of the CaT decline by 30% of its amplitude is significantly greater than in young animals. The effect of the degree of acto-myosin overlap on the intracellular kinetics of calcium ions in the ventricular myocardium strips of rats of different ages has been shown, using the developed method of the difference of the curves of calcium transients. The relative amplitude and area of segment III of the CaT difference curves are significantly greater in young animals, in comparison with old ones.

**Keywords:** age-related changes, calcium transient, action potential, length dependence