

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Волжанинов Денис Александрович

РАЗРАБОТКА И СОЗДАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛИРОВАННЫХ
СЕРДЕЧНЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

1.3.2. Приборы и методы экспериментальной физики

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,
профессор Соловьёва Ольга Эдуардовна

кандидат физико-математических наук,
доцент Хохлова Анастасия Дмитриевна

Екатеринбург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДИК И ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОДИНОЧНЫХ ИЗОЛИРОВАННЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА.....	12
1.1 Кардиомиоцит. Строение и функция.....	12
1.2 Биомеханические характеристики кардиомиоцитов	16
1.3 Методики фиксации кардиомиоцитов	26
1.4 Обзор экспериментальных установок, использующих методику удержания кардиомиоцита карбоновыми волокнами	31
1.5 Изменение биомеханических характеристик кардиомиоцитов в патологических условиях	36
1.6 Математическая модель как инструмент исследования биомеханических характеристик кардиомиоцитов	40
1.7 Выводы по главе 1	46
ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА АППАРАТНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ	48
2.1 Формирование технического задания на экспериментальную установку	48
2.2 Предметный столик и экспериментальная ванночка	53
2.3 Система термостатирования	55
2.4 Контакт кардиомиоцит-карбоновое волокно-микроманипулятор	58
2.5 Система стимуляции кардиомиоцита электрическим импульсом	61
2.6 Система оптического контроля	63
2.7 Система цифрового микроманипулирования	65
2.8 Система аналогового микроманипулирования	68
2.9 Сигнальные цепи экспериментальной установки.....	70
2.10 Выводы по главе 2	72
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ УПРАВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ	75
3.1 Среда разработки LabVIEW	75
3.2 Формирование технического задания на программное обеспечение.....	76
3.3 Программное обеспечение управления системой цифрового микроманипулирования.....	81
3.3.1 Модуль изучения зависимостей «длины-напряжения».....	81
3.3.2 Модуль управления режимом сокращения кардиомиоцита.....	86
3.3.3 Модуль изучения вязкоупругих свойств.....	91

3.4 Программное обеспечение управления системой аналогового микроманипулирования.....	93
3.4.1 Модуль управления режимом сокращения кардиомиоцита.....	93
3.5 Выводы по главе 3.....	96
ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ И РЕЗУЛЬТАТЫ БИОФИЗИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	97
4.1 Описание биологического объекта и экспериментальных протоколов.....	97
4.1.1 Постановка экспериментальной модели СД1	98
4.1.2 Изоляция кардиомиоцитов	98
4.1.3 Статистические методы	101
4.1.4 Разработка экспериментальных протоколов для исследования характеристик механической функции кардиомиоцитов.....	101
4.2 Тестовые эксперименты	106
4.2.1 Аprobация разработанного программного комплекса управления системой цифровых микроманипуляторов.....	106
4.2.2 Аprobация разработанного программного комплекса управления системой аналоговых пъезодвигателей	107
4.3 Биофизические исследования региональных особенностей активных сократительных свойств кардиомиоцитов в норме и при экспериментальном СД1	111
4.3.1 Исследование влияния режима сокращения.....	111
4.3.2 Исследование зависимостей «длины-напряжения» в норме и при экспериментальном СД1	116
4.4 Биофизические исследования региональных особенностей пассивных вязкоупругих свойств кардиомиоцитов в норме и при экспериментальном СД1	119
4.5 Математическое моделирование региональных особенностей сократительных свойств кардиомиоцитов в норме	122
4.6 Выводы по главе 4.....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются одной из основных причин смертности от болезней в Российской Федерации и во всем мире [62]. Для понимания законов функционирования сердечной мышцы в норме и их нарушений при патологии необходимо изучение фундаментальных механизмов регуляции сократительной функции сердца.

С точки зрения физики сердце является эластичным резервуаром, кровяным насосом, состоящим более чем на 30% из мышечных клеток – кардиомиоцитов и из других типов клеток (фибробластов, эндотелиальных клеток, клеток иммунной системы и др. [13]). Пассивные свойства миокарда как вязко-упругой среды описываются вязкостным сопротивлением (вязкостью) R , податливостью C или эластичностью E , где эластичность обратно пропорциональна податливости [49, 75]. Активные сократительные свойства такого мышечного насоса можно описать следующими физическими параметрами: давление P и объем V в полостях камер сердца, их временными и амплитудными характеристиками [76].

При помощи закона Лапласа, связывающего давление на стенку емкости с напряжением стенки емкости, мы можем перейти от физических параметров объема желудочка сердца V и давления в желудочке сердца P к длине сердечной мышцы или мышечной клетки L и развиваемому напряжению сердечной мышцей или мышечной клеткой T [68].

Известно, что согласованная сократительная функция сердца является результатом гетерогенной активности кардиомиоцитов [43]. Левый и правый желудочек (ЛЖ и ПЖ) сердца перекачивают кровь в большой и малый круги кровообращения под разным давлением, имеют различную архитектуру – различную конфигурацию камер, объем и толщину стенок, специфическую организацию мышечных волокон. Такая сложная система, в которой кардиомиоциты ЛЖ и ПЖ подстраиваются под различные механические

условия сокращения, регулируется на молекулярном, клеточном уровнях организации, обеспечивая межжелудочковую синхронность сокращения [48].

При измерении сократительных свойств многоклеточных препаратов сложно оценить собственную функцию кардиомиоцитов, за счет того что эндотелиальная и соединительная ткани препаратов также вносят вклад в механическую функцию [63]. Измерения на изолированных кардиомиоцитах позволяют устранить влияние внешних по отношению к мышечным клеткам факторов, связанных с вышеперечисленными проблемами, и проанализировать физические параметры именно сократительного компонента сердечной мышцы.

Линейные размеры кардиомиоцита, измеряемые десятками мкм, и развиваемое им напряжение, измеряемое единицами мН/мм², обуславливают высокие требования к измерительной аппаратуре и сложности экспериментальных методик. В миокардиальной ткани каждый кардиомиоцит в ходе его сокращения испытывает динамическую механическую нагрузку и адаптируется к ней, поэтому в эксперименте на изолированных клетках важно имитировать наличие нагрузки и изучать межжелудочковые особенности сократительного ответа механически нагруженных кардиомиоцитов. В исследованиях влияния механической нагрузки на сокращение миокарда можно выделить два основных механизма, обеспечивающих изменение напряжения, развиваемой сердечной мышцей. Первый – повышение развиваемой амплитуды активного напряжения при увеличении начальной длины кардиомиоцита, так называемая длинозависимая регуляция сократимости (закон Франка-Старлинга), второй – уменьшение амплитуды укорочения при увеличении механической нагрузки на кардиомиоцит, так называемая грузозависимая регуляция сократимости.

С начала 1980-х годов было изобретено множество различных методов для изучения физических свойств изолированных кардиомиоцитов [20, 70, 79], однако наивысшие показатели продуктивности экспериментальных

протоколов принадлежат методике фиксации кардиомиоцита карбоновыми волокнами [36].

На сегодняшний день в мире существует всего три функционирующих экспериментальных установки, измеряющие физические свойства кардиомиоцитов, две из которых используют карбоновые волокна: в Японии, университет Асахикава (проф. Г. Ирибэ) [35], и в Германии – университет Фрайбурга (проф. П. Коль) [51, 64]. В Российской Федерации на момент начала работы подобной установки не существовало.

В связи с недостатком экспериментальных установок и трудоемкостью реализации методик измерений активности кардиомиоцитов, в литературе мало известно о различиях в характеристиках сократительной функции механически нагруженных одиночных кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ.

Использование математической модели функции кардиомиоцита может позволить предсказать причины межжелудочковых отличий механической активности кардиомиоцита [8]. До настоящего времени не было разработано моделей, учитывающих функциональные особенности кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ при их механическом нагружении.

Объектом исследования данной работы являются изолированные одиночные сердечные мышечные клетки, кардиомиоциты.

Предметом исследования являются физические свойства кардиомиоцитов: амплитудные характеристики и параметры временного хода развития напряжения и деформации, для изучения которых требуется разработка и реализация специальных экспериментальных методик.

Цель и задачи исследования

Цель работы – разработка и создание экспериментальной установки и её программного обеспечения для изучения физических свойств одиночных кардиомиоцитов в норме и их изменений при патологии.

Для достижения поставленной цели, были сформулированы следующие **задачи**:

1) Разработать и создать экспериментальную установку для регистрации физических свойств сердечных мышечных клеток: динамического изменения развиваемого напряжения и укорочения механически нагруженных кардиомиоцитов, с применением методики фиксации клетки карбоновыми волокнами.

2) Разработать программное обеспечение экспериментальной установки для регистрации физических свойств кардиомиоцитов и управления параметрами их механического нагружения: динамического растяжения и реализации различных режимов сокращения кардиомиоцита – ненагруженного, ауksотонического, изотонического, изометрического.

3) Провести исследование пассивных вязкоупругих и активных сократительных свойств одиночных кардиомиоцитов с учетом их межжелудочковых различий – амплитудных характеристик и параметров временного хода развития напряжения и деформации в норме и при патологии (на примере экспериментального сахарного диабета 1 типа (СД1)).

4) Разработать математические модели, описывающие феномены, наблюдаемые в эксперименте. Проанализировать возможные механизмы, лежащие в основе межжелудочковых различий в характеристиках сократимости кардиомиоцитов желудочков сердца.

Научная новизна работы

Разработана, реализована и применена уникальная экспериментальная установка с применением методики удержания одиночных кардиомиоцитов карбоновыми волокнами, позволяющая растягивать одиночные кардиомиоциты в диапазоне длин саркомеров от 1.8 мкм до 2.2 мкм, измерять напряжение, развиваемое кардиомиоцитом в диапазоне значений от 0 до 14 мН/мм².

Впервые выявлены и проанализированы различия в механических характеристиках одиночных кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ, а также межжелудочковой перегородки (МжП) желудочков сердца крысы при

изменении режима нагружения клетки и при ее растяжении в норме и при экспериментальном СД1.

Построена математическая модель механической функции кардиомиоцитов ЛЖ, ПЖ и МЖП и проанализированы механизмы, лежащие в основе межжелудочковых различий в характеристиках сократимости кардиомиоцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная и созданная экспериментальная установка с применением уникальной методики удержания одиночных кардиомиоцитов карбоновыми волокнами обеспечивает задание различных режимов динамического механического нагружения кардиомиоцитов и предоставляет экспериментатору широкий спектр возможностей изучения биомеханических свойств одиночных клеток, включая исследования с управлением режимом сокращения клеток и линейными размерами клетки, частотой сердечных циклов в норме и при патологических условиях. Такая установка позволяет проводить исследования по влиянию фармакологически активных веществ, возрастных особенностей, гендерных отличий на биомеханические параметры препарата, причем область применения установки может быть расширена для изучения не только кардиомиоцитов, но и других типов мышечных клеток.

При помощи разработанной установки были получены биофизически значимые результаты о межжелудочковых различиях в параметрах механической функции кардиомиоцитов в норме и проведен анализ изменений этих различий в патологических условиях (на примере экспериментального СД1).

На основе ранее разработанной в ИИФ УрО РАН математической модели электромеханического сопряжения в желудочковых кардиомиоцитах [42, 47] и результатов проведенных биофизических экспериментов впервые построена математическая модель, описывающая межжелудочковые различия в параметрах зависимости «длина-активное напряжение», и выдвинута гипотеза о механизмах, ответственных за наблюдаемые различия.

Методология и методы исследования

В основе экспериментальной методики исследования в диссертационной работе использован и усовершенствован метод фиксации одиночного кардиомиоцита карбоновыми волокнами. Этот метод обеспечивает измерение длины кардиомиоцита и развиваемого им напряжения, определение амплитудных и временных характеристик их изменения в сократительном цикле [35, 53, 82]. Биофизические эксперименты проводились на одиночных кардиомиоцитах желудочков самцов крыс Вистар с использованием методики изоляции клеток, разработанной в ИИФ УрО РАН [23, 57]. Результаты экспериментов проанализированы с применением статистического анализа данных. Математическая модель механической функции кардиомиоцитов с учетом их межжелудочковых различий построена на основе ранее разработанной в ИИФ УрО РАН математической модели электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах желудочка [42, 47].

Положения, выносимые на защиту

1) Разработанная экспериментальная установка позволяет проводить измерение пассивных вязкоупругих и активных сократительных свойств одиночных кардиомиоцитов, амплитудных характеристик и параметров временного хода развития напряжения и деформации, с учетом их межжелудочковых различий.

2) Разработанное программное обеспечение позволяет в автоматическом режиме управлять параметрами динамического растяжения клетки для реализации различных режимов сокращения кардиомиоцита и проводить анализ регистрируемых сигналов.

3) Разработанная экспериментальная установка позволяет измерять физические свойства кардиомиоцитов в физиологическом диапазоне регистрируемых величин в норме, а также их изменения, связанных с патологией.

4) Построенная математическая модель воспроизводит различия в параметрах сократимости кардиомиоцитов желудочков, наблюдаемые в

биофизическом эксперименте, и выявляет возможные механизмы, лежащие в основе этих различий.

Степень достоверности результатов работы определяется использованием прецизионного оборудования, проведением калибровочных испытаний, применением современных методов статистической обработки результатов экспериментальных исследований, воспроизводимостью измерений, соответствием результатов измерений известным литературным данным.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на 11 конференциях, среди которых: V Международная молодежная научная конференция Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2018, г. Екатеринбург, 14-18 мая 2018; 2018 2nd International Conference on Computer Science and Artificial Intelligence (CSAI 2018), December 8-10, 2018, Shenzhen, China; 2019 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology (USBEREIT), Екатеринбург, 25-26 апреля 2019; VI Международная молодежная научная конференция Физика. Технологии. Инновации ФТИ-2019, Екатеринбург, 20-24 мая 2019; XII Всероссийский съезд по фундаментальным проблемам теоретической и прикладной механики, Уфа, 19-24 августа 2019; VI Съезд биофизиков России, Сочи, 16-21 сентября 2019; VII Международная молодежная научная конференция. Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2020, г. Екатеринбург, 18-22 мая 2020; VIII Международная молодежная научная конференция. Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2021, г. Екатеринбург, 17-21 мая 2021; ESB 2021 The 26th Congress of the European Society of Biomechanics Milan, Italy, July 11-14, 2021.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 7 публикаций в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ, из которых 7 проиндексированы в базах данных Web of Science и Scopus, из которых 1 статья в журнале WoS из первого квартиля (Q1), 10 тезисов

докладов в материалах конференций. Зарегистрирован 1 результат интеллектуальной деятельности: программа для ЭВМ.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованных источников из 92 наименований. Работа изложена на 142 страницах, содержит 7 таблиц и 51 рисунок.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДИК И ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОДИНОЧНЫХ ИЗОЛИРОВАННЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА

1.1 Кардиомиоцит. Строение и функция

Сердце (рисунок 1.1) является центральным органом системы кровообращения. Благодаря непрерывной сократительной деятельности сердечной мышцы осуществляется движение крови по сосудам и, следовательно, обеспечивается жизнедеятельность человека [4].

Полость сердца человека подразделяется на четыре камеры: два предсердия и два желудочка. Левое предсердие и ЛЖ составляют вместе левое, или артериальное, сердце, перекачивающее артериальную кровь, а правое предсердие и ПЖ — правое, или венозное, сердце, перекачивающее венозную кровь [4].

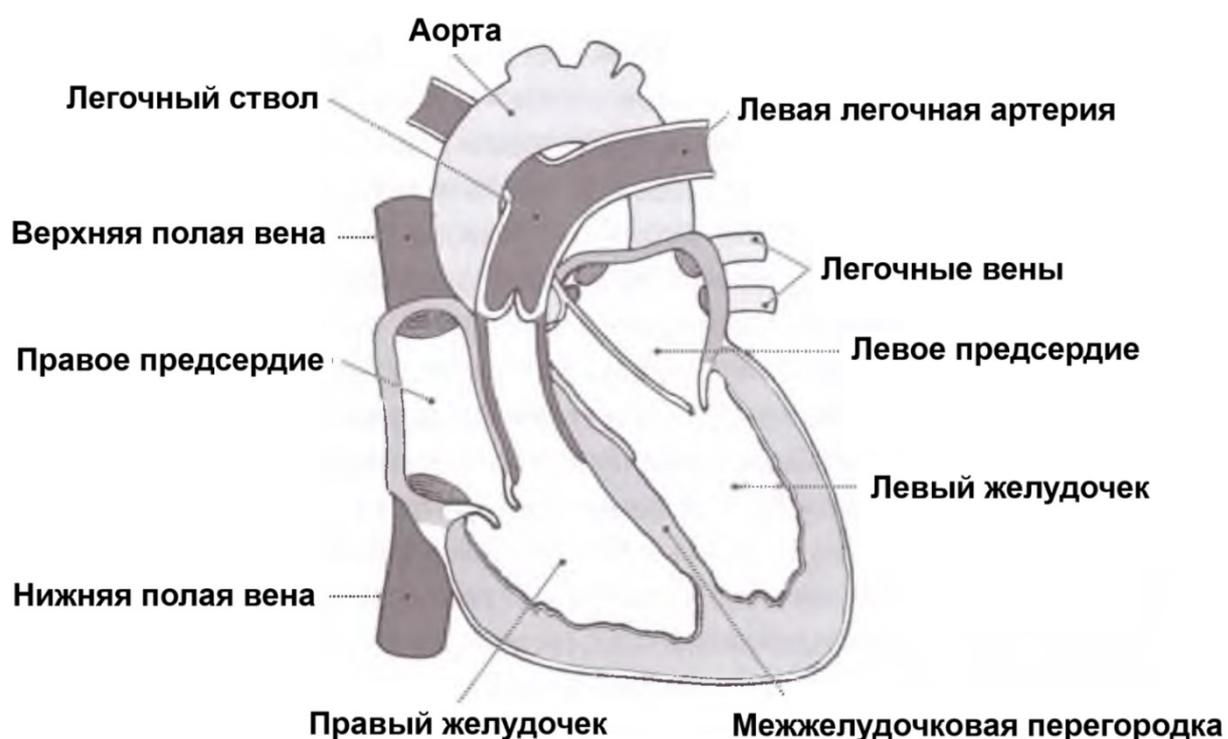


Рисунок 1.1 – Строение сердца человека [5]

Основную массу сердца составляет сердечная мышца, или миокард. Основным тканевым компонентом миокарда является мышечная ткань сердечного типа. Волокна сердечной мышцы мельче волокон скелетной мускулатуры. Они имеют лентовидную форму (15–20 мкм ширины при толщине около 5 мкм) и разделены на отдельные клетки — кардиомиоциты [4].

Сократительные (рабочие) кардиомиоциты составляют 30-40% общего числа клеток сердца, но образуют 70-90 % массы миокарда. Данные клетки имеют удлиненную (100-150 мкм) форму, близкую к цилиндрической. Они обеспечивают сократительную функцию сердца и содержат большое количество упорядоченных миофибрилл и митохондрий, имеют развитый саркоплазматический ретикулум и систему Т-трубочек [4].

Их поверхность покрыта базальной мембраной, в которую снаружи вплетаются ретикулярные и коллагеновые волокна. Ядра кардиомиоцитов (1-2) овальные и находятся в центральной части клетки. У полюсов ядра сосредоточены немногочисленные органеллы общего значения, за исключением агранулярной эндоплазматической сети и митохондрий [1].

Для миофибрилл кардиомиоцитов, как и скелетных мышц, характерна картина продольного расположения и поперечной исчерченности, видимая под микроскопом с помощью поляризованного света (рисунок 1.2) [4].

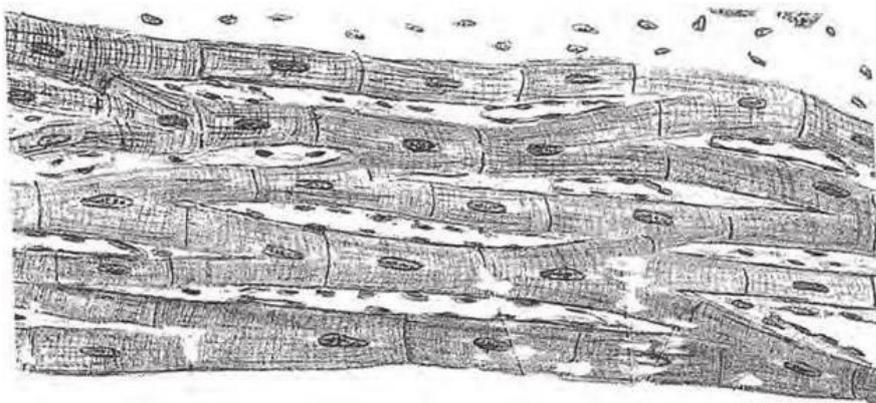


Рисунок 1.2 — Продольное расположение и поперечная исчерченность миофибрилл кардиомиоцитов

В этих условиях различают светлые изотропные (I), или однородные, полосы, темные анизотропные (A), или неоднородные, полосы и поперечно расположенные им Z-полосы (нем. *zwichenscheibe* – разделительные). Классической единицей продольного деления каждой миофибриллы кардиомиоцита, как и в скелетной мышце, является саркомер, который содержит две половинки I-полосы и одну A-полосу. Границами же саркомера являются Z-полосы. Таким образом, в кардиомиоците, как и в скелетных мышцах, саркомер является функциональной единицей сократительного аппарата. Поскольку саркомеры в миофибрилле расположены последовательно, сокращение саркомеров вызывает сокращение миофибриллы и общее ее укорочение (рисунок 1.3) [4].

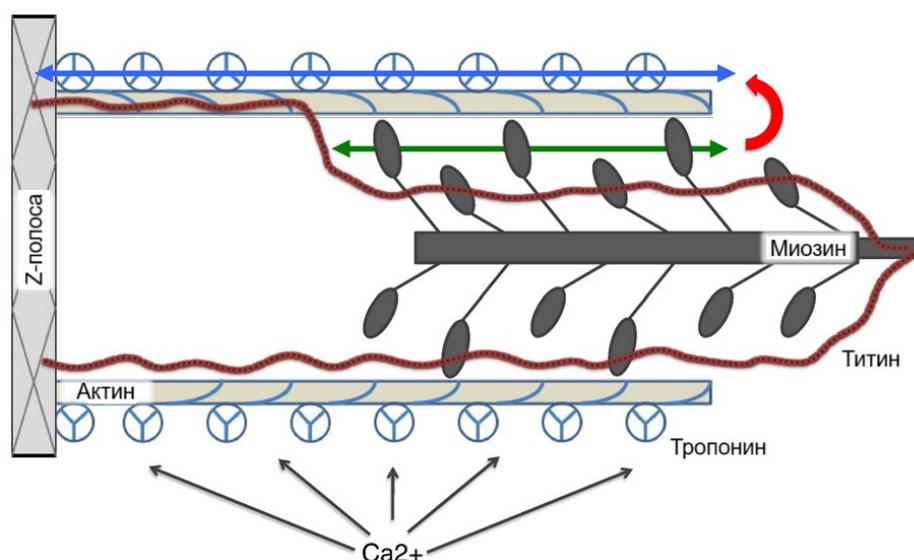


Рисунок 1.3 – Схема структуры саркомера. Адаптировано из [26]

Саркомеры состоят из длинных волокнистых белков - филаментов, которые скользят мимо друг друга, когда мышца сокращается или расслабляется.

Белок миозин образует толстый филамент, белок актин образует тонкий филамент. Миозин имеет длинный волокнистый хвост и шаровидную головку, которая связывается с актином. Головка миозина также связывается с АТФ, который является источником энергии для движения мышц. Миозин может

связываться с актином только тогда, когда сайты на актине открыты для связывания. Регуляторный белок тропомиозин покрывает сайты связывания миозина с актином. Чтобы позволить мышечной клетке сокращаться, тропомиозин должен быть перемещен, чтобы открыть сайты связывания на актине.

Во время деполяризации кардиомиоцита из саркоплазматического ретикулума, уникальной формы эндоплазматического ретикулума в саркоплазме, происходит лавинообразное высвобождение большого количества ионов Ca^{2+} . При этом ионы Ca^{2+} быстро проникают в цитоплазму, окружающую саркомеры, и связываются с регуляторным белком тропонином-С (TnC), который присоединен к белку тропомиозину и расположен в желобке между актиновыми нитями в мышечном волокне. Это приводит к изменению пространственного расположения всего тропомиозинового комплекса: тропомиозин смещается таким образом, что активные участки тонких нитей актина становятся доступными для взаимодействия с миозином. В результате такого взаимодействия образуются актомиозиновые (поперечные) мостики и актиновые нити скользят вдоль нитей миозина, что приводит к укорочению саркомера и всей клетки. Чем больше ионов Ca^{2+} связалось с TnC, тем больше образуется актомиозиновых мостиков и тем больше развиваемое кардиомиоцитом напряжение.

Процесс сокращения заканчивается, и наступает расслабление, когда ионы Ca^{2+} отсоединяются от TnC и закачиваются обратно в саркоплазматический ретикулум и внеклеточное пространство, позволяя сократительному аппарату и, следовательно, мышечной клетке расслабиться.

Кардиомиоциты соединяются друг с другом по типу «конец в конец», цепочки клеток составляют так называемые функциональные волокна (толщиной до 20 мкм). Здесь образуются вставочные диски: эти участки выглядят как тонкие пластинки при среднем увеличении светового микроскопа (рисунок 1.4). Фактически же концы кардиомиоцитов имеют неровную поверхность, поэтому выступы одной клетки входят во впадины

другой. Поперечные участки выступов соседних клеток соединены друг с другом интердигитациями и десмосомами [1].

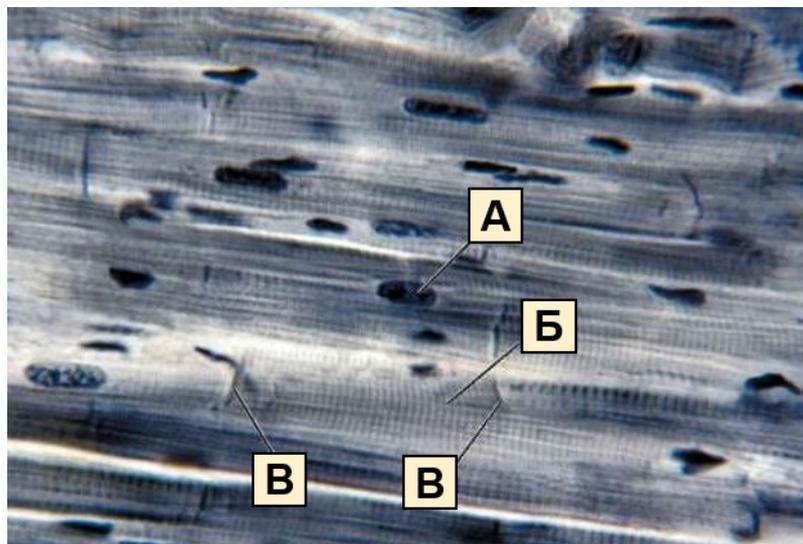


Рисунок 1.4 – Строение сердечной мышечной ткани. А: Ядро кардиомиоцита. Б: Кардиомиоцит. В: Вставочные диски [1]

К каждой десмосоме со стороны цитоплазмы подходит миофибрилла, закрепляющаяся концом в десмоплакиновом комплексе. Таким образом, при сокращении тяга одного кардиомиоцита передается другому. Боковые поверхности выступов кардиомиоцитов объединяются нексусами (щелевыми соединениями). Это создает между ними метаболические связи и обеспечивает синхронность сокращений [1].

1.2 Биомеханические характеристики кардиомиоцитов

Методика вязкоупругого гистерезиса

Эксперименты на изолированных мышцах животных и человека показали, что напряжение, развиваемое мышцей, складывается из двух составляющих. Одна из них, назовем ее активной составляющей, обусловлена сократительными возможностями мышечной ткани. Другая составляющая напряжения возникает при растягивании мышцы и обусловлена в основном деформацией белков цитоскелета (титина) и соединительно-тканного каркаса мышц, которые ведут себя подобно пружине и способны накапливать энергию

упругой деформации при растягивании мышцы [7]. Назовем ее пассивной составляющей напряжения мышцы.

Следует подчеркнуть, что развитие активного напряжения сопровождается затратами химической энергии, запасенной в мышцах. Пассивная же составляющая напряжения имеет сугубо механическую природу и не требует затрат химической энергии.

Для исследования пассивной составляющей напряжения кардиомиоцита используется методика вязкоупругого гистерезиса, заключающаяся в подаче пилообразного сигнала последовательного растяжения-сжатия препарата. Ответный сигнал развиваемого пассивного напряжения препарата отличался от подаваемого пилообразного, входного, по амплитуде и фазе, и на основании этих смещений можно оценивать вязкостные и упругие свойства материала.

В координатах «напряжение–длина препарата» формируется симметричная гистерезисная зависимость эллипсовидной формы. Вид петли гистерезиса свидетельствует о нелинейности реологических характеристик препарата миокарда, а площадь петли гистерезиса позволяет оценить диссипацию энергии упругой деформации [7, 73].

Движение по петле гистерезиса в исследованной вязкоупругой структуре пассивного миокарда всегда направлено по часовой стрелке, что характерно для диссипативных систем [29].

Площадь петли гистерезиса оценивалась как разность определенных интегралов двух гипербол, аппроксимирующих петлю гистерезиса (рисунок 1.5, формула 1.1).

Используя обобщенную модель Максвелла-Кельвина, из площади петли гистерезиса можно вывести модуль механических потерь – вязкость E'' (формула 1.2).

$$\begin{aligned} \Delta S_{\text{петля}} &= A_{\text{потерянная}} = \Delta S_{\text{растяжение}} - \Delta S_{\text{сокращение}} = \\ &= \Delta A_{\text{затраченная}} - \Delta A_{\text{возвращенная}} = \int_0^{\varepsilon_{\text{макс}}} \sigma d\varepsilon - \int_{\varepsilon_{\text{ост}}}^{\varepsilon_{\text{макс}}} \sigma d\varepsilon, \end{aligned} \quad (1.1)$$

$$A_{\text{потерянная}} = \Delta S_{\text{петля}} = \varepsilon_0^2 \pi E'', \quad (1.2)$$

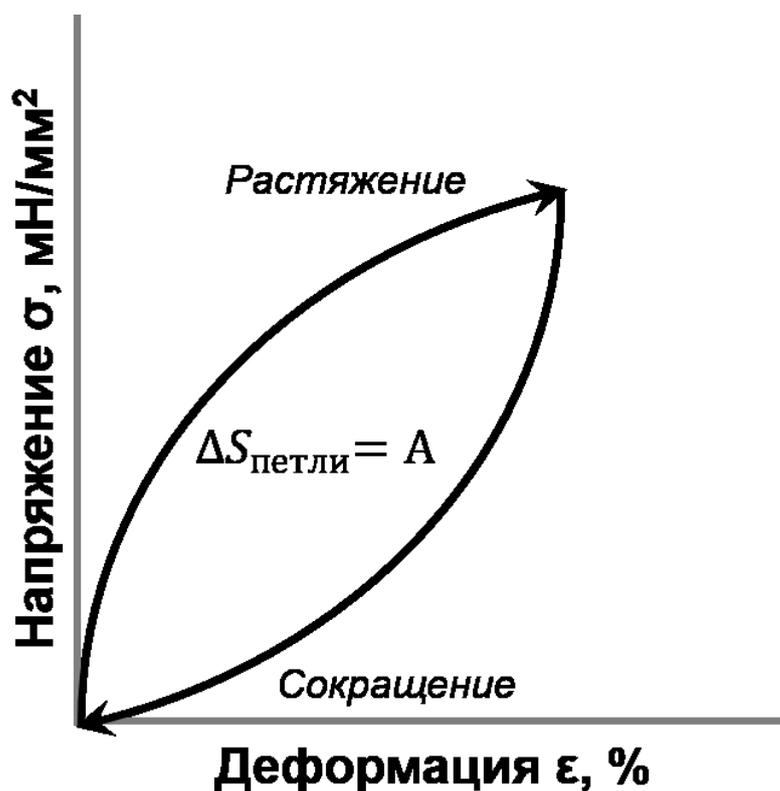


Рисунок 1.5 – Вязкоупругий гистерезис, где S - площадь петли гистерезиса, A - работа.

Соотношение «Давление-Объем» и соотношение «Длина-Напряжение»

Деятельность сердца как насоса представляет собой непрерывное последовательное чередование периодов сокращения (систола) и расслабления (диастолы) предсердий и желудочков. Сменяющие друг друга систола и диастола составляют сердечный цикл [4].

Сердечный цикл удобно рассматривать на диаграмме «Давление — Объем», которая получается при одновременной регистрации давления и объема в полости желудочков и их сопоставления на одном графике [76] (рисунок 1.6).

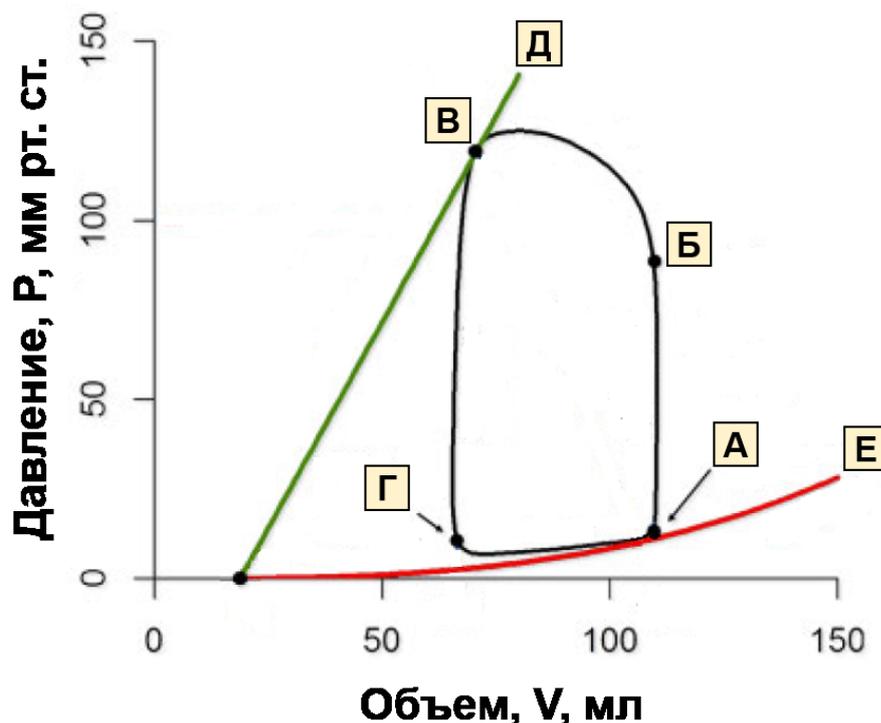


Рисунок 1.6 — Изменения давления (P) и объема (V) крови в желудочках на протяжении сердечного цикла. А—Б: Период напряжения. Б—В: Период изгнания. В—Г: Период расслабления. Г—А: период наполнения. Д: Конечнo-систолическое соотношение давление-объем. Е: Конечнo-диастолическое соотношение давление-объем. Адаптировано из [16]

Первый период цикла и первый период систолы желудочков — период напряжения. Начальная фаза этого периода — фаза асинхронного сокращения — соответствует последовательному «включению» сократительных кардиомицитов. С момента охвата возбуждением всего миокарда желудочков начинается фаза изоволюмического сокращения, режим которого близок к изометрическому (рисунок 1.6 А-Б). Второй период цикла и второй период систолы желудочков - период изгнания (рисунок 1.6 Б-В). Вначале кровь в аорте и легочном стволе движется с большой скоростью (фаза быстрого изгнания), затем скорость движения крови уменьшается (фаза медленного изгнания). В фазе быстрого изгнания желудочки сокращаются в режиме, близком к изотоническому (с постоянной силой), давление крови в них

возрастает незначительно по сравнению с периодом изоволюмического сокращения, тогда как их объем быстро уменьшается.

Третий период цикла и первый период диастолы желудочков получил название фазы изометрического, или изоволюмического, расслабления изгнания (рисунок 1.6 В-Г). Четвертый период цикла, завершающий, и второй период диастолы желудочков – период наполнения (рисунок 1.6 Г-А).

Похожее фазовое поведение может быть скопировано на уровень единичной клетки и рассмотрено на диаграмме «длина — напряжение» (рисунок 1.7), с помощью последовательности состоящей из: изометрического сокращения (рисунок 1.7 А-Б), изотонического укорочения (рисунок 1.7 Б-В), изометрического расслабления (рисунок 1.7 В-Г) и изотонического растяжения (рисунок 1.7 Г-А).

На исследование соотношений «длина-напряжение» одиночного кардиомиоцита не влияют проблемы, возникающие на уровне целого органа, такие как наличие соединительной ткани и эндотелия, которые вызывают существенное изменение вязкоупругих и сократительных свойств ткани [63].

Можно выделить два основных параметра, изучаемых на диаграмме «длина-напряжение».

По оценке конечно-диастолического наклона (конечно-диастолическая длина-пассивное напряжение) анализируется жесткость кардиомиоцита (рисунок 1.7.Е).

По оценке наклона соотношения длина-общее напряжение (конечно-систолическая длина-общее напряжение) анализируется сократимость кардиомиоцита (рисунок 1.7.Д).

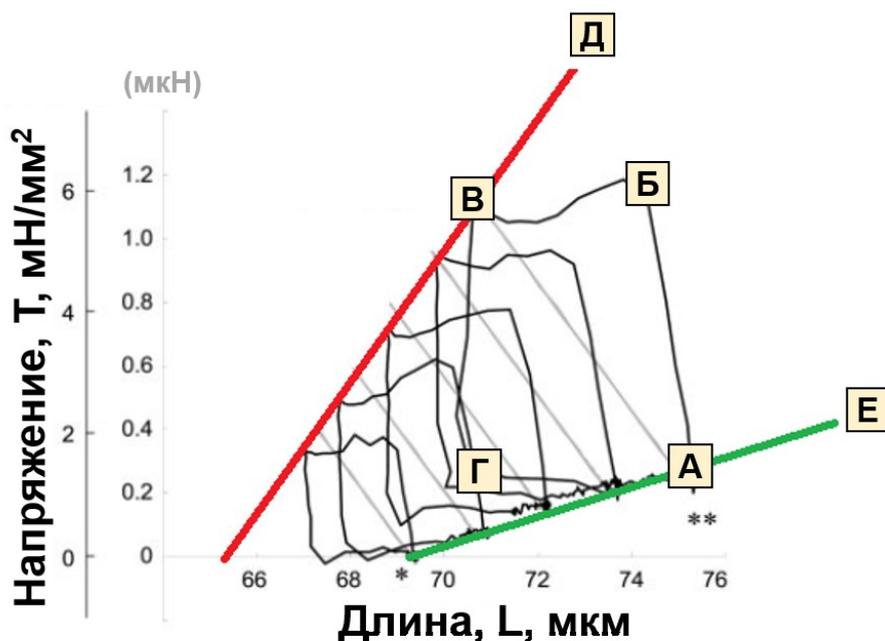


Рисунок 1.7 – Изменения развиваемого напряжения и длины кардиомиоцита желудочка на протяжении сердечного цикла при разных конечно-диастолических длинах саркомеров. А— Б: Изометрическое сокращение. Б—В: Изотоническое укорочение. В—Г: Изометрическое расслабление. Г—А: Изотоническое растяжение. Д: Конечно-систолическая длина-общее напряжение. Е: Конечно-диастолическая длина-пассивное напряжение. * - Конечно-диастолическая длина саркомера 1.85 мкм. ** - Конечно-диастолическая длина саркомера 2.04 мкм. Адаптировано из [37]

Однако, наклон соотношения длина-общее напряжение включает в себя и пассивную составляющую, длина-пассивное напряжение. Поэтому, для корректного изучения именно сократительной, активной, составляющей напряжения кардиомиоцита будет использоваться соотношение длина-активное напряжение, представляющее собой разность соотношений длина-общее напряжение и длина-пассивное напряжение [18].

Исследование длинозависимой регуляции сократимости кардиомиоцитов

В конце 19-го - начале 20-го века Отто Франк и Эрнест Х. Старлинг обнаружили «закон сердца», который описывает зависимость ударного объема от конечно-диастолического объема, одно из самых фундаментальных механических свойств сердечной мышцы. Следствие этого закона гласит, что

любой параметр, который характеризует работу сердца (сердечный выброс, систолическое давление, мышечная сила и т.д.), зависит от конечно-диастолических линейных параметров сердечного препарата, таких как конечный-диастолическое давление или объем желудочка, конечно-диастолическая длина мышцы или кардиомиоцита и т.д. Хотя это свойство сердечной мышцы является настолько фундаментальным и общеизвестным, субклеточные механизмы, лежащие в основе закона сердца Фрэнка-Старлинга, все еще обсуждаются [71].

Действительно, из-за структуры саркомера напряжение, развиваемое клеткой, зависит от длины клетки, от зоны перекрытия тонких и толстых миофиламентов – количества участвующих в сокращении актомиозиновых мостиков (рисунок 1.8).

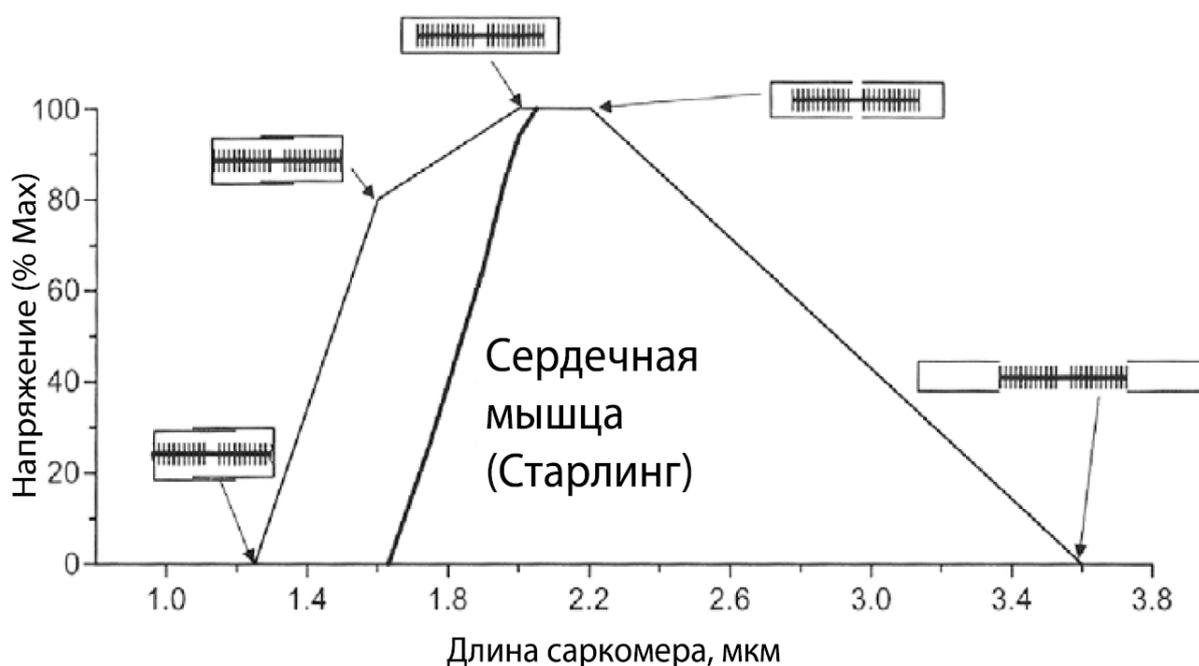


Рисунок 1.8 – Связь «длина-напряжение» для сердечной мышцы [8]

Однако, крутизна соотношения «длина-напряжение» для сердечной мышцы не может быть объяснена только зоной перекрытия тонких и толстых миофиламентов [8]. Были формализованы три кооперативных механизма

активации сократительных белков [38, 41]. Сродство TnC к кальцию увеличивается:

1) при увеличении концентрации поперечных мостиков, прикрепленных к актиновой нити около данного комплекса (кооперативность первого типа);

2) при увеличении концентрации Ca-TnC комплексов вблизи данного комплекса (кооперативность второго типа);

– присоединение кальция к молекуле TnC, приводящее к сдвигу сопряженной молекулы тропомиозина, облегчает дерепрессию близлежащих мономеров актина на тонкой нити благодаря взаимодействию конец-в-конец соседних молекул тропомиозина (кооперативность третьего типа).

Также было обнаружено, что в реализации механизма Франка-Старлинга существенная роль принадлежит титину [27]. Гигантский белок цитоскелета титин в качестве механического линкерного белка, способен передавать информацию о длине саркомера сократительному аппарату [26].

Подобная регуляция сократимости сердечного препарата, способности развивать напряжение, получила название «длинозависимая регуляция сократимости».

Для построения зависимостей «конечно-диастолическая длина-пассивное напряжение», «конечно-систолическая длина-активное напряжение», «конечно-систолическая длина-общее напряжение» и определения углов наклонов данных соотношений для оценки жёсткости и сократимости кардиомиоцитов, т.е. для определения параметров зависимости Франка-Старлинга на выбранной клетке, необходимо последовательно растягивать клетку. В результате получается серия укорочений кардиомиоцита на различных конечно-диастолических длинах клетки.

Поставив в соответствие полученный массив развиваемых напряжений с массивом эффективных длин кардиомиоцита, мы можем получить соотношения длина-напряжение одиночного кардиомиоцита, сокращавшегося при разных значениях растяжения.

По оценке конечно-диастолического наклона (конечно-диастолическая длина-пассивное напряжение) анализируется жесткость кардиомиоцита.

По оценке наклона соотношения длина-активное напряжение (конечно-систолическая длина-активное напряжение) анализируется сократимость кардиомиоцита.

Исследование грузозависимой регуляции сократимости кардиомиоцитов

Изменения режимов сокращения сердечного препарата формируют второй вид регуляции сократимости сердечного препарата, а именно «грузозависимую регуляцию сократимости» - уменьшение амплитуды укорочения при увеличении механической нагрузки на кардиомиоцит [36].

Изометрический режим сокращения (рисунок 1.9.В) (аналог изоволюмического режима для целого желудочка) предполагает развитие напряжения кардиомиоцитом без изменения длины данного кардиомиоцита (прикладываемая механическая нагрузка, превышающая максимальное напряжение препарата). В ходе изометрического сокращения эффективная длина клетки (расстояние между устройствами фиксации кардиомиоцита) не должно измениться.

В свою очередь, изотонический режим сокращения (рисунок 1.9.А) предполагает развитие постоянного напряжения кардиомиоцитом. Изотонический режим сокращения без предварительного растяжения клетки поддерживает нулевое напряжение – а значит имитирует ненагруженные сокращения (наименьшая прикладываемая механическая нагрузка).

В литературе можно найти два метода управления режимом сокращения кардиомиоцита. Первый – использование полностью аналоговых сигнальных схем [88] или применение операционной системы реального времени [30]. Подобная система непрерывно следит за положением устройств фиксации кардиомиоцита, и, обнаруживая перемещения, вызванные сокращением, компенсирует их, подавая сигнал движения в противоположном сокращению направлении.

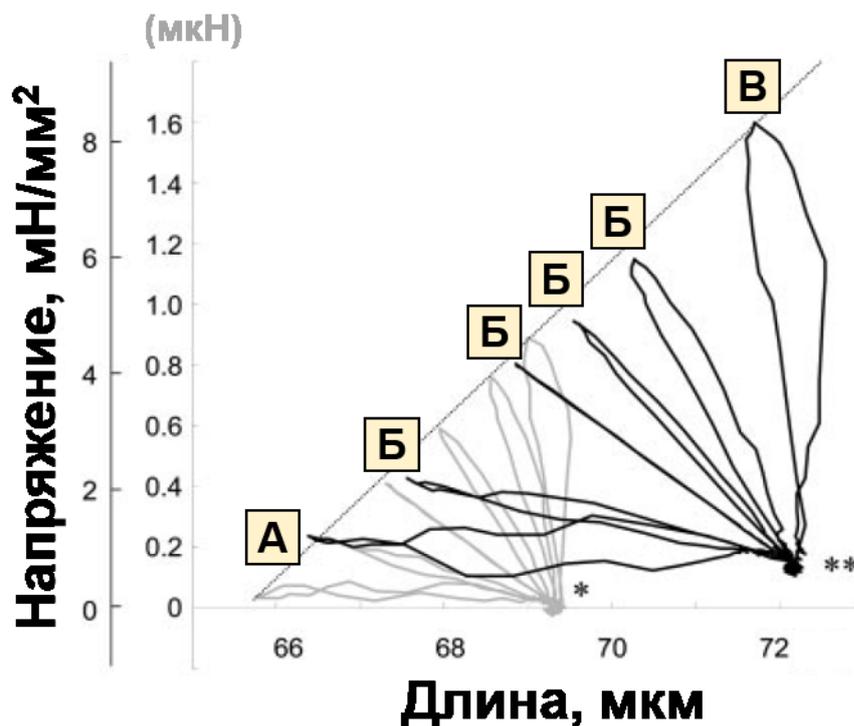


Рисунок 1.9 – Соотношения «длина-напряжение». А: Изотонический режим сокращения (наименьшая механическая нагрузка на кардиомиоцит – наименьшее развиваемое напряжение). Б: Ауксотонический режим сокращения. В: Изометрический режим сокращения (наибольшая механическая нагрузка на кардиомиоцит – наибольшее развиваемое напряжение). * - Конечнo-диастолическая длина саркомера 1.90 мкм. ** - Конечнo-диастолическая длина саркомера 1.97 мкм. Адаптировано из [37]

Второй метод, приведенный в литературе [35, 37], заключается в предварительной записи сигнала сокращения – изменения длины клетки (расстояния между устройствами фиксации кардиомиоцита) от времени, усреднением сигналов нескольких сокращений, и последующей подачей инвертированного усредненного сигнала сокращения с необходимым коэффициентом усиления, как управляющего сигнала для компенсации изменения длины клетки в ходе сокращения.

1.3 Методики фиксации кардиомиоцитов

Методика стеклянных стержней и методика микропипеток

Основой методов регистрации соотношений «длина-напряжение» для изучения сократительной функции одиночной клетки сердца является фиксация концов клетки для измерения развиваемого напряжения кардиомиоцитом при его растяжении. В середине 1980 годов Тарр и соавторы провели эксперименты [78, 79] на кардиомиоцитах лягушки. Кардиомиоциты амфибий имеют ширину около 5–10 мкм и длину 250–400 мкм. Они относительно податливы по сравнению с кардиомиоцитами млекопитающих; таким образом, длина клетки может быть легко изменена ее растяжением. Тарр и соавторы фиксировали оба конца клетки, оборачивая каждый конец клетки вокруг стеклянного стержня, изготовленного из заготовки для микроэлектрода и покрытого полилизинном для склеивания клетки и держателя (рисунок 1.10.А). Один из двух стеклянных стержней был жестким, чтобы зафиксировать положение одного края клетки. Перемещение положения жесткого стеклянного стержня позволяло изменять длину клетки. Второй стеклянный стержень был достаточно тонким и гибким, чтобы использовать его изгиб для измерения силы сокращения в нН. Жесткость стеклянного стержня измерялась путем сравнения с кварцевым стержнем известной жесткости. Метод Тарр и соавторов позволяла не только проводить измерения напряжения, развиваемого кардиомиоцитом, но также одновременно проводить электрофизиологические измерения методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) [28], прикрепляя стеклянный микроэлектрод к мембране клетки рядом с внешней стороной жесткого стеклянного стержня [36, 79].

Дальнейшие исследования сократительной функции изолированных кардиомиоцитов лягушки были выполнены Тунг и соавторами с использованием различных методов фиксации клеток и измерения силы [80]. Разработанный ими датчик силы состоял из источника света и измерительного

гибкого оптоволокна; свободный конец измерительного оптоволокна был обращен к другому неподвижному оптическому волокну, которое было подключено к фотодиоду. Каждый конец одиночного кардиомиоцита был прочно зафиксирован внутри полого стеклянного стержня (пипетки) заданием через нее отрицательного давления, и клетка фиксировалась на свободном конце гибкого оптического волокна в перевернутой U-образной конфигурации (рисунок 1.10.Б). Сокращение клетки приводит к изгибу измерительного оптического волокна, вызывая смещение поперечных сечений двух оптических волокон, что приводит к изменению интенсивности проходящего света, которое пропорционально генерируемой силе и измеряется фотодиодом [36, 80].

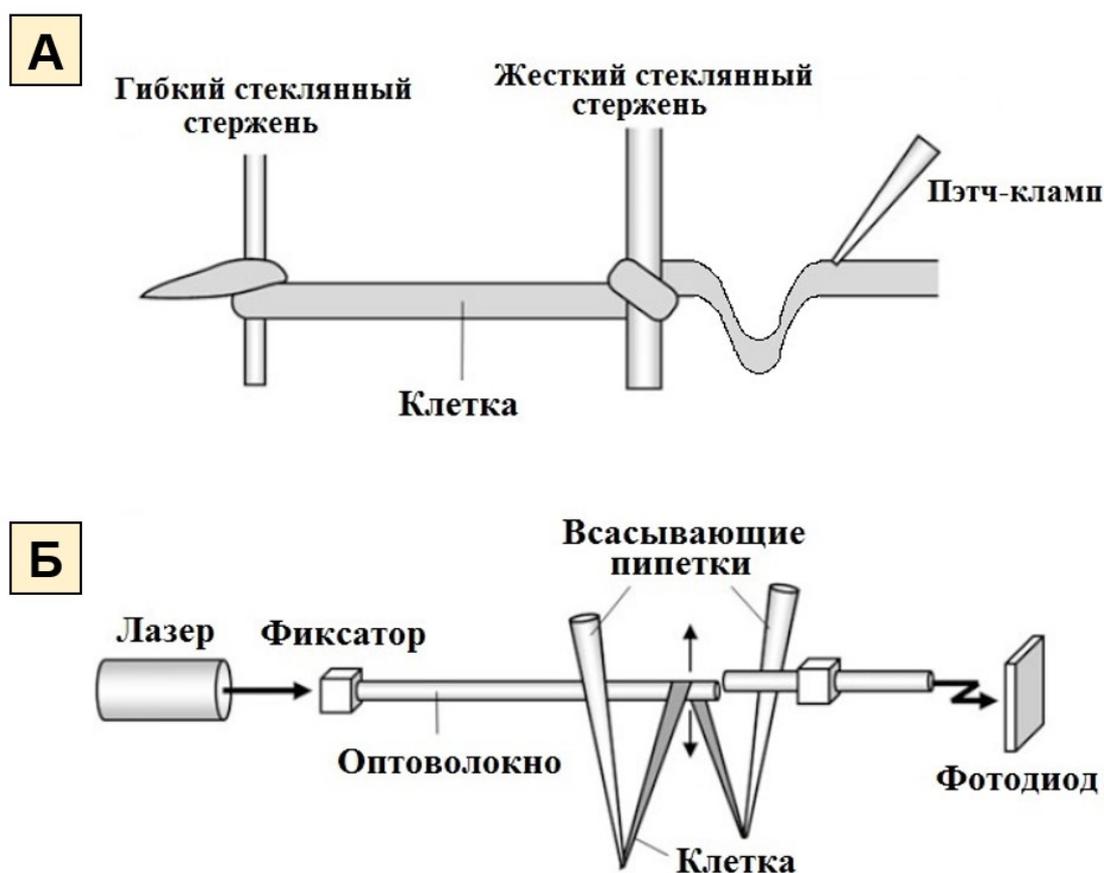


Рисунок 1.10 – Примеры техники удержания концов клеток и измерения напряжения на кардиомиоцитах лягушки [79, 80]. А: Метод стеклянных стержней. Б: Метод микропипеток

Удерживать кардиомиоциты млекопитающих достаточно сложно из-за их размера. Кардиомиоциты млекопитающих меньше по длине (100-150 мкм), но больше по ширине и толщине (около 20 мкм в ширину и около 7 мкм в толщину), что привело к неудачам применения методики применения стеклянных стержней [36]. Было несколько попыток удерживать края кардиомиоцитов млекопитающих с помощью всасывающих стеклянных пипеток; тем не менее, вероятность успеха растяжения клеток была чрезвычайно низкой из-за повреждения клеток большим давлением на мембрану кончиками микропипеток [20]. Чтобы уменьшить нагрузку на концы клетки, Брэди и соавторы разработали другую технику фиксации с концентрическими двойными всасывающими пипетками. Внутренняя пипетка слегка утоплена, чтобы позволить внешней пипетке захватить 3-5 саркомеров вокруг края клетки. Следовательно, кончик внутренней пипетки прочно прикреплен к вставочному диску, где физиологически происходит перенос механического напряжения при растяжении клетки [21].

Методика клеящих веществ

Такие клеящие вещества как фибрин [25], полилизин [70] или силиконовый адгезив [33] использовали ранее для прикрепления концов клеток к стеклянному держателю или его аналогу. Для прикрепления с использованием фибринового клея стеклянную пипетку, заполненную человеческим фибриногеном, подносили близко к концу клетки. Клетка помещалась в перфузионную камеру, содержащую бычий тромбин. Далее небольшое количество фибриногена под давлением выделялось из пипетки для создания фибрина, соединяющего стеклянную пипетку и край клетки. Обычно фибрин покрывает примерно 20–30 % поверхности клетки.

В способе прикрепления с использованием полилизина изолированную клетку помещали на пару стеклянных стержней, покрытых полилизином. Чтобы обеспечить надежное прикрепление клетки со стеклянными стержнями, покрытыми полилизином, необходимо, чтобы стержни покрывали 65 % поверхности клетки.

Для прикрепления концов клетки с помощью силиконового клея необходимо 45 минут для отверждения силиконового клея перед измерениями. Все эти методы в настоящее время используются редко [36].

Совсем недавно появился новый биосовместимый клей (MyoTak™; Ionoptix, Milton, MA, США) для прикрепления клеток [30, 59, 65]. MyoTak представляет собой композицию белков внеклеточного матрикса (ламинин, энтактин и др.) [36]. Перед нанесением клея кончики стеклянных микроэлектродов предварительно покрывают силикатом алюминия и высушивают. Далее кончики микроэлектродов опускаются в MyoTak. После высыхания клея на воздухе в течение нескольких минут кончик с клеем должен оставаться влажным, чтобы он мог удерживать концы клетки в течение нескольких часов. Отметим, что в большинстве методов фиксации клеток при помощи клея, за исключением MyoTak, держатели с клеем можно использовать только один раз из-за того, что клеточный мусор прилипает к кончику держателя после измерений. Адгезивная сила MyoTak не слишком сильна высока, поэтому, подняв стержень с клеем из раствора экспериментальной ванночки, можно удалить оставшиеся части клеток за счет поверхностного натяжения при прохождении через границу раздела жидкость-воздух, что позволяет проводить дальнейшие измерения клеток [36].

MyoTak использовался в работе Хелмес и соавторов [30, 59]. Экспериментальная установка, представленная в этой работе, состояла из двух трехосевых микроманипуляторов, к первому прикреплялся датчик силы, ко второму - пьезоэлектрический двигатель (Mad City Labs, США).

Кардиомиоциты прикреплялись к стеклянным иглам, толщиной 35 мкм, покрытых MyoTak. Первая игла устанавливалась на кантилере датчика силы, вторая – на пьезоэлектрическом двигателе, на который направлялась команда для растяжения клетки (рисунок 1.11).

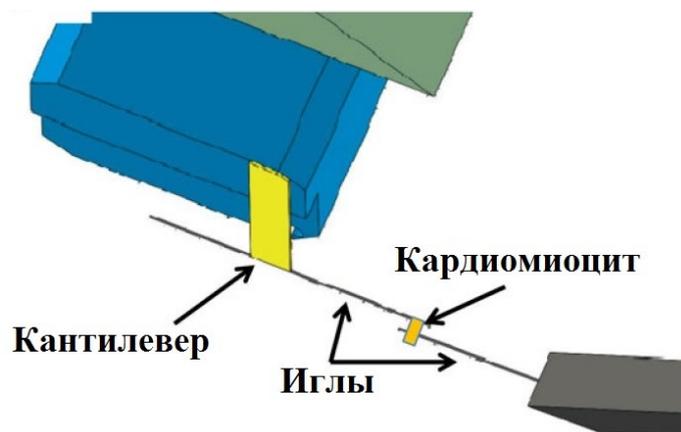


Рисунок 1.11 – Экспериментальная установка Хелмес и соавторов [30, 59]

Методика карбоновых волокон

Несмотря на то, что в описанных выше исследованиях были разработаны различные методы фиксации клеток, до внедрения методики карбоновых волокон количество успешных экспериментальных записей «длина-напряжение» кардиомиоцитов оставался низким [36]. В конце 1980-х годов Ле Геннек и соавторы разработали методику, в которой использовались карбоновые волокна, прикрепленные к противоположным концам клетки, для того, чтобы управлять преднагрузкой на клетку (рисунок 1.12.А). Карбоновые волокна способны прикрепляться к мембране кардиомиоцита при помощи электростатических сил. Растяжение кардиомиоцита карбоновыми волокнами приводило к относительно однородному увеличению длины саркомера и позволило рассчитать пассивные и активные силы по оптически контролируемым изменениям изгиба карбонового волокна [53].

$$T = \frac{F}{S} = \frac{K(\Delta L_{UMP} - \Delta L_{CF})}{S}, \quad (1.3)$$

где: K – суммарная жесткость карбоновых волокон, образующих гибкий пинцет, ΔL_{UMP} – изменение позиции микроманипуляторов, на которых закреплены карбоновые волокна, ΔL_{CF} – изменение расстояния между кончиками карбоновых волокон, закрепленных на кардиомиоците, S – площадь поперечного сечения кардиомиоцита.

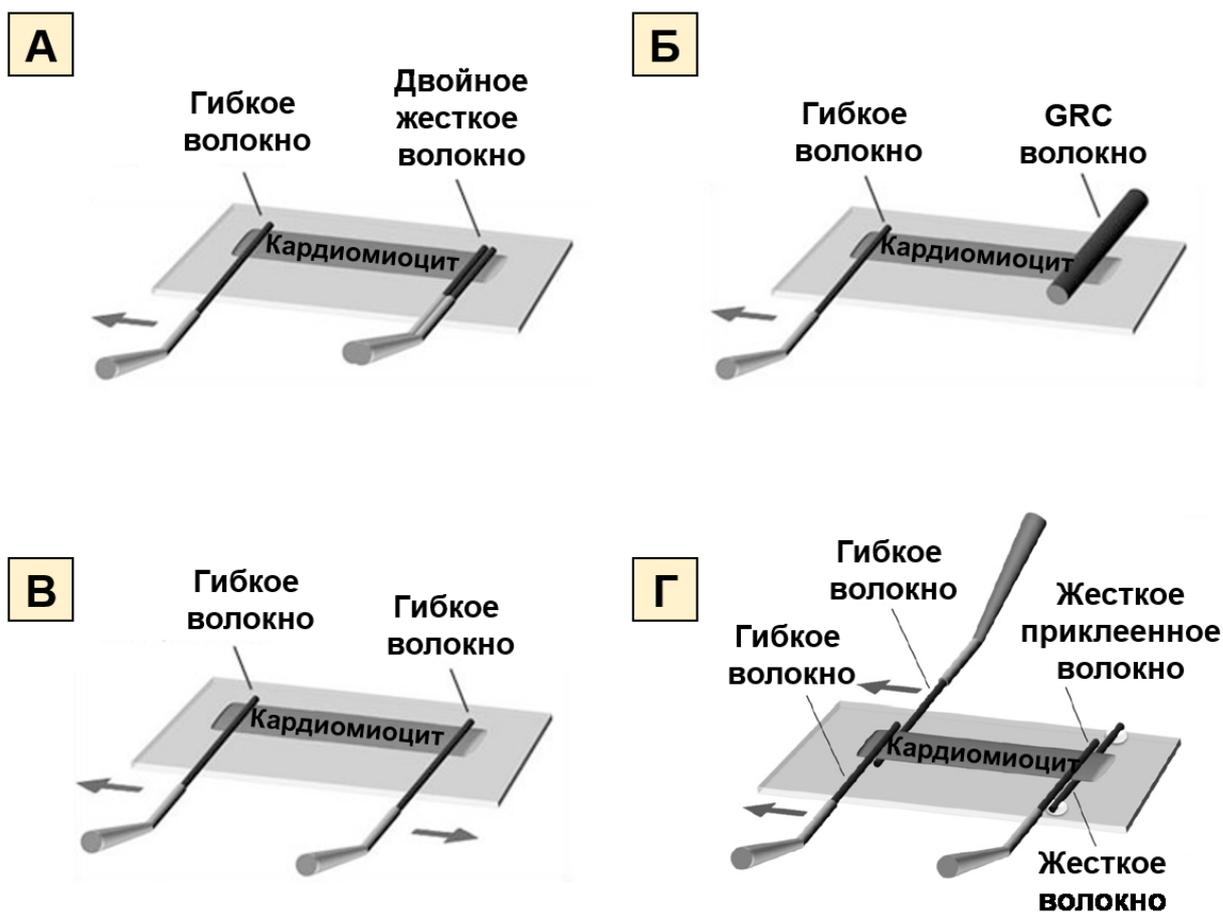


Рисунок 1.12 – Примеры методик карбоновых волокон. Стрелочками указаны подвижные в ходе эксперимента волокна. А: Первое применение методики карбоновых волокон (Le Guennec, 1990) [53]. Б: Методика волокон GRC (Yasuda, 2001) [88]. В: Установка двух гибких подвижных волокон (Iribe, 2007) [37]. Г: Установка четырех карбоновых волокон или двух пинцетов (Iribe, 2014) [35].

1.4 Обзор экспериментальных установок, использующих методику удержания кардиомиоцита карбоновыми волокнами

Первое применение методики карбоновых волокон (Le Guennec, 1990)

Первая экспериментальная установка с использованием методики карбоновых волокон, представленная в 1990 году, использовала два держателя карбоновых волокон: в первом держателе фиксировалось длинное гибкое волокно, служившее датчиком силы; во втором держателе фиксировалось двойное короткое жесткое волокно, служившее фиксатором края клетки (рисунок 1.12.А). Впоследствии двойное короткое жесткое волокно было заменено на одинарное короткое жесткое волокно [24].

Держатели карбоновых волокон устанавливались на ручных трехосевых гидравлических манипуляторах Narishige MO-103 (Narishige, Япония) с разрешением движения 2 мкм.

Установка позволяла изменять конечно-диастолическую линейную длину препарата, тем самым обеспечивая возможность изучения длинозависимой регуляции сократимости, однако возможностей управления режимом сокращения кардиомиоцита представлено не было.

Максимальная достигнутая конечно-диастолическая длина саркомеров при растяжении составила 2.0 мкм. Максимальное зарегистрированное напряжение не превысило 1.0 мН/мм² [24, 53, 83, 84].

Экспериментальная установка не активна с начала 2000-ых годов.

Установка волокон GRC (Yasuda, 2001)

В 2001 году Ясуда и соавторы [88] представили первую модификацию методики карбоновых волокон. В данной работе использовались два карбоновых волокна, одно гибкое и одно жесткое, однако в качестве жесткого карбонового волокна было использовано GRC волокно – карбоновое волокно, усиленное графитом (рисунок 1.12.Б).

Держатель гибкого карбонового волокна установлен на управляемый аналоговым сигналом пьезодвигатель P-841.40 (Physik Instrumente, Германия) [87], с разрешением движения 0.6 нм и диапазоном перемещения 60 мкм.

Впервые в этой работе была создана обратная связь на основе полупрозрачного зеркала и пары фотодиодов (рисунок 1.13), что позволило управлять приложением нагрузки на кардиомиоцит в ходе активного сокращения и реализовать изометрический режим сокращения кардиомиоцита.

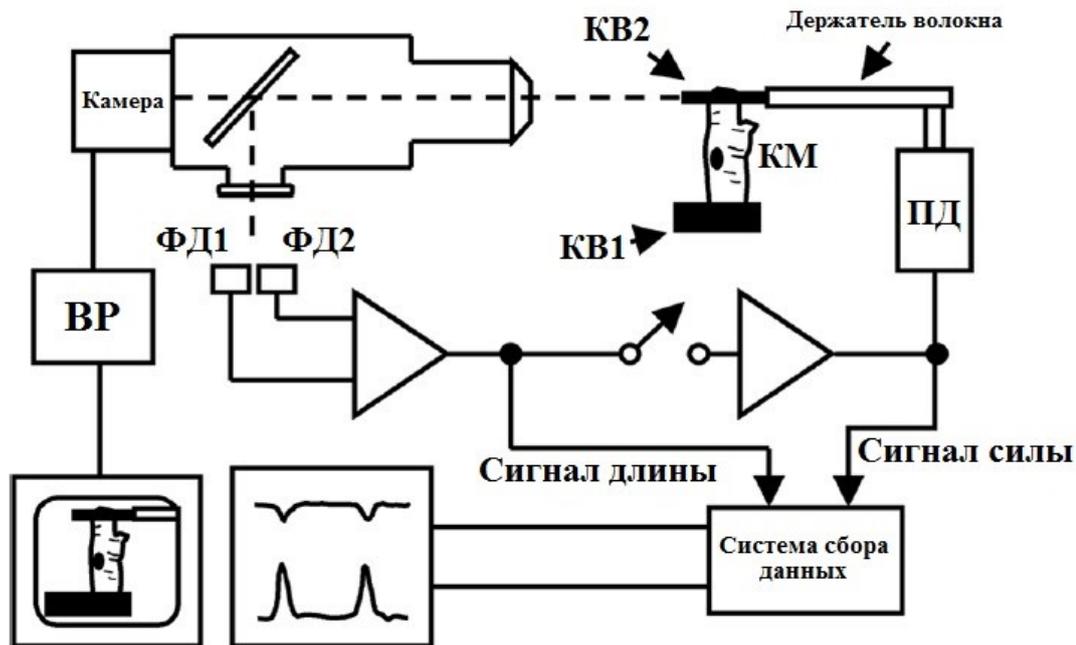


Рисунок 1.13 – Экспериментальная установка Ясуда и соавторов 2001 [88]. ВР – видеорекордер; КВ1- жесткое карбоновое волокно; КВ2 – гибкое карбоновое волокно; КМ – кардиомиоцит; ПД – пьезоэлектрический двигатель; ФД1, ФД2 - фотодиоды

Изображение гибкого карбонового волокна во время сокращения клетки с помощью полупрозрачного зеркала направлялось на пару фотодиодов и их разностный сигнал (проекция изгиба карбонового волокна приводит к разнице интенсивности света, падающего на фотодиоды) был линейной функцией изгиба волокна, вызванного укорочением кардиомиоцита.

Выходной сигнал после его инвертирования задавался в качестве входного сигнала на пьезоэлектрический двигатель с гибким волокном для того, чтобы уменьшить его изгиб при сокращении клетки. Изменяя коэффициент усиления обратной связи, Ясуда и соавторы смогли достичь практически нулевой изгиб гибкого карбонового волокна, тем самым реализовав виртуальный изометрический режим сокращения кардиомиоцита.

Максимальное зарегистрированное напряжение в первых работах составляло единицы $\text{мН}/\text{мм}^2$ [87, 88], однако, после усовершенствования программного кода управления экспериментальной установкой и реализации изотонического режима сокращения и режима рабочего цикла, было доложено

о регистрации напряжения более сотни мН/мм² [61]. Подобные величины более никем не были достигнуты. Также данная экспериментальная установка не способна растянуть кардиомиоцит более 2.1 мкм конечно-диастолической длины саркомеров.

Установка не активна с 2006 года [77].

Установка двух гибких подвижных карбоновых волокон (Iribe, 2007)

Свою модификацию техники карбоновых волокон представили Iribe и соавторы в 2007 году [37].

В данной работе были использованы два гибких карбоновых волокна толщиной 12-14 мкм, жесткая фиксация края кардиомиоцита не проводилась (рисунок 1.12.В).

Карбоновое волокно в стеклянном держателе устанавливалось на трехосевом гидравлическом манипуляторе Narishige SM-28 (Narishige, Япония). Диапазон позиционирования данного манипулятора равен 5 мм.

В свою очередь гидравлический манипулятор устанавливался на прецизионный пьезоэлектрический двигатель P-621.1CL (Physik Instrumente, Германия) с диапазоном позиционирования 100 мкм и разрешением движения в 0,4 нм.

Соединенные два устройства помещались на салазки, на грубой ручной настройке положения относительно экспериментальной ванночки (рисунок 1.14).

Салазки позволяли охватить всю экспериментальную ванночку, гидравлический манипулятор – подвести карбоновое волокно к клетке, пьезоэлектрический двигатель – растягивать клетку с субнанометровой точностью. Ирибэ и соавторы с помощью разработанной установки смогли не только реализовать ауксотонический, изометрический и изотонический режимы сокращений, но, записав сокращение ауксотонического режима, смогли использовать его в качестве сигнала для реализации режима физиологического рабочего цикла кардиомиоцита.

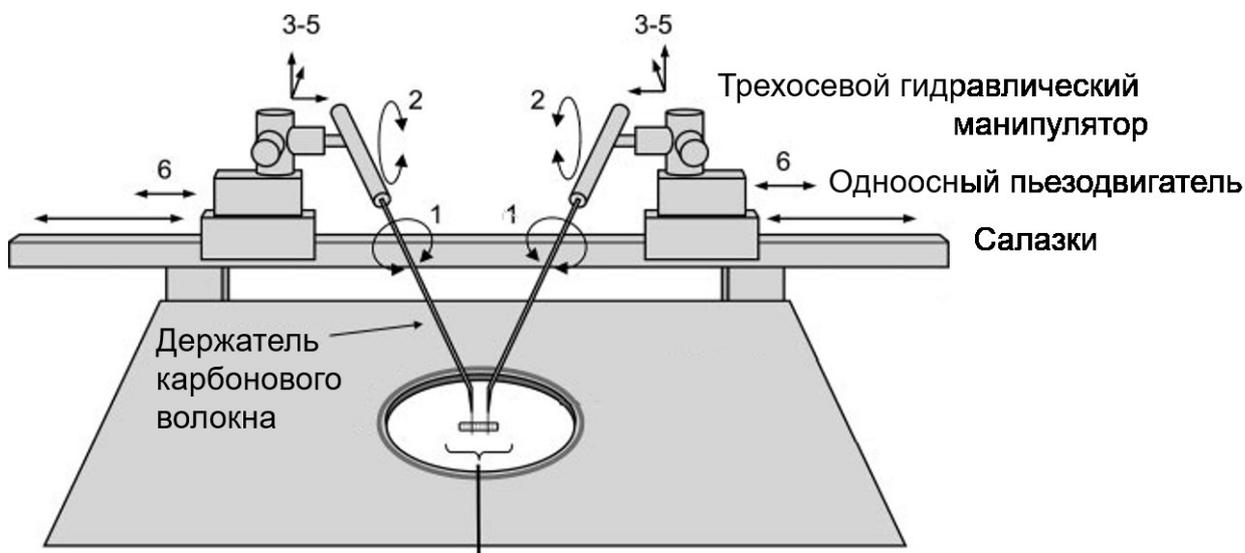


Рисунок 1.14 – Экспериментальная установка двух гибких подвижных карбоновых волокон (Iribe, 2007). Цифры демонстрируют степени свободы [37]

Однако, данная установка не могла охватить весь физиологический диапазон преднагрузки и была способна растянуть кардиомиоцит до длины саркомера не более двух микрометров. Максимальное зарегистрированное напряжение для желудочкового кардиомиоцита крысы составило 16 мН/мм^2 .

Данная установка двух карбоновых волокон является действующей [52, 64].

Установка четырех карбоновых волокон или двух пинцетов (Iribe, 2014)

Ирибэ и соавторы решили эту проблему в 2014 году [35] представив методику четырех карбоновых волокон, модернизировав установку, представленную в 2007 году [37], путем добавления одного трехосевого гидравлического манипулятора.

Карбоновое волокно (третье, дополнительно) приклеивается на дно ванночки, кардиомиоцит фиксируется на нём, путем прижатия сверху другим (четвертым, дополнительным) жестким карбоновым волокном установленном на добавленном гидравлическом манипуляторе. Противоположный край захватывается сверху и снизу двумя гибкими карбоновыми волокнами (рисунок 1.12.Г). Именно этот пинцет из двух гибких волокон является подвижным в ходе эксперимента для задания длины препарата и нагрузки на

него и прецизионно управляется двумя пьезодвигателями P-621.1CL (Physik Instrumente, Германия).

С помощью этой методики получилось реализовать растяжение во всем физиологическом диапазоне, достигнув длины саркомера в 2,3 микрометра.

Максимальное зарегистрированное напряжение не превысило зарегистрированных ранее 16 мН/мм².

Данная установка четырёх карбоновых волокон является действующей.

1.5 Изменение биомеханических характеристик кардиомиоцитов в патологических условиях

Сердце представляет собой тонко скоординированную существенно гетерогенную систему на уровнях организации от молекулярного до органного. Структурно-функциональная неоднородность кардиомиоцитов способна регулировать электромеханическую функцию сердечной мышцы и оптимизировать сердечный выброс [6, 74].

Разное эмбриологическое происхождение ЛЖ и ПЖ сердца приводит к различиям в экспрессии генов, которые, в свою очередь, отражают наличие морфологических различий кардиомиоцитов разных желудочков [22, 44]. Различия в экспрессии генов определяют не только морфологические различия, но и программируют межжелудочковые особенности электрофизиологических свойств кардиомиоцитов за счет особенностей работы ионных каналов, транспортеров и сигнальных путей кардиомиоцитов различных камер сердца [54, 56].

Электрофизиологические различия между кардиомиоцитами ЛЖ и ПЖ, а также механизмы, ответственные за эти различия, изучены на довольно глубоком уровне. Показано, что в сердце млекопитающих желудочковые кардиомиоциты имеют различные форму и длительность потенциала действия, в частности для ПЖ характерна более короткая длительность потенциала действия по сравнению с кардиомиоцитами ЛЖ [50, 56].

Однако, несмотря на большой объем данных по генетическим, морфологическим и электрофизиологическим различиям кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ, информации о различиях в сократимости и силогенерации кардиомиоцитов различных камер практически нет. Большинство исследований проведены на свободно сокращающихся кардиомиоцитах без оценки силовых характеристик клетки. Было показано на ненагруженных кардиомиоцитах, что и амплитуда сокращения, и максимальная скорость укорочения при ненагруженном укорочении кардиомиоцитов ПЖ меньше, чем у миоцитов ЛЖ [50].

На уровне целого сердца были продемонстрированы функциональные различия в ответе ЛЖ и ПЖ на изменение механической нагрузки. Даже незначительные изменения в легочном сосудистом сопротивлении могут привести к уменьшению выброса ПЖ [86] и развитию фиброза [55], в то время как ЛЖ более толерантен к изменению нагрузки [58, 69]. Следовательно, можно предположить о наличии подобных функциональных различий в ответе кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ на изменение механической нагрузки.

Таким образом, анализ литературы показывает, что несмотря на продолжительные и обширные исследования функции ЛЖ и ПЖ в целом сердце, данных непосредственно о различиях в длино- и грузозависимой регуляции сократительной функции одиночных кардиомиоцитов ЛЖ и ПЖ критически мало.

Особое значение в исследованиях по неоднородности миокардиальной ткани придается влиянию патологических условий на изменение градиента электрофизиологических и механических свойств кардиомиоцитов в стенке камер сердца. При таких локальных изменениях свойств сердечной ткани и перераспределению механической нагрузки патологически усиливается механическая и электрическая неоднородность всей сердечной ткани, вследствие чего возникают условия, которые могут способствовать появлению аритмии и аномальному изменению кинетики сегментов камер сердца [6, 19].

При исследовании нарушений функции одного желудочка в патологических условиях необходимо анализировать и изменение состояния другого. Через общие миокардиальные волокна, МЖП и общий перикард, сокращение ЛЖ способствует изменению давления в ПЖ, как и изменение нагрузки на ПЖ влияет на функцию ЛЖ [14].

Очевидно, что для оценки функции миокарда при патологических состояниях необходимо проводить комплексное исследование, охватывающее все камеры сердца. Однако в литературе доступны только отдельные работы о ремоделировании отдельных камер сердца при исследуемом авторами заболевании. Не было обнаружено данных по сравнительному анализу молекулярно-клеточных механизмов нарушения сократительной функции миокарда камер сердца при сердечной недостаточности, вызванной таким социально-значимым заболеванием как СД. СД представляет собой заболевание, вызванное неспособностью островков Лангерганса поджелудочной железы синтезировать инсулин (СД 1 типа) или нарушением способности клеток-мишеней реагировать на инсулин (СД 2 типа). Такое нарушение синтеза и/или расходования инсулина приводит к гипергликемии и вызывает множественную органную недостаточность, в том числе поражает сердечно-сосудистую систему [17]. По результатам исследования EuroHeart survey показано, что среди лиц с острым инфарктом миокарда у 60% выявлено нарушение углеводного обмена, а каждый четвертый пациент имел СД 2 типа. Отмечается линейная корреляция между увеличением заболеваемости СД и ростом осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [34].

Несмотря на различные механизмы запуска, СД 1 и 2 типа связаны с развитием диабетической кардиомиопатии, приводящей к сердечной недостаточности.

Диабетическая кардиомиопатия характеризуется структурными и функциональными аномалиями миокарда, включая гипертрофию, фиброз, апоптоз [12], изменения сосудов сердца в виде микроангиопатии [86]. При диабетической кардиомиопатии уменьшается проводимость сердца и

возникают нарушения ритма [39], снижается его сократительная способность [66]. Исследования на многоклеточных препаратах и кардиомиоцитах показывают снижение амплитуды сокращения и замедление сократительного цикла [72].

Большинство исследований по диабетической кардиомиопатии сфокусировано на влиянии СД на функцию ЛЖ, пренебрегая ПЖ и МЖП. Отдельные клинические данные показывают, что СД 1 и 2 типа часто ассоциируется с систолической дисфункцией как ЛЖ, так и ПЖ [85].

Таким образом, анализ литературы показывает, что, несмотря на успехи в изучении патофизиологии миокарда при сердечной недостаточности, остаются невыясненными многочисленные аспекты формирования и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний. Вывод об изменении функции только одной из камер, как это делается в большинстве исследований, не дает полной информации о причинах и следствиях нарушений клеточных мишеней. На данный момент отсутствуют комплексные данные об изменениях сократительной функции кардиомиоцитов при развитии СД.

1.6 Математическая модель как инструмент исследования биомеханических характеристик кардиомиоцитов

Исходя из понятия научного метода, которым руководствуется научное сообщество, для объяснения экспериментальных фактов выдвигаются гипотезы и строятся математические модели изучаемого объекта. Область математического моделирования живых систем динамично развивается, разрабатывая математические модели, становящиеся источниками новых гипотез, для подтверждения которых требуется постановка новых экспериментов.

Наблюдаемые в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах феномены подлежат теоретическому объяснению. Исследование неоднородности миокардиальной системы как самостоятельного фактора регуляции ее электромеханической функции является актуальной задачей в физиологии сердца, и использование математических моделей приобретает принципиальное значение для решения этой задачи [47, 74].

На сегодняшний день большое развитие получили компьютерные модели целого сердца, созданные при помощи метода конечных элементов [89], экспериментальными данными для которых служат изображения УЗИ, КТ, МРТ, что позволяет использовать модели непосредственно в клинических исследованиях, в персонифицированной медицине [45].

Для корректного воспроизведения активности сердца в трехмерной компьютерной модели необходимо задать функцию миокарда на уровне кардиомиоцита. На данный момент в связи с большим количеством разнообразных экспериментальных данных об электрофизиологической функции сердца существует порядка семидесяти различных моделей электрофизиологии кардиомиоцита. Такие модели разделены на три поколения в зависимости от использованных экспериментальных данных и реализованных ионных токов, каналов, обменников [11], однако каждая из них, в том числе и наиболее популярные, такие как модель Алиева-Панфилова

и семейство моделей Луо-Руди, в своей основе содержит модель Ходжкина-Хаксли 1952 [32].

Однако несмотря на то, что основной функцией сердца является механическая, моделей механики кардиомиоцитов на порядок меньше [60] в связи с наличием на порядок меньшего количества экспериментальных данных вследствие более сложных экспериментальных методик и требований к экспериментальному оборудованию. Если для описания электрофизиологической функции в литературе существуют модели, посвященные межжелудочковым различиям [40], то для механической функции подобных моделей в литературе нет.

В данной диссертации были построены математические модели для описания межжелудочковых особенностей длино- и грузозависимой сократимости. Была использована оригинальная математическая модель, разработанная в ИИФ УрО РАН, которая описывает механическое поведение одиночных кардиомиоцитов мышцы в зависимости от приложенной нагрузки [42, 47]. Модель была разработана на основе разработанной ранее в ИИФ УрО РАН математической модели «Екатеринбург-Оксфорд» [9]. В качестве достоинств данной математической модели можно отметить, что в этой модели учтены механизмы кооперативной активации сократительных белков, так как модель прежде всего ориентирована на воспроизведение реальных экспериментальных данных по сокращению кардиомиоцитов [2, 9].

Далее кратко опишем реологическую схему и основные переменные математической модели.

Кардиомиоцит представлен шестиэлементной реологической схемой (рисунок 1.15), состоящей из активного сократительного элемента (SE) и двух пассивных нелинейно упругих элементов: PE - параллельного упругого элемента, SE – последовательно упругого элемента, двух вязких элементов VS1 и VS2, и последовательного упругого элемента XSE

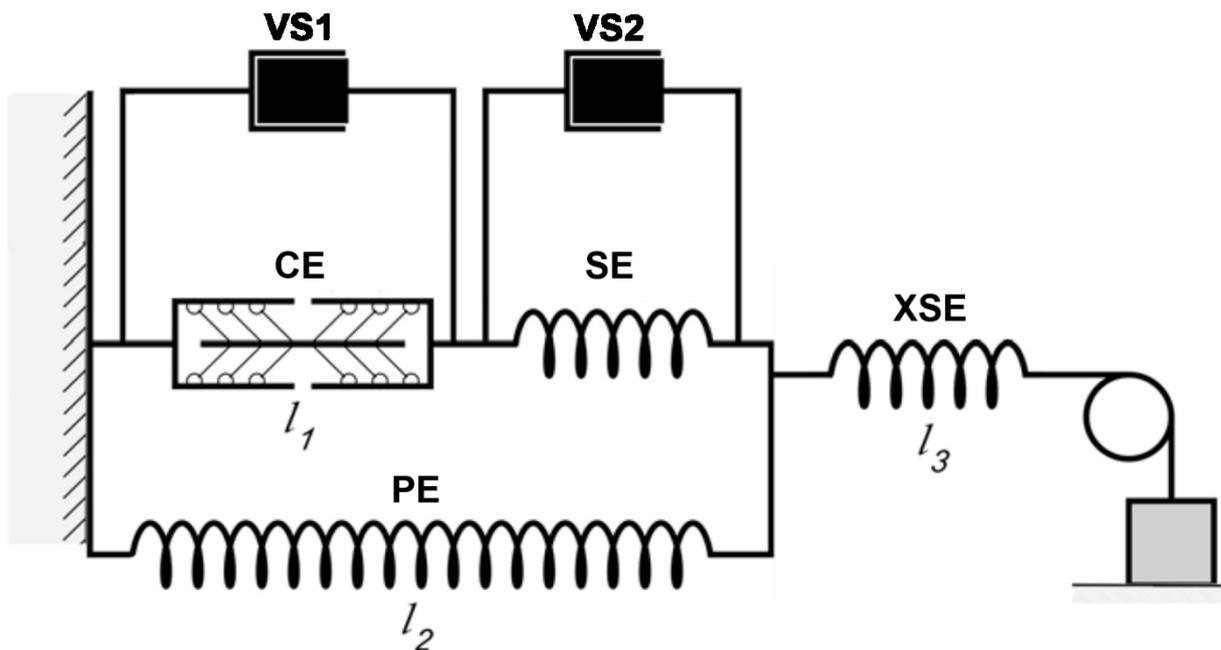


Рисунок 1.15 – Реологическая схема кардиомиоцита в оригинальной математической модели ЕО, разработанной в ИИФ УрО РАН. CE – контрактильный элемент, SE и XSE – последовательные упругие элементы, PE – параллельный упругий элемент, VS1 и VS2 – вязкие элементы. Упругий элемент XSE эмулирует карбоновое волокно в эксперименте.[47]

Параллельный элемент PE определяет свойства пассивные механические свойства кардиомиоцита [9]. Параметры, описывающие элемент PE, определяют наклон зависимости «конечно-диастолическая длина-пассивное напряжение».

$$F_{PE} = \alpha_{PE} \cdot L_{PE} + \beta_{PE}, \quad (1.4)$$

Где L_{PE} – длина элемента PE, α_{PE}, β_{PE} – коэффициенты, постоянные параметры системы.

Последовательный упругий элемент XSE имитирует прикрепленное карбоновое волокно к мембране кардиомиоцита в эксперименте [47]. Упругость XSE соответствует жесткости карбонового волокна. Сумма длин клетки и XSE устанавливается постоянной, в то время как длина

кардиомиоцита изменяется в течение сердечного цикла под нагрузкой XSE (карбонового волокна), т.е. в ауксотоническом состоянии.

$$F_{XSE} = \alpha_{XSE} \cdot L_{XSE} + \beta_{XSE}, \quad (1.5)$$

$$F_{\text{кардиомиоцита}} = F_{XSE}, \quad (1.6)$$

Где L_{XSE} – длина элемента XSE, $\alpha_{XSE}, \beta_{XSE}$ – коэффициенты, постоянные параметры модели.

Активная сила, развиваемая сократительным элементом, пропорциональна средней силе одного мостика и концентрации поперечных мостиков N .

Средняя сила одного мостика p является функцией скорости v укорочения саркомера: $p = p(v)$.

Таким образом:

$$F_{CE} = \lambda \cdot p(v(t)) \cdot N(t), \quad (1.7)$$

Где λ – коэффициент пропорциональности, $N(t)$ – общее число мостиков в момент t .

Количество поперечных мостиков N определяется уравнением:

$$\frac{dN}{dt} = k_{pv} \cdot M_A \cdot n_1 \cdot L_{oz} \cdot (1 - N) - k_{mv} \cdot N, \quad (1.8)$$

Где k_{pv}, k_{mv} описывают константы скорости прикрепления и открепления мостиков, n_1 вероятность нахождения миозиновой головкой свободного места на актиновой нити:

$$n_1 = \begin{cases} 0 & \text{if } temp_{n1} < 0; \\ temp_{n1} & \text{if } temp_{n1} < 1; \\ 1 & \text{otherwise;} \end{cases} \quad (1.9)$$

$$temp_{n1} = (g_1 \cdot l_1 + g_2) \cdot \left(n1_A + \frac{n1_K - n1_A}{(n1_C + n1_Q \cdot e^{-n1_B \cdot l_1})^{\frac{1}{n1_V}}} \right), \quad (1.10)$$

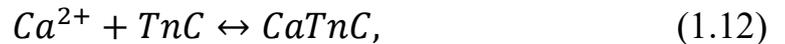
Где g_1, g_2 коэффициенты, постоянные параметры системы, $n1_A$ вероятность присоединения миозина к актину.

L_{OZ} является функцией длины зоны перекрытия толстых и тонких нитей.

$$L_{OZ} = (l_1 + S_0)/(0.46 + S_0), \quad (1.11)$$

Где S_0 параметр модели, l_1 – отклонение длины саркомера от длины покоя.

Функция M_A описывает активацию тонкой нити и сложным образом зависит от кинетики кальций-тропониновых комплексов:



Где TnC – тропонин С, $CaTnC$ – комплекс Ca^{2+} с тропонином С.

Следующее уравнение описывает скорость изменения концентрации кальций-тропониновых комплексов А:

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= a_{on} \cdot (A_{tot} - A)[Ca]_i - a_{off} \cdot A, \\ a_{off} &= a_{off} \cdot e^{-k_a \cdot A} \cdot \pi(N_A), \end{aligned} \quad (1.13)$$

Где a_{on} – константа скорости образования комплексов, a_{off} – константа скорости распада комплексов, A_{tot} – общая концентрация тропонина С в клетке. Переменная $[Ca]_i$ описывает динамическое изменение концентрации цитозольного кальция во времени и подробно описано в [47].

Ключевым звеном в этом уравнении (1.13) является кооперативность сродства кальция к ТnC. Первый тип кооперативности – сродство возрастает с

ростом среднего числа силогенерирующих поперечных мостиков рядом с каждым комплексом CaTnC. Скорость распада CaTnC уменьшается с ростом этого числа. Кооперативность этого типа задается в модели функцией $\pi(N_A)$.

Второй тип кооперативности – сродство кальция к тропонину возрастает с ростом концентраций кальций-тропониновых комплексов. А именно, скорость распада CaTnC уменьшается с ростом концентраций кальций-тропониновых комплексов. В уравнении 1.13 эту кооперативность определяет зависимость $e^{-k_a \cdot A}$.

Более подробно функции кооперативностей первого и второго типов описаны в [2].

Математическая модель позволяет перемещать прикрепленное к кардиомиоциту карбоновое волокно (элемент XSE), т.е. растягивать кардиомиоцит, и, таким образом, получать соотношения «длина-напряжение».

Для расчёта математической модели и визуализации данных расчёта в ИИФ УрО РАН было разработано приложение для операционной системы Windows, позволяющее задавать значения всех параметров модели и начальные значения фазовых переменных и выводить графики изменения фазовых и других переменных.

1.7 Выводы по главе 1

В проанализированной литературе присутствует существенный недостаток экспериментальных данных: единичные зарубежные источники предоставляют данные о межжелудочковых различиях в характеристиках сократительной функции механически нагруженных одиночных кардиомиоцитов в норме и при патологии. Этот факт связан в первую очередь со сложностью изучения выбранного объекта: линейные размеры кардиомиоцита, измеряемые десятками мкм, и развиваемое им напряжение, измеряемое единицами мН/мм², обуславливают высокие требования к измерительной аппаратуре и сложности экспериментальных методик. На сегодняшний день в мире существует всего три функционирующих экспериментальных установки, измеряющие физические свойства кардиомиоцитов, две из которых используют методику фиксации кардиомиоцита при помощи карбоновых волокон.

Также, отсутствие экспериментальных данных приводит к невозможности создания математической модели, воспроизводящей различия в параметрах сократимости кардиомиоцитов желудочков.

Таким образом была сформулирована цель настоящей работы – разработка и создание экспериментальной установки и её программного обеспечения для изучения физических свойств одиночных кардиомиоцитов в норме и их изменений при патологии.

Для достижения поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

- 1) Разработать и создать экспериментальную установку для регистрации физических свойств, динамического изменения развиваемого напряжения и укорочения механически нагруженного кардиомиоцита с применением методики фиксации клетки карбоновыми волокнами.

- 2) Разработать программное обеспечение экспериментальной установки для регистрации физических свойств кардиомиоцита и управления

параметрами его механического нагружения: динамического растяжения и реализации различных режимов сокращения кардиомиоцита – ненагруженного, ауксотонического, изотонического, изометрического.

3) Провести исследование пассивных вязкоупругих и активных сократительных свойств одиночных кардиомиоцитов с учетом их межжелудочковых различий – амплитудных характеристик и параметров временного хода развития напряжения и деформации в норме и при патологии (на примере экспериментального СД1).

4) Разработать математические модели, описывающие феномены, наблюдаемые в эксперименте. Проанализировать возможные механизмы, лежащие в основе межжелудочковых различий в характеристиках сократимости желудочковых кардиомиоцитов.

ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА АППАРАТНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ

2.1 Формирование технического задания на экспериментальную установку

Был составлен следующий список необходимых условий к разрабатываемой экспериментальной установке:

- 1) термостатирование суспензии с одиночными кардиомиоцитами на выбранной температуре в диапазоне значений 15-40 °С. Допустимые колебания температуры ± 0.5 °С;
- 2) стимуляция суспензии с одиночными кардиомиоцитами электрическим импульсом с задаваемыми параметрами: амплитуда 15-35 В, длительность 1-10 мс, частота 1-4 Гц, форма импульса – меандр;
- 3) контакт кардиомиоцита с четырьмя карбоновыми волокнами и четырьмя микроманипуляторами;
- 4) регистрация сигнала деформации (сигнала изменения расстояния между закрепленными карбоновыми волокнами на кардиомиоците – сигнала изменения эффективной длины) кардиомиоцита с частотой не менее 250 кадров в секунду, с разрешением цифровой камеры не менее 1 мкм на пкс;
- 5) регистрация развиваемого кардиомиоцитом напряжения не менее 10 мН/мм²;
- 6) прецизионное перемещение четырех карбоновых волокон, закрепленных на четырех микроманипуляторах, в диапазоне 2 см по осям x, y, z , с разрешением движения не ниже 0.1 мкм для позиционирования в любой точке экспериментальной ванночки в ходе поиска кардиомиоцитов;
- 7) управление перемещением карбонового волокна при помощи аналогового сигнала произвольной формы;

В дюралюминиевую экспериментальную ванночку (рисунок 2.1 Экспериментальная ванночка) диаметром 28 мм и толщиной 4 мм, находящуюся на предметном столике микроскопа, помещается раствор Тирод и несколько капель разбавленной суспензии, содержащей единицы кардиомиоцитов (рисунок 2.1 Кардиомиоцит).

Система термостатирования, управляет нагревом и охлаждением двух элементов Пельтье (рисунок 2.1 PLT), размещенных на термопасте по бокам дюралюминиевой экспериментальной ванночки. Изменение температуры элементов Пельтье приводит к изменению температуры дюралюминиевой экспериментальной ванночки, что в свою очередь, приводит к изменению температуры помещенного в ванночку раствора Тирода и нескольких капель суспензии кардиомиоцитов. Внутри ванночки, в раствор, помещен датчик температуры – термопара, при помощи которого ПО управления системой термостатирования управляет амплитудой и полярностью протекающего тока через элементы Пельтье.

Система стимуляции (рисунок 2.1 Генератор импульсов, Усилитель) позволяет задать экспериментатору параметры стимулирующего импульса – форму, частоту, амплитуду, длительность. Сигнал стимуляции передается на два платиновых электрода (рисунок 2.1 Электрод) помещенных в экспериментальную ванночку и на осциллограф при экспериментальной установке для обеспечения визуального контроля.

На предметном столике микроскопа вокруг экспериментальной ванночки устанавливаются четыре цифровых микроманипулятора (рисунок 2.1 DPZT) – два параллельно слева от ванночки, два параллельно справа от ванночки. На каждый правый цифровой микроманипулятор устанавливается аналоговый одноосный пьезодвигатель (рисунок 2.1 APZT).

На каждый левый цифровой микроманипулятор (две шт.) и на каждый аналоговый одноосный пьезодвигатель (находятся справа, две шт.) устанавливается разработанная конструкция для фиксации специальных держателей карбоновых волокон. В специальный держатель вставляется

карбоновое волокно таким образом, чтобы оставшийся снаружи держателя свободный кончик карбонового волокна имел возможность прикрепления к кардиомиоциту (рисунок 2.1 Стекланный держатель, Карбоновое волокно, Кардиомиоцит).

Экспериментатор при помощи микроскопа находит в экспериментальной ванночке кардиомиоцит, переводит его в центр поля зрения перемещением экспериментальной ванночки, затем, перемещением микроманипулятора свободный кончик карбонового волокна помещается сверху на мембрану кардиомиоцита, пересекая кардиомиоцит, и, после аккуратного вдавливания образуется прочная связь на основе электростатических сил и сил адгезии.

Далее экспериментатору необходимо зажать кардиомиоцит четырьмя карбоновыми волокнами таким образом, чтобы, во-первых, все четыре волокна не касались стекла экспериментальной ванночки, во-вторых, чтобы левая пара волокон удерживала кардиомиоцит снизу и сверху, образуя пинцет, в-третьих, правая пара волокон удерживала кардиомиоцит аналогично левой, также, образуя пинцет.

Два левых волокна, расположенных на двух цифровых микроманипуляторах, являются короткими, жесткими – они образуют жесткий левый пинцет. Сокращение кардиомиоцита не может изменить положение данного пинцета.

Два правых волокна, расположенных на двух аналоговых одноосных пьезодвигателях, являются длинными, гибкими – они образуют гибкий правый пинцет. Сокращение кардиомиоцита изменяет положение данного пинцета.

К оптическому тракту микроскопа подключена цифровая камера, создающая кадры изображения кардиомиоцита с прикрепленными карбоновыми волокнами с частотой 250 Гц, с разрешением менее 1 мкм на пкс (рисунок 2.1 Оптический тракт, камера).

ПО управления цифровой камерой определяет положения левого и правого карбонового волокна, прикрепленных сверху к мембране

кардиомиоцита и рассчитывает их разность. Левое жесткое волокно статично в ходе сокращения кардиомиоцита. Правое гибкое волокно подвижно в ходе сокращения кардиомиоцита. Разность их положений есть эффективная длина кардиомиоцита. Первый входной цифровой сигнал с частотой дискретизации 250 Гц – изменение эффективной длины кардиомиоцита (рисунок 4.5.А). Зная жесткость подвижного волокна по формуле 1.3 рассчитывается сигнал развиваемого напряжения кардиомиоцитом.

При частоте стимуляции равной 1 Гц процесс активного сокращения составляет приблизительно 100 мс, с максимальной развиваемой скоростью не более 150 мкм/с, следовательно, по теореме Найквиста, параметры цифровой камеры позволяют корректно обрабатывать сигнал сокращения кардиомиоцита.

Также ПО управления цифровой камерой при помощи быстрого преобразования Фурье по поперечной исчерченности кардиомиоцита определяет среднюю длину саркомеров кардиомиоцита между карбоновыми волокнами, что становится вторым входным цифровым сигналом с частотой дискретизации 250 Гц – изменение длины саркомеров.

Цифровые микроманипуляторы управляются выходящими IP-пакетами по протоколу UDP с задержкой отправки менее 1 мкс.

ПО управления установкой способно обрабатывать первый входной цифровой сигнал изменения эффективной длины кардиомиоцита и передавать его в качестве выходного сигнала управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями при помощи ЦАП/АЦП с частотой дискретизации не менее 2500 Гц и амплитудой $\pm 5\text{В}$.

Экспериментатор обнаруживает в поле зрения подходящий кардиомиоцит – отсутствие контрактур при стимуляции частотой 1 Гц, явная поперечная исчерченность.

Сфокусировав поле зрения на выбранном кардиомиоците производится запись ненагруженного режима сокращения – запись сигнала изменения длины саркомеров при стимуляции частотой 1 Гц.

Производится фиксация кардиомиоцита четырьмя карбоновыми волокнами.

Далее производится запись ауксотонического режима сокращения (кардиомиоцита, нагруженного волокнами) – запись сигнала изменения эффективной длины кардиомиоцита (изменение разности положений закрепленных карбоновых волокон) и сигнала длины саркомеров при стимуляции частотой 1 Гц.

При помощи ПО управления установкой, формируя различные выходные сигналы управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями на основе записанного ранее сигнала изменения эффективной длины сокращающегося кардиомиоцита в ауксотоническом режиме, экспериментатор производит запись сигнала изменения эффективной длины кардиомиоцита сокращающегося в изометрическом и изотоническом режимах.

Эксперимент заканчивается проведением протоколов последовательного растяжения ауксотонически сокращающегося кардиомиоцита для изучения длинозависимой регуляции сократимости и протокола получения вязкоупругого гистерезиса покоящегося кардиомиоцита.

2.2 Предметный столик и экспериментальная ванночка

Суспензия с одиночными кардиомиоцитами помещается в экспериментальную ванночку. Для монтирования экспериментальной ванночки и микроманипуляторов на микроскопе был разработан предметный столик в САПР КОМПАС-3D (АСКОН, Россия) и изготовлен из листа алюминия (рисунок 2.2).

Прорези на предметном столике расположены таким образом, чтобы обеспечить возможность монтирования микроманипулятора в любую точку столика.

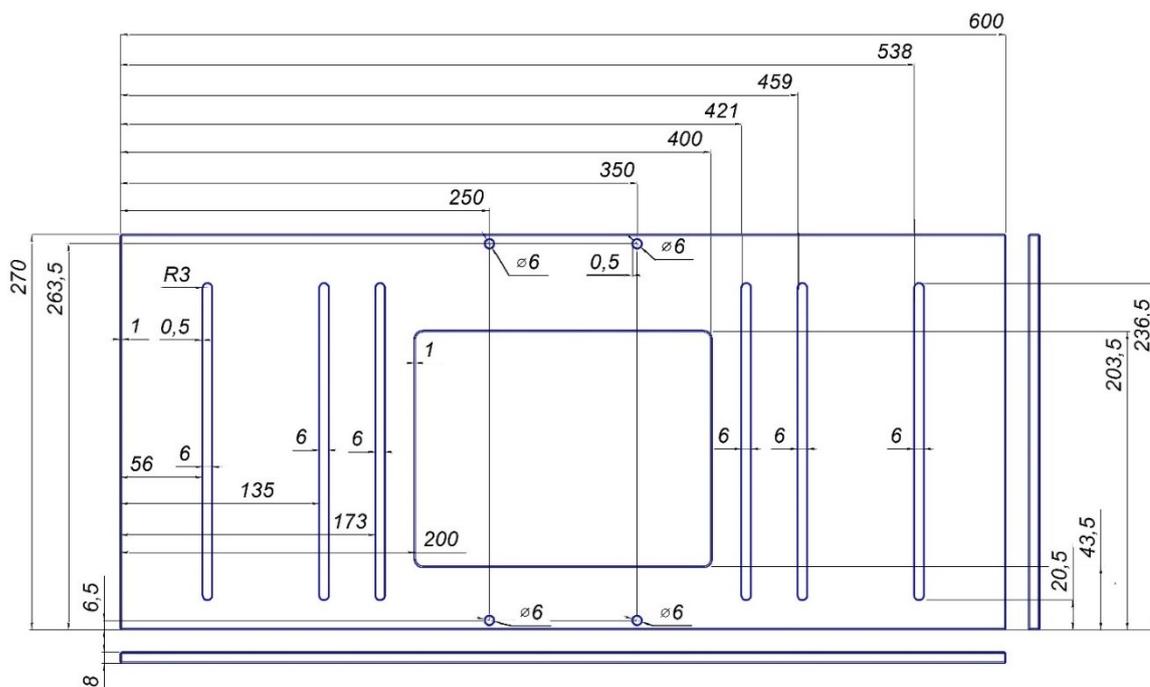


Рисунок 2.2 – Чертёж предметного столика установки

Экспериментальная ванночка, в которой в растворе Тирод находятся одиночные кардиомиоциты, должна иметь достаточную рабочую площадь и низкие бортики, чтобы минимально ограничивать свободный ход стеклянных держателей карбоновых волокон. Разработанная ванночка состоит из двух деталей – дюралюминиевая основа и пластиковая вставка (рисунок 2.3). Чертежи и трехмерные модели были созданы в САПР КОМПАС-3D (АСКОН, Россия).

Ванночка имеет технологические отверстия для модулей перфузии, стимулирующих электродов и элементов Пельтье, при помощи которых реализован нагрев ванночки. Пластиковая вставка предотвращает контакт раствора и дюралюминиевой основы, имеет технологические отверстия для стимулирующих электродов и специальную гребенку для ламинаризации потока раствора, поступающего в ванночку через систему перфузии.

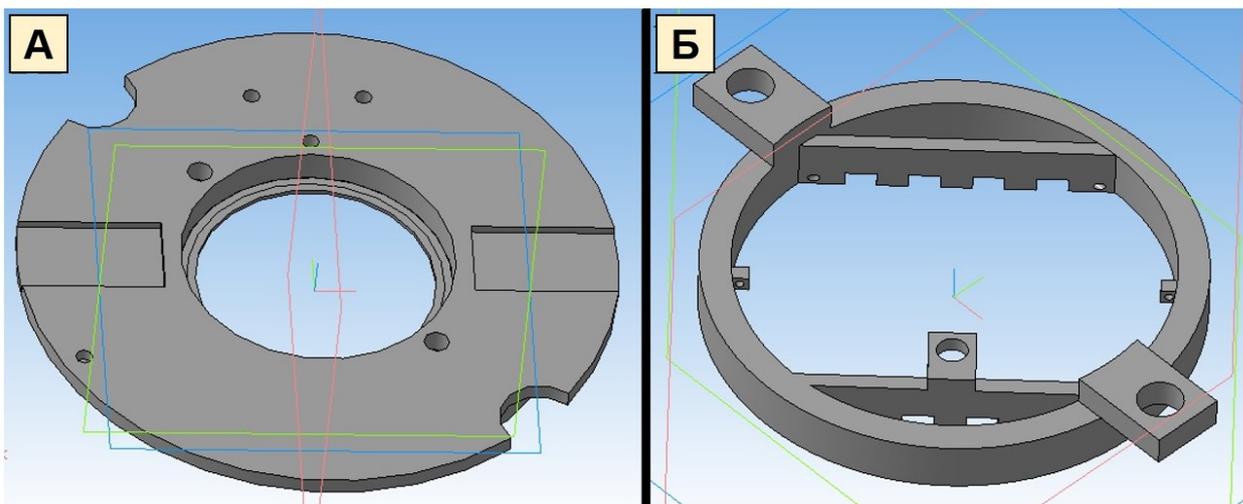


Рисунок 2.3 – Детали экспериментальной ванночки. А: Дюралюминиевая основа; Б: Пластиковая вставка

2.3 Система термостатирования

В качестве нагревательных элементов использованы два миниатюрных элемента Пельтье TEC1-00712: габаритные размеры, мм: 10x10x3.2; максимальное напряжение, В: 0.8; максимальный ток, А: 3; сопротивление, Ом: 0.2 (рисунок 2.4.А). Их выбор обоснован способностью производить как нагрев, так и охлаждение раствора, что недоступно индуктивным и резистивным нагревателям, и позволяет проводить эксперименты не только при физиологических температурах раствора (~35.5 °С), но и при пониженных (~15 °С)– при гипотермии. Также, элементы Пельтье позволяют достичь мощности нагрева в единицы Вт при меньших линейных размерах элемента относительно резистивных нагревателей, что актуально в условиях загруженного приборами пространства экспериментальной ванночки и предметного столика при биофизических экспериментах.

Для блока питания выбранных элементов Пельтье была выбрана схема питания процессора на материнской плате: электронный ключ из двух силовых транзисторов типа MOSFET n-канальный IRLB8748PBF; полумостовой драйвер электронного ключа IR2104PBF, ШИМ-контроллер с частотой 62.5 кГц на платформе Arduino Nano (рисунок 2.4.Б).

Для формирования широтно-импульсно модулированного (ШИМ) сигнала (процента заполнения ШИМ сигнала), был использован программный ПИ-регулятор – частный случай ПИД-регулятора – на платформе Arduino Nano.

$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \cdot \int_0^t e(\tau) d\tau, \quad (2.1)$$

Где:

- $u(t)$ – значение управляющего воздействия на процесс;
- $e(t)$ – ошибка регулирования – рассогласование или отклонение величины от заданной;
- K_p, K_i – коэффициенты усиления пропорциональной и интегрирующей составляющих регулятора, соответственно.

Для определения значений коэффициентов K_p, K_i были проведены эксперименты с нагревом раствора в экспериментальной ванночке с изменением параметра K_p в диапазоне от 3 до 7, параметра K_i в диапазоне от 0.006 до 0.012.

Коэффициенты, обеспечившие небольшие осцилляции и нагрев за приемлемое время, признавались наиболее подходящими.

На рисунке 2.4.В показано изменение температуры раствора в экспериментальной ванночке в зависимости от времени при различных значениях коэффициента K_i (выделены цветом) и при фиксированном K_p равном 5.

При достижении заданной температуры, равной 30 °С (рисунок 2.4.В), коэффициенты $K_p = 5, K_i = 0.012$ (рисунок 2.4.В, зеленая линия) продемонстрировали самое быстрое время нагрева, но и самые большие осцилляции, а коэффициенты $K_p = 5, K_i = 0.006$ (рисунок 2.4.В, синяя линия) продемонстрировали наименьшие осцилляции, но и наименьшее время нагрева.

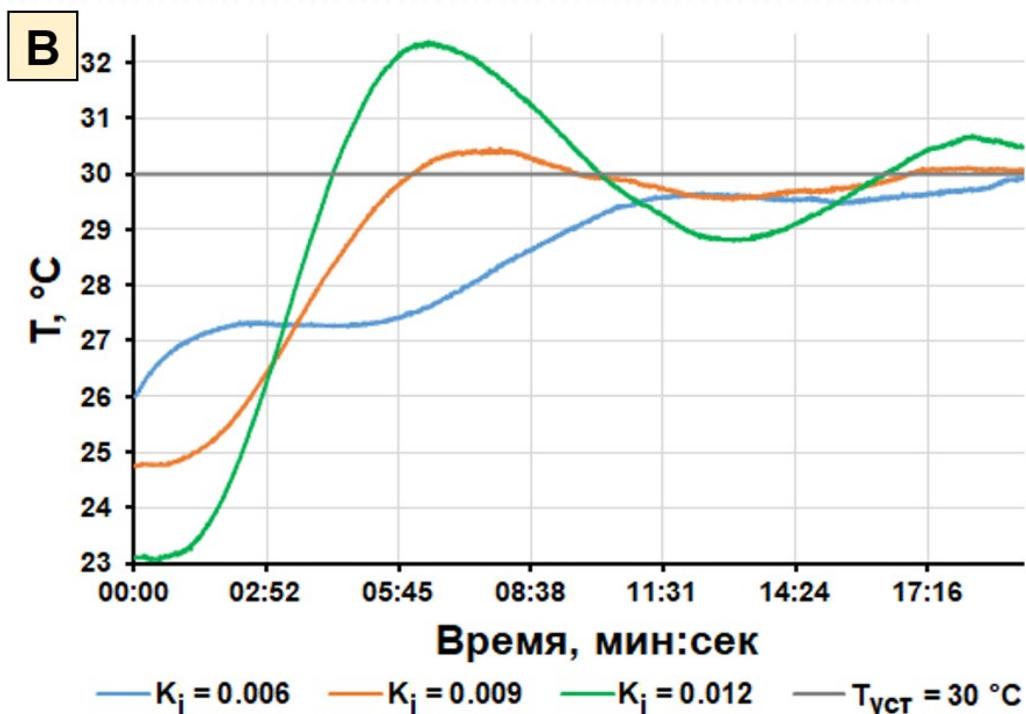
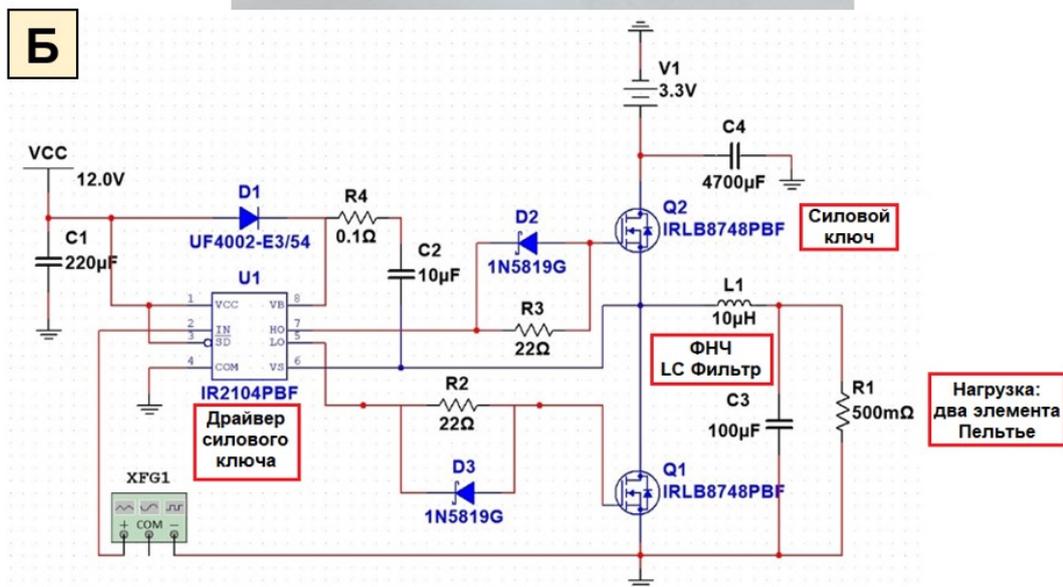
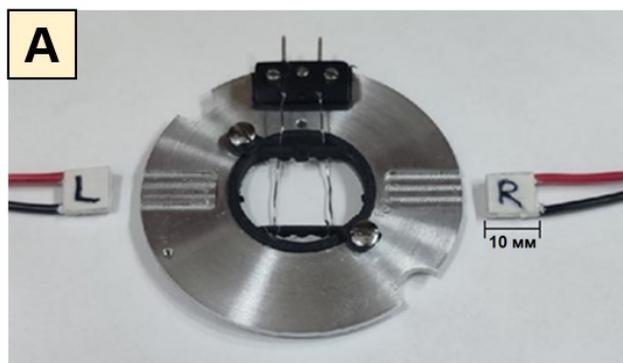


Рисунок 2.4 – Разработка системы термостатирования. А: Элементы Пельтье TEC1-00712, закрепленные на экспериментальной ванночке. Б: Принципиальная электрическая схема блока питания элементов Пельтье, выполнена в программе NI Multisim 14.2 (NI, США). В: Процесс подбора интегрального коэффициента K_i ПИ-регулятора

Поэтому, в соответствии с проведенной серией экспериментов коэффициент пропорциональной составляющей был выбран равным 5, коэффициент интегральной составляющей был выбран равным 0.009.

Проведены пробные эксперименты по нагреву и охлаждению раствора в экспериментальной ванночке, определившие диапазон термостатирования: 15-40 °С. Колебания температуры не превышали ± 0.5 °С [67].

2.4 Контакт кардиомиоцит-углеродное волокно-микроманипулятор

На каждый левый цифровой микроманипулятор (две шт.) и на каждый аналоговый одноосный пьезодвигатель (находятся справа, две шт.) устанавливается разработанная конструкция для фиксации специальных держателей углеродных волокон. В специальный держатель вставляется углеродное волокно таким образом, чтобы оставшийся снаружи держателя свободный кончик углеродного волокна имел возможность прикрепления к кардиомиоциту – перемещением микроманипулятора свободный кончик углеродного волокна помещается сверху на мембрану кардиомиоцита, пересекая кардиомиоцит, и, после аккуратного вдавливания образуется прочная связь на основе электростатических сил и сил адгезии.

В качестве исходного материала для изготовления специального переходника-держателя углеродного волокна были использованы стеклянные капилляры для микроэлектродов (Sutter Instrument, США) внешним диаметром 2 мм, внутренним – 1.16 мм и длиной 10 см.

Чтобы надежно зафиксировать углеродное волокно в стеклянном капилляре необходимо создать у стеклянной трубки тонкий кончик. Для этого использовался пуллер (РС-10, Narishige, Япония). Стеклянная заготовка помещалась в пуллере таким образом, чтобы желаемое место создания тонкого кончика находилось внутри спирали нагрева пуллера. Верхний конец трубки жестко фиксируется, нижний фиксируется на подвижном грузе. При нагреве спирали, трубка под силой тяжести груза движется вниз, удлиняясь и утончаясь. Температура спирали подбирается экспериментально (~50-80°С

для изготавливаемых в данной работе держателей). Тонкий стеклянный кончик обрезался, карбоновое волокно вставлялось в капилляр диэлектрическим пинцетом и фиксировалось клеем на основе цианоакрилата.

В момент эксперимента карбоновые волокна, которые находятся на внешней мембране кардиомиоцита, расположены в горизонтальной плоскости, а расстояние от кардиомиоцита до микроманипулятора лежит во фронтальной плоскости (рисунок 1.12, рисунок 2.1). Таким образом, нужно было обеспечить оптимальный угол изгиба стеклянного держателя, к которому с одной стороны при помощи крепится карбоновое волокно, а другая сторона держателя фиксируется на манипуляторе.

Эмпирически было найдено, что наиболее удачным для проведения эксперимента оказался угол стеклянного держателя карбонового волокна равный 80° . Такая конфигурация держателя позволяет экспериментатору без затруднений поднять при помощи волокон кардиомиоцит со дна ванночки и обеспечить оптимальный контакт между волокнами в пинцете.

Внутренний диаметр изготовленных стеклянных держателей совпал с внешним диаметром игл инсулиновых шприцов, поэтому была разработана конструкция жесткой фиксации инсулиновых шприцов на микроманипуляторе с возможностью выставления необходимого угла во фронтальной плоскости.

В текущей модификации методики карбоновых волокон используются два жестких и два гибких волокна фирмы Tsukuba Materials Information Laboratory (Япония) образующих, соответственно, жесткий и гибкий пинцет. Исходя из предыдущих исследований [35, 46] было принято считать волокно жестким, если его длина не превышает 0.4 мм, а суммарную жесткость гибкого пинцета из двух гибких карбоновых волокон установить равной 0.0400 ± 0.0025 мкН/мкм. Было определено, что карбоновое волокно из данной партии данной фирмы обладает жесткостью, равной 0.020 ± 0.005 мкН/мкм, при длине в 1 мм. Было принято решение, создавать гибкие карбоновые волокна длиной 1 мм, затем определять жесткость отдельного каждого волокна, и далее подбирать

гибкий пинцет из двух гибких карбоновых волокон таким образом, чтобы суммарная жесткость двух волокон удовлетворила требованию, заданному выше.

Измерение жесткости карбоновых волокон

Для определения силы, развиваемой кардиомиоцитом (формула 1.3), необходимо знать коэффициенты жёсткости используемых в эксперименте гибких карбоновых волокон

Для измерения жёсткости карбонового волокна был использован датчик силы Aurora scientific force transducer system 406a. Функционально данное устройство состоит из блока управления датчиком силы и из самого датчика силы. Разрешение датчика силы 0.01 мкН [15].

Измерение величины действующей силы на датчик определяется с помощью вольтметра, установленного на передней панели блока управления. При приложении силы к датчику показание вольтметра изменяется пропорционально чувствительности равной 50 мкН/В [15].

При помощи микроскопа и микроманипулятора карбоновое волокно приводится в контакт с датчиком силы. Затем при помощи разработанного ПО управления в среде разработки LabVIEW 2015 (NI, США), микроманипулятор производит пять последовательных шагов по 2 мкм по направлению к датчику, увеличивая прикладываемую к датчику силу карбонового волокна. Измерение повторяется три раза.

Для каждого набора данных строится зависимость измеряемой силы от смещения микроманипулятора. Затем производится линейная аппроксимация каждого из трех наборов точек (рисунок 2.5 черная, зеленая и красная пунктирная линии) углы наклонов полученных прямых являются коэффициентами жёсткости карбонового волокна в единицах мкН/мкм (рисунок 2.5 0.0138, 0.0.134, 0.0135). Для получения итогового значения коэффициента жесткости, три полученных значения усредняются.

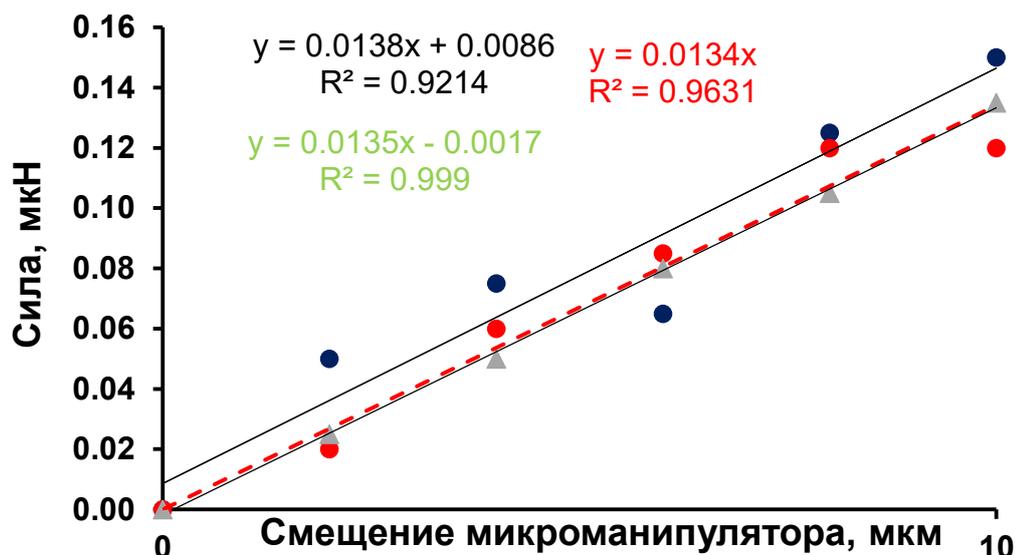


Рисунок 2.5 – Расчёт коэффициента жёсткости карбонового волокна

2.5 Система стимуляции кардиомиоцита электрическим импульсом

Для активации сокращения одиночного кардиомиоцита в экспериментальной ванночке необходимо было реализовать систему стимуляцию кардиомиоцита электрическим полем. Параметры импульса подобраны по методической литературе [59, 77]: амплитуда 15-35 В, длительность 1-10 мс, частота 1-4 Гц, форма импульса – меандр.

Два платиновых электрода выведены в технологические отверстия экспериментальной ванночки (рисунок 2.3, рисунок 2.4.А) для соединения их с генератором импульсов.

В качестве генератора импульсов был взят генератор FY3200S (FeelTech, Китай). Генератор производит импульс необходимой формы (меандр), длительности (1-10 мс), частоты (1-4) Гц, но всегда фиксированной амплитуды – 4.8 В, что соответствует единице транзисторно-транзисторной логики (ТТЛ). Данный сигнал подается на: порт Start/Mark in блока DSI 300 системы оптического контроля (IonOptix, США), на порт АЦП платы L-502 (LCARD, Россия), установленной в управляющим экспериментальной установкой персональном компьютере, и на вход усилителя оригинальной конструкции (рисунок 2.6).

Усилитель оригинальной конструкции построен на базе оптрона CNY17-3 и силового транзистора КТ829А (рисунок 2.6). Оптодрон обеспечивает гальваническую развязку земли экспериментальной ванночки и земель остальных элементов экспериментальной установки, что повышает время жизни кардиомиоцитов, помещенных в экспериментальную ванночку, ограждая суспензию от паразитных токов, протекающих по земле экспериментальной установки. Блок переключателей замыкает выходные обмотки трансформатора таким образом, чтобы при необходимости удвоить напряжение или ток.

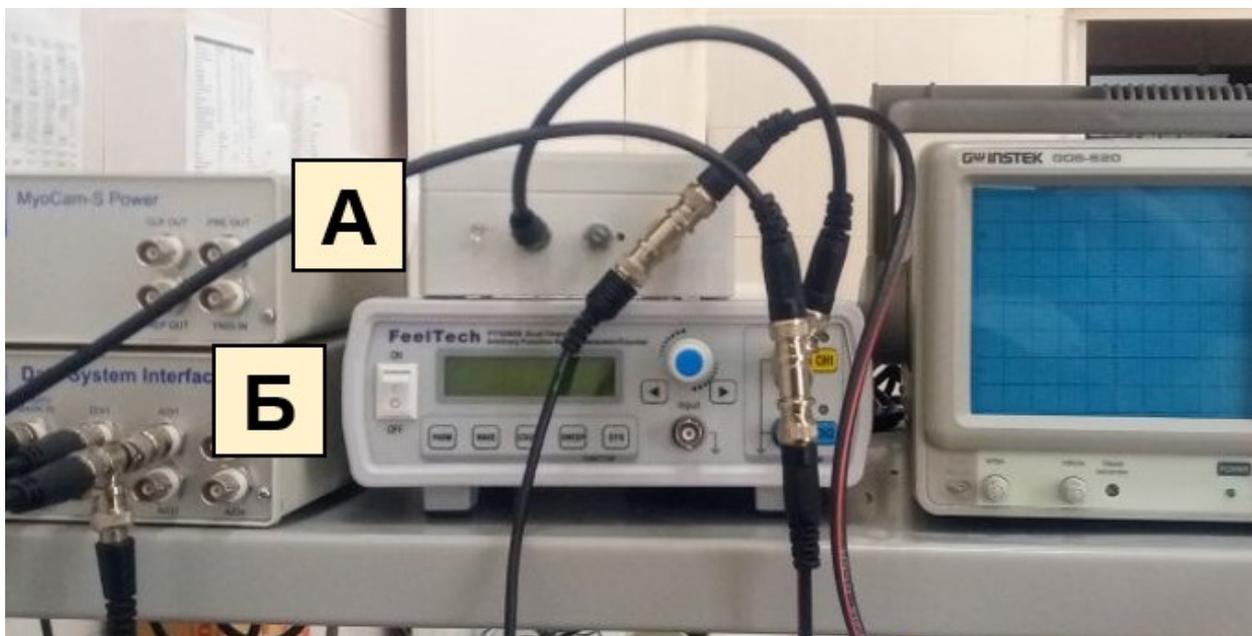


Рисунок 2.6. А: Усилитель стимулирующего сигнала оригинальной конструкции. Б: Генератор FY3200S (FeelTech, Китай)

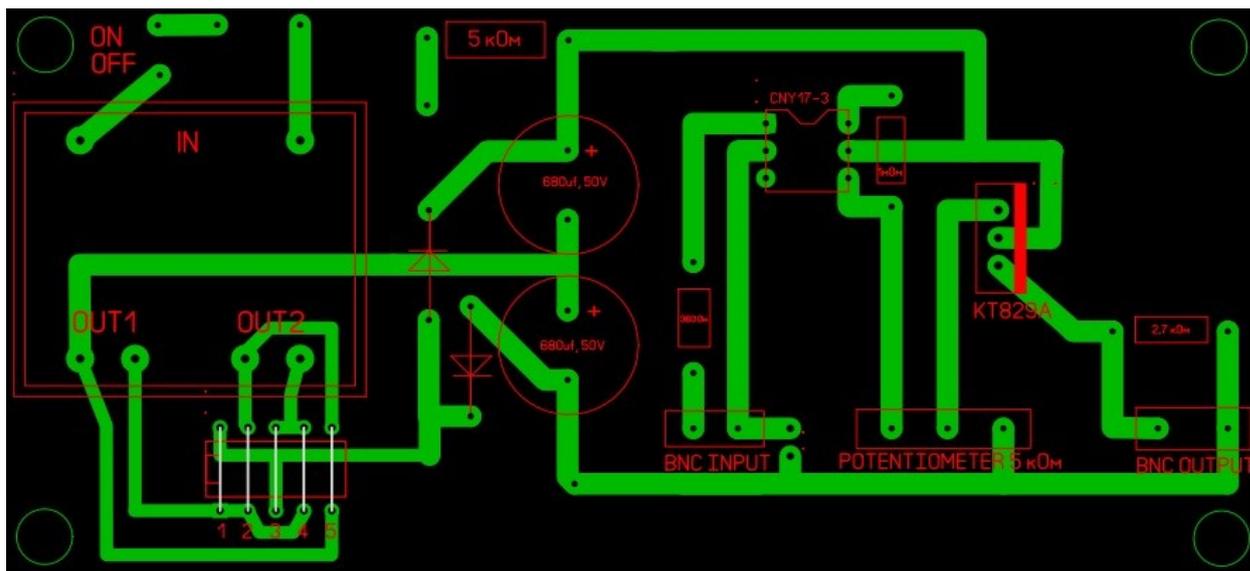


Рисунок 2.7 – Печатная плата усилителя стимулирующего сигнала оригинальной конструкции. Выполнено в программе Sprint Layout 5.0 (АВАСОМ, Германия)

2.6 Система оптического контроля

В экспериментальной установке используется инвертированный микроскоп AE31E Trinocular (Motic, Китай) и набор объективов с коэффициентами увеличения 5, 10 и 40.

В качестве системы оптического контроля для определения положений карбоновых волокон, закрепленных на кардиомиоците, и для определения длины саркомеров была выбрана коммерческая система «Myocyte Contractility Recording System» (IonOptix, США) [31]. Данная система состоит из цифровой камеры MyoCam-S, блока питания MyoCam-S Power и блока ввода-вывода Data System Interface DSI 300, ПО IonWizard (рисунок 2.8).

Камера MyoCam-S производит видеосъемку в разрешении 774x87 пикселей с частотой 250 кадров в секунду. При калибровке с использованием объектива с коэффициентом увеличения 40 было определено следующее соотношение расстояния на один пиксель: 0.294 мкм на пкс.

ПО IonWizard анализирует входящий видеопоток при помощи двух модулей (рисунок 2.9). Модуль EDQACQ способен определять положения

карбоновых волокон, закрепленных на кардиомиоците, и рассчитывать расстояние между ними, которое далее принимается как эффективная длина кардиомиоцита. Модуль SARACQ при помощи быстрого преобразования Фурье по поперечной исчерченности кардиомиоцита способен определить среднюю длину саркомеров кардиомиоцита в выбранной области.

Блок ввода-вывода Data System Interface DSI 300 обеспечивает взаимодействие со всеми остальными сигналами, кроме видеопотока. ПО IonWizard, определяя появление единицы ТТЛ на порту Start/Mark in блока DSI 300, приходящей от системы стимуляции в момент подачи стимула в экспериментальную ванночку, ставит на всех записях временную отметку о регистрации события.

Также данный блок содержит два выхода ЦАП (D/A1, D/A2) разрядностью 12 бит, диапазоном напряжений ± 5 В, и четыре входа АЦП разрядностью 16 бит, диапазоном напряжений ± 5 В (A/D1-4). При помощи ПО IonWizard порт D/A1 был настроен на передачу сигнала эффективной длины кардиомиоцита пропорциональным переводом диапазона длин клетки 0-100 мкм в диапазон напряжений ± 5 В. Порт A/D1 был настроен на приём и запись сигнала управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR (Piezosystem Jena, Германия).

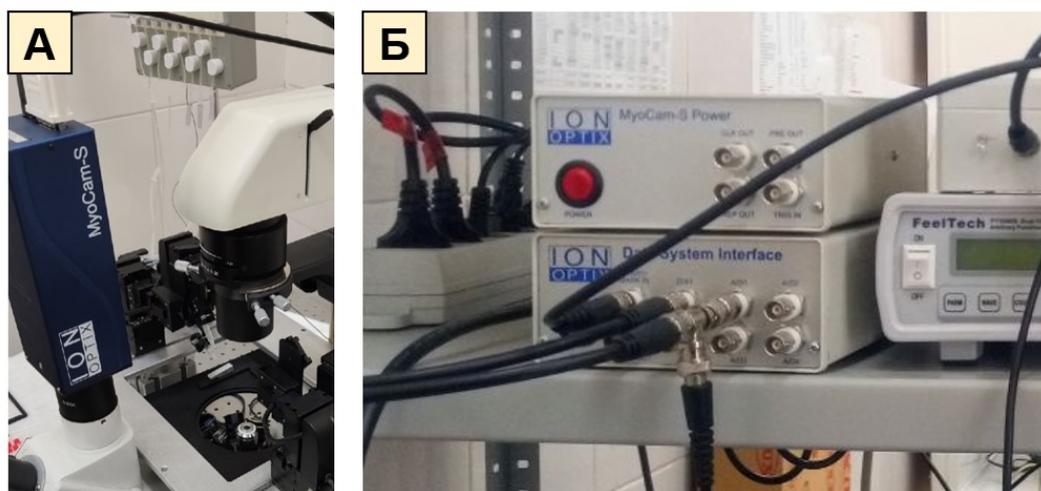


Рисунок 2.8. А: Цифровая камера MyoCam-S. Б: Блок питания MyoCam-S Power и блок ввода-вывода Data System Interface DSI 300

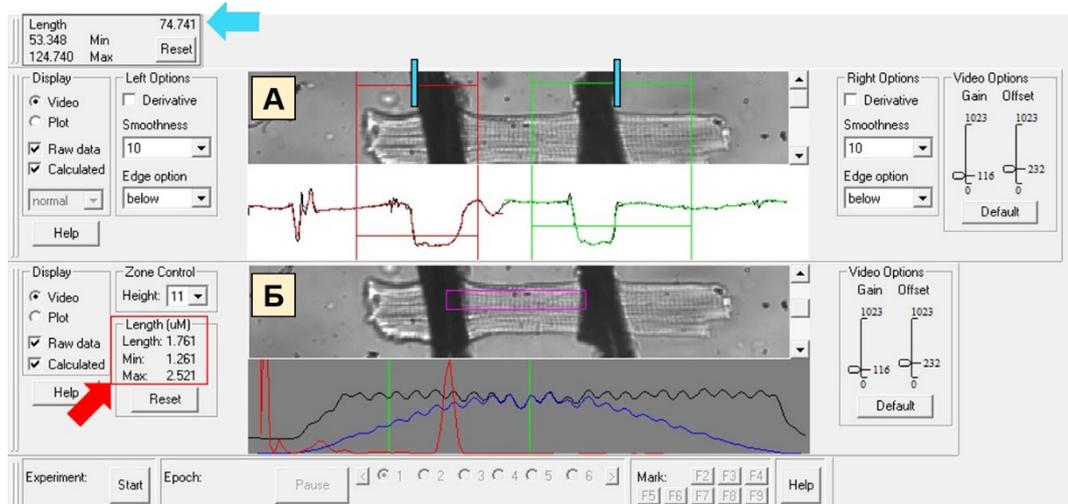


Рисунок 2.9. А: Модуль EDQACQ – текущее расстояние между карбоновыми волокнами или эффективная длина клетки 74.741 мкм, программные метки выделены бирюзовым цветом. Б: Модуль SARACQ – расчётная текущая средняя длина саркомеров кардиомиоцита при помощи быстрого преобразования Фурье составляет 1.761 мкм, указано красной стрелкой

2.7 Система цифрового микроманипулирования

Для управления положением карбонового волокна использованы цифровые микроманипуляторы uMr-3 new triple axis system (Sensapex, Финляндия). Диапазон позиционирования данной системы равен 20 мм, это соотносится с размерами экспериментальной ванночки. Разрешение движения данной системы составляет 5 нм. Подобное сочетание диапазона и разрешения перемещения выгодно отличает данную систему микроманипулирования, от аналогов, представленных на рынке (таблица 2.1). Также, немаловажным фактором является максимальное количество микроманипуляторов, поддерживаемых одним блоком управления. Для реализации конфигурации четырех карбоновых волокон необходимо одновременное синхронное управление четырьмя микроманипуляторами, что затруднительно для систем, у которых блок управления поддерживает одновременное управление только одним или двумя микроманипуляторами.

Таблица 2.1 – Сравнение современных систем микроманипулирования

Название	Sensapex, New Triple Axis (Финляндия)	Narishige, EMM-3NV (Япония)	Sutter Instrument, MP-385-4 (США)
Привод	Пьезоэлектрический	Механический	Механический
Диапазон позиционирования, мм	20	40	25
Разрешение, нм	5	20-100	62,5
Максимальная скорость, мм/с	5	3.6	5
Максимальное количество манипуляторов, поддерживаемых одним блоком управления	65536	1	2

Система цифрового микроманипулирования Sensapex (рисунок 2.10) состоит из следующих элементов:

- *uMp-3 triple axis micromanipulator* - трёхосевой микроманипулятор в количестве четырех штук. Микроманипуляторы Sensapex построены на запатентованных линейных пьезоэлектрических двигателях, имеют диапазон позиционирования 20 мм, разрешение движения – 5 нм, и поддерживают максимальную нагрузку в 150 г [90];
- *uM-TSC touch screen control unit* - блок управления системой. Блок управления объединяет подключенные микроманипуляторы в единую локальную сеть Ethernet, предоставляет информацию о координатах микроманипуляторов x, y, z в реальном времени, также предоставляет возможность общих настроек всех подключенных микроманипуляторов, таких как калибровка и выставление лимитов осевого перемещения, определение фиксированных значений ускорений и создание виртуальных осей движения;

- *uM-RW3 remote wheel interface* - блок ручного управления микроманипуляторами. На данном блоке находится три вращающихся штурвала, каждый задает движение по определенной оси (x, y, z);
- *uM-HUB* - управляющий хаб. По умолчанию хаб не используется в системе микроманипулирования, однако, если используется более двух микроманипуляторов или необходим контроль при помощи персонального компьютера, хаб включается в систему.

Т.к. система микроманипулирования Sensapex является цифровой, то команды управления передаются посредством протокола UDP в локальной сети Ethernet.

Для управления цифровыми микроманипуляторами Sensapex при помощи персонального компьютера в данной работе был использован Software Development Kit – набор средств разработки, размещенный на сайте производителя в свободном доступе. Он содержит библиотеку `ump.dll`, включающую 65 функций управления микроманипуляторами, таких как: запрос координат, движение до выбранной координаты, шаговое движение, экстренная остановка и другие.



Рисунок 2.10 – Система цифрового микроманипулирования Sensapex

2.8 Система аналогового микроманипулирования

В отличие от цифровых микроманипуляторов Sensapex uMr micromanipulators, поддерживающих только линейное перемещение, одноосные пьезодвигатели PU 65 HR (piezosystem jena, Германия) способны воспроизвести по форме любую траекторию движения, заданную аналоговым сигналом амплитудой в диапазоне $0... +10$ В на блок управления NV 40/3 (piezosystem jena, Германия). Разрешение движения пьезодвигателей PU 65 HR составляет 0.13 нм. Резонансная частота – 1320 Гц [91]. Ограничением использования данных пьезодвигателей является их малый диапазон перемещения, всего 65 мкм. Поэтому для возможности их использования мы установили пьезодвигатели PU 65 HR на цифровые микроманипуляторы Sensapex с диапазоном перемещения 20 мм. Микроманипулятор Sensapex uMr

корректно функционирует в диапазоне нагрузок 0-150 г, пьезодвигатель PU 65 HR весит 28 г, что составляет приблизительно 19% от максимальной допустимой нагрузки на микроманипулятор Sensapex uMr.

Несмотря на то, что данное объединение двух приборов микропозиционирования уменьшает устойчивость экспериментальной установки к вибрациям и шумам, данный шаг является оправданным и необходимым для обеспечения управления режимами сокращения кардиомиоцита по методике, описанной в пункте 2.1 – воспроизведение траектории изменения эффективной длины (деформации) кардиомиоцита. Микроманипуляторы Sensapex поддерживают исключительно линейное перемещение и не способны полностью воспроизвести сложный профиль сокращения кардиомиоцита. В свою очередь, пьезодвигатели PU 65 HR способны воспроизводить любое движение, заданное формой аналогового управляющего сигнала в диапазоне до частоты резонанса пьезокристалла.

На два из четырех микроманипуляторов Sensapex были установлены два пьезодвигателя PU 65 HR (рисунок 2.11). Введение дополнительных аналоговых манипуляторов в установку позволило нам задавать траекторию движения манипуляторов аналогичную форме сигнала деформации сокращающегося кардиомиоцита, что необходимо для реализации изометрического режима сокращения (см. главу 1).

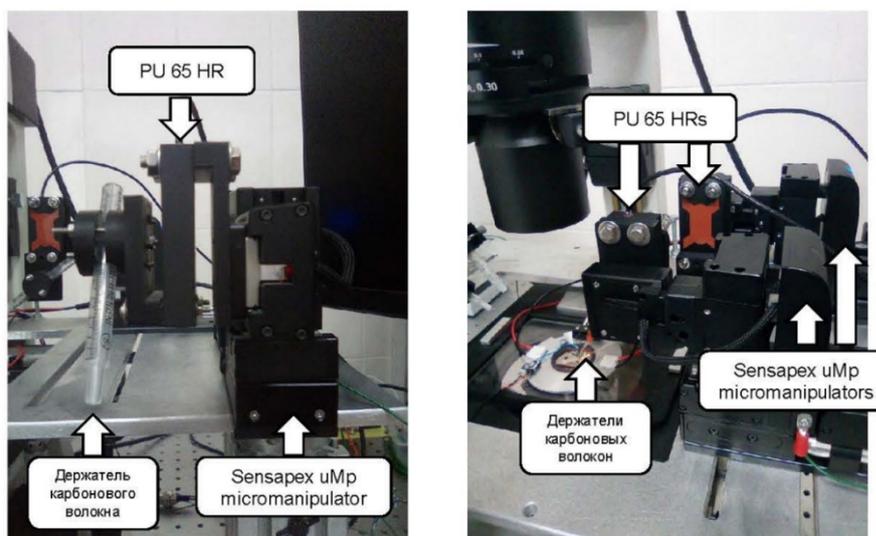


Рисунок 2.11 – Установка пары аналоговых пьезодвигателей PU 65 HR на пару цифровых микроманипуляторов Sensapex

2.9 Сигнальные цепи экспериментальной установки

В персональный компьютер управления экспериментальной установкой с ПО LabVIEW 2015 (NI, США) была установлена многофункциональная плата АЦП / ЦАП для шины PCIE (PCI Express) L-502 (LCARD, Россия).

L-502 имеет АЦП 16 бит / 2 МГц с диапазоном измерения входного сигнала до ± 10 В, 16 каналов в дифференциальном режиме, 2-канальный 16-битный ЦАП с частотой вывода 1 МГц [92].

Первый логический (четвертый физический) канал АЦП в дифференциальном режиме с диапазоном ± 10 В подключен к электрической цепи стимулятора для обнаружения подаваемых импульсов в виде единицы ТТЛ;

Второй логический (девятый физический) канал АЦП в дифференциальном режиме с диапазоном ± 10 В подключен к порту D/A1 блока Data System Interface DSI 300 для записи передаваемого аналогового сигнала изменения длины сокращающегося кардиомиоцита;

Первый канал ЦАП подключен для передачи аналогового сигнала управления одноосными пьезодвигателями PU 65 HR во входящий порт блока NV 40/3 и в порт A/D1 блока Data System Interface DSI 300 для одновременной записи данного сигнала с экспериментальными данными;

При помощи ПО IonWizard порт D/A1 блока ввода-вывода Data System Interface DSI 300 настроен на передачу сигнала эффективной длины кардиомиоцита пропорциональным переводом диапазона длин клетки 0-100 мкм в диапазон напряжений ± 5 В.

Порт A/D1 блока ввода-вывода Data System Interface DSI 300 настроен на приём и запись сигнала управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR.

Порт Start/Mark in блока ввода-вывода Data System Interface DSI 300 подключен к электрической цепи стимулятора для обнаружения подаваемых импульсов в виде единицы ТТЛ.

Схема сигнальных цепей экспериментальной установки представлена на рисунке 2.12.

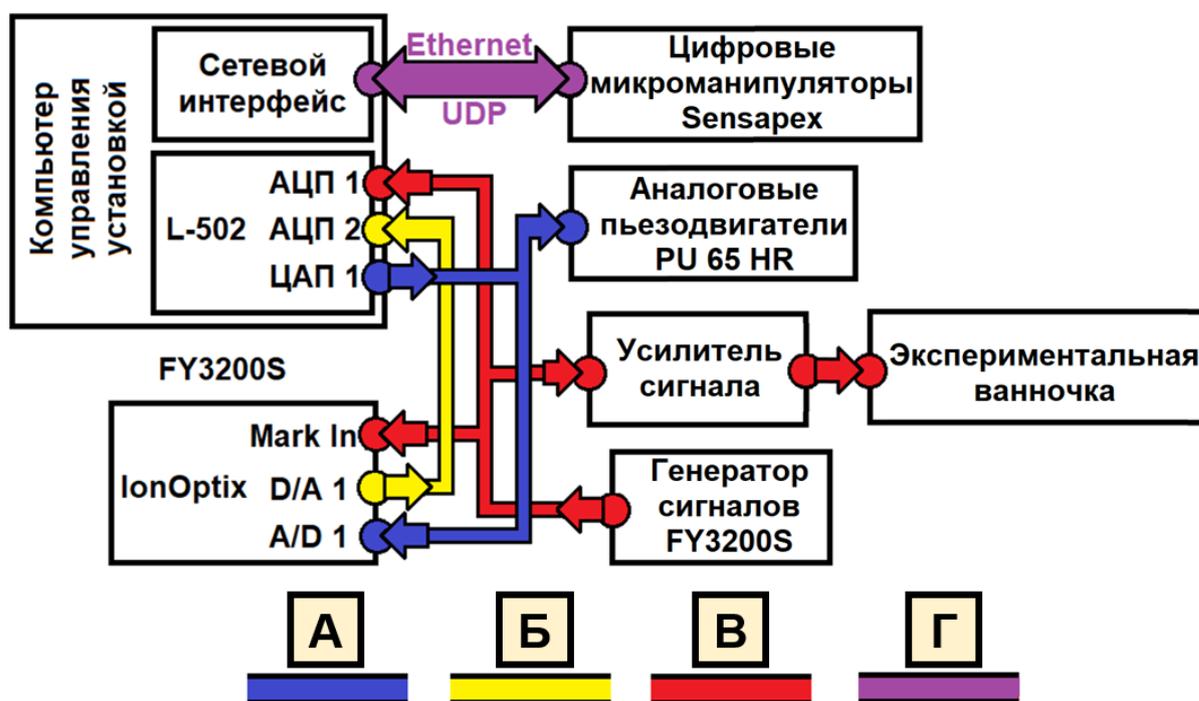


Рисунок 2.12 – Схема сигнальных цепей экспериментальной установки. А: Сигнал управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR. Б: Сигнал изменения во времени эффективной длины кардиомиоцита - деформации. В: Единицы ТТЛ. Г: Соединение Ethernet, протокол UDP

2.10 Выводы по главе 2

Разработанная в соответствии с техническим заданием экспериментальная установка обеспечивает:

- термостатирование суспензии с одиночными кардиомиоцитами на выбранной температуре в диапазоне значений 15-40 °С, допустимые колебания температуры ± 0.5 °С;
- обеспечивает надежный контакт кардиомиоцит-углеродное волокно-микроманипулятор, позволяющий изучать физические свойства одиночных кардиомиоцитов во всем физиологическом диапазоне длин саркомеров (1.8 – 2.2 мкм)
- стимуляцию суспензии с одиночными кардиомиоцитами электрическим импульсом с настраиваемыми параметрами: амплитуда 15-35 В, длительность 1-10 мс, частота 1-4 Гц, форма импульса – меандр;
- регистрацию деформации кардиомиоцита с частотой 250 Гц, с разрешением 0.294 мкм на пкс;
- возможность прецизионного перемещения четырех углеродных волокон в диапазоне 2 см по осям x, y, z , с разрешением движения 5 нм;
- возможность управления перемещением углеродного волокна с разрешением 0.13 нм в диапазоне 65 мкм генерированием аналогового сигнала произвольной формы.

Параметры разработанной экспериментальной установки позволяют регистрировать деформацию и развиваемое напряжение сокращающегося кардиомиоцита в физиологическом и патофизиологическом диапазонах.

Сравнение действующих экспериментальных установок, применяющих методику карбоновых волокон, представлено в таблице 2.2:

Таблица 2.2 – Сравнение действующих экспериментальных установок, применяющих методику карбоновых волокон

	Разработанная установка	Установка четырёх карбоновых волокон (Iribe, 2014 [35])	Установка двух карбоновых волокон (Peyronnet, 2017 [64])
Управление	Полностью автоматизировано	Частично автоматизировано	Частично автоматизировано
Диапазон длин саркомеров при растяжении кардиомиоцита, мкм	1.8-2.2	1.8-2.2	1.8-2.0
Округленное максимальное зарегистрированное напряжение, развиваемое кардиомиоцитом желудочка, единицы мН/мм ²	14	16	5
Реализация управления режимами сокращения	Изометрический, ауксотонический, изотонический	Изометрический, ауксотонический, изотонический	Изометрический, ауксотонический, изотонический
Модуль изучения вязкоупругих свойств	Есть	Нет	Нет
Минимальное разрешение движения пьезодвигателя	0.13 нм	0.2 нм	0.2 нм

По сравнению с действующими экспериментальными установками в разработанной экспериментальной установке реализована полная автоматизация перемещений карбоновых волокон в диапазоне экспериментальной ванночки, что позволяет ускорить процесс проведения протоколов исследования, что при ограниченном времени жизни суспензии увеличивает количество исследованных кардиомиоцитов за один экспериментальный день.

В дополнение к реализованным режимам управления – ауксотоническом, изометрическом, изотоническом, доступным во всех существующих экспериментальных установках, в разработанной экспериментальной установке доступен программный модуль изучения вязкоупругих свойств пассивных мышечных клеток сердца.

Разрешение движения пьезодвигателей наименьшее в разработанной экспериментальной установке, что позволяет наиболее точно реализовывать режимы сокращения кардиомиоцита по сравнению с действующими экспериментальными установками.

Разрешение системы оптического контроля, диапазон длин саркомеров при растяжении кардиомиоцита и округленное максимальное зарегистрированное напряжение, развиваемое кардиомиоцитом желудочка, примерно одинаковы для разработанной и существующих экспериментальных установок.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ УПРАВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ

3.1 Среда разработки LabVIEW

Для разработки программного обеспечения управления сетью цифровых микроманипуляторов Sensapex и аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR была выбрана среда программирования LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench – среда разработки лабораторных виртуальных приборов).

В LabVIEW используется графический язык программирования «G», основанный на архитектуре потоков данных.

Программы LabVIEW называются виртуальными приборами (ВП, virtual instruments – VI), так как они функционально и внешне подобны реальным (традиционным) приборам. Однако они столь же подобны программам и функциям на популярных языках программирования, таких как C или Basic [10].

Виртуальный прибор состоит из двух основных частей:

лицевая панель (front panel) – представляет собой интерактивный пользовательский интерфейс виртуального прибора и названа так потому, что имитирует лицевую панель традиционного прибора, представлена на рисунках 3.2, 3.7, 3.8, 3.9. На ней могут находиться ручки управления, кнопки, графические индикаторы и другие элементы управления (controls), которые являются средствами ввода данных со стороны пользователя, и элементы отображения (indicators) – выходные данные из программы [10];

блок-диаграмма (block diagram) – является исходным программным кодом ВП, созданным на языке графического программирования LabVIEW, G (Джи), представлена на рисунке 3.3. Блок-диаграмма представляет собой реально исполняемое приложение. Компонентами блок-диаграммы являются: виртуальные приборы более низкого уровня, встроенные функции LabVIEW, константы и структуры управления выполнением программы. Для того чтобы

задать поток данных между определенными объектами или, что-то же самое, создать связь между ними, вы должны нарисовать соответствующие проводники (wires). Объекты на лицевой панели представлены на блок-диаграмме в виде соответствующих терминалов (terminals), через которые данные могут поступать от пользователя в программу и обратно [10].

При добавлении элемента управления или отображения на лицевую панель, его терминал добавляется на блок-диаграмму автоматически. Таким образом интерфейс прибора и его программный код создаются одновременно.

3.2 Формирование технического задания на программное обеспечение

Программа управления системой цифрового микроманипулирования обеспечивает прецизионное перемещение в горизонтальной плоскости двух правых цифровых микроманипуляторов Sensapex (см. пункт 2.1), на которых установлены аналоговые одноосные пьезодвигатели PU 65 HR, на которых, в свою очередь, смонтированы длинные гибкие карбоновые волокна, образующие правый гибкий пинцет (см. пункт 2.1).

Задержка отправки IP-пакетов выходного сигнала управления цифровыми микроманипуляторами не должна превышать 1 мкс.

Также, программа управления системой цифрового микроманипулирования обеспечивает сохранение позиций в вертикальной плоскости и перемещение между ними всех четырех цифровых микроманипуляторов Sensapex.

Программа управления системой аналогового микроманипулирования обеспечивает прецизионное перемещение двух аналоговых одноосных пьезодвигателей PU 65 HR, установленных на двух правых цифровых микроманипуляторов Sensapex (см. выше, см. пункт 2.1).

Формирование выходного сигнала управления аналоговыми пьезодвигателями ЦАП с частотой дискретизации не менее 2500 Гц, амплитудой $\pm 5В$.

Ненагруженный режим

В ненагруженном режиме управление цифровой и аналоговой системой микроманипулирования не требуется. Используется ПО управления камерой (системой оптического контроля) IonWizard. Производится электрическая стимуляция частотой 1 Гц. Регистрируется один входной сигнал изменения длины саркомеров (рисунок 3.1.А).

Изучение длинозависимой регуляции сократимости – ауксотонический режим сокращения

Кардиомиоцит зафиксирован четырьмя карбоновыми волокнами. Производится электрическая стимуляция частотой 1 Гц.

Регистрируется первый входной сигнал изменения эффективной длины кардиомиоцита (изменение разности положений закрепленных на кардиомиоците карбоновых волокон – см. пункт 2.1, рисунок 3.1.Б).

Регистрируется второй входной сигнал изменения длины саркомеров (рисунок 3.1.А).

Используется ПО управления цифровыми микроманипуляторами Sensapex.

Выходной сигнал – последовательность шаговых движений, ступенчатая функция с регулируемой амплитудой и временем движения (рисунок 3.1.В, пункт 3.3.1).

Синхронизация входного и выходного сигнала производится относительно сигнала электрической стимуляции – выходной сигнал передается в диастолическую фазу.

Изучение грузозависимой регуляции сократимости при помощи цифровых микроманипуляторов Sensapex – изометрический режим

Фиксация кардиомиоцита и регистрация входных сигналов аналогичны пункту изучения длинозависимой регуляции сократимости (см. выше).

Производится электрическая стимуляция частотой 1 Гц.

Используется ПО управления цифровыми микроманипуляторами Sensapex.

Использован принцип обратной связи в псевдореальном времени «feed-forward» [37].

Синхронизация входного и выходного сигнала производится относительно сигнала электрической стимуляции.

На основе первого входного сигнала изменения эффективной длины кардиомиоцита (рисунок 3.1.Б) в ходе одного сокращения формируется выходной компенсирующий аппроксимирующий трапецеидальный сигнал (рисунок 3.1.Г, пункт 3.3.2).

Изучение грузозависимой регуляции сократимости при помощи аналоговых одноосных пьезодвигателей PU 65 HR – изометрический и изотонический режимы

Фиксация кардиомиоцита и регистрация входных сигналов аналогичны пункту изучения длинозависимой регуляции сократимости (см. выше).

Производится электрическая стимуляция частотой 1 Гц.

Используется ПО управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR.

Использован принцип обратной связи в псевдореальном времени «feed-forward» [37].

Синхронизация входного и выходного сигнала производится относительно сигнала электрической стимуляции.

Первый входной сигнал изменения эффективной длины кардиомиоцита (рисунок 3.1.Б) в ходе одного сокращения (SourceSignal) передается без изменения формы в качестве выходного сигнала управления аналоговыми одноосными пьезодвигателями PU 65 HR (CommandSignal).

В реальном времени изменяются параметры усиления сигнала и изменения фазы.

Для изометрического режима:

$$CommandSignal = -1 \cdot K_1 \cdot SourceSignal, \quad (3.1)$$

Где K_1 коэффициент усиления для достижения изометрического режима, устанавливается в ходе эксперимента в реальном времени экспериментатором.

Для изометрического режима:

$$CommandSignal = K_2 \cdot SourceSignal, \quad (3.2)$$

Где K_2 коэффициент усиления для достижения изотонического режима, устанавливается в ходе эксперимента в реальном времени экспериментатором (см. пункт 3.4.1, рисунок 4.7).

Изучение вязкоупругих свойств

Фиксация кардиомиоцита и регистрация входных сигналов аналогичны пункту изучения длинозависимой регуляции сократимости (см. выше).

Стимуляция электрическим полем отсутствует.

Используется ПО управления цифровыми микроманипуляторами Sensapex.

Выходной сигнал – пилообразный сигнал движения с регулируемой амплитудой и периодом движения (рисунок 3.1.Д) (пункт 3.3.3).

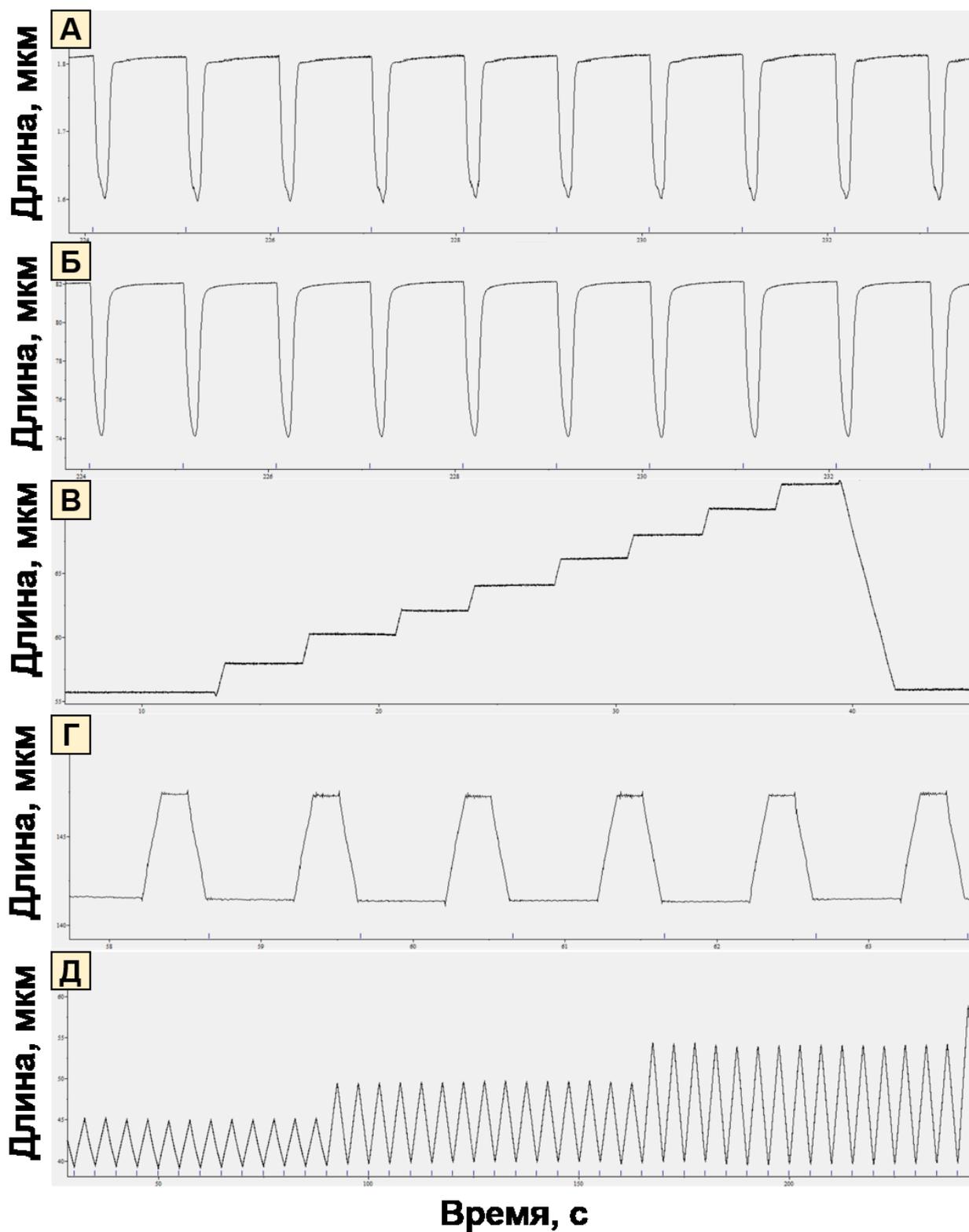


Рисунок 3.1 – Входные и выходные сигналы разработанной экспериментальной установки. Программа регистрации IonWizard. А Входной сигнал изменения длины саркомеров; Б: Входной изменения эффективной длины кардиомиоцита; В: Выходной сигнал шагового движения; Г: Выходной сигнал аппроксимирующего компенсирующего трапецеидального движения; Д: Выходной сигнал пилообразного движения

3.3 Программное обеспечение управления системой цифрового микроманипулирования

3.3.1 Модуль изучения зависимостей «длины-напряжения»

Разработанное программное обеспечение (ПО) способно создавать и разрывать соединение по локальной сети по протоколу UDP с системой цифрового микроманипулирования Sensarex. Данное ПО предоставляет возможность синхронного управления двумя выбранными цифровыми микроманипуляторами (для управления гибким пинцетом из карбоновых волокон) – одновременное перемещение на заданное расстояние в микрометрах за заданный промежуток времени экспериментатором, а также предоставляет возможность сохранить в памяти текущие вертикальные координаты четырех цифровых микроманипуляторов (для управления гибким и жестким пинцетами), автоматически поднимать четыре цифровых микроманипулятора в крайнее верхнее положение из области экспериментальной ванночки для замены раствора и суспензии клеток без риска повреждения закреплённых на микроманипуляторах карбоновых волокон и последующего перемещения микроманипуляторов на сохраненные вертикальные координаты.

Разработанное ПО предлагает экспериментатору проводить исследование либо в полностью ручном режиме с возможностью также вручную вернуть кардиомиоциту исходную длину после растяжения, либо в полностью автоматическом режиме, где от экспериментатора требуется заранее ввести желаемое количество шагов растяжения и их параметры и время ожидания между шагами (рисунок 3.2).

Программный код построен в виде цикла While со встроенной Event Structure (структурой событий).

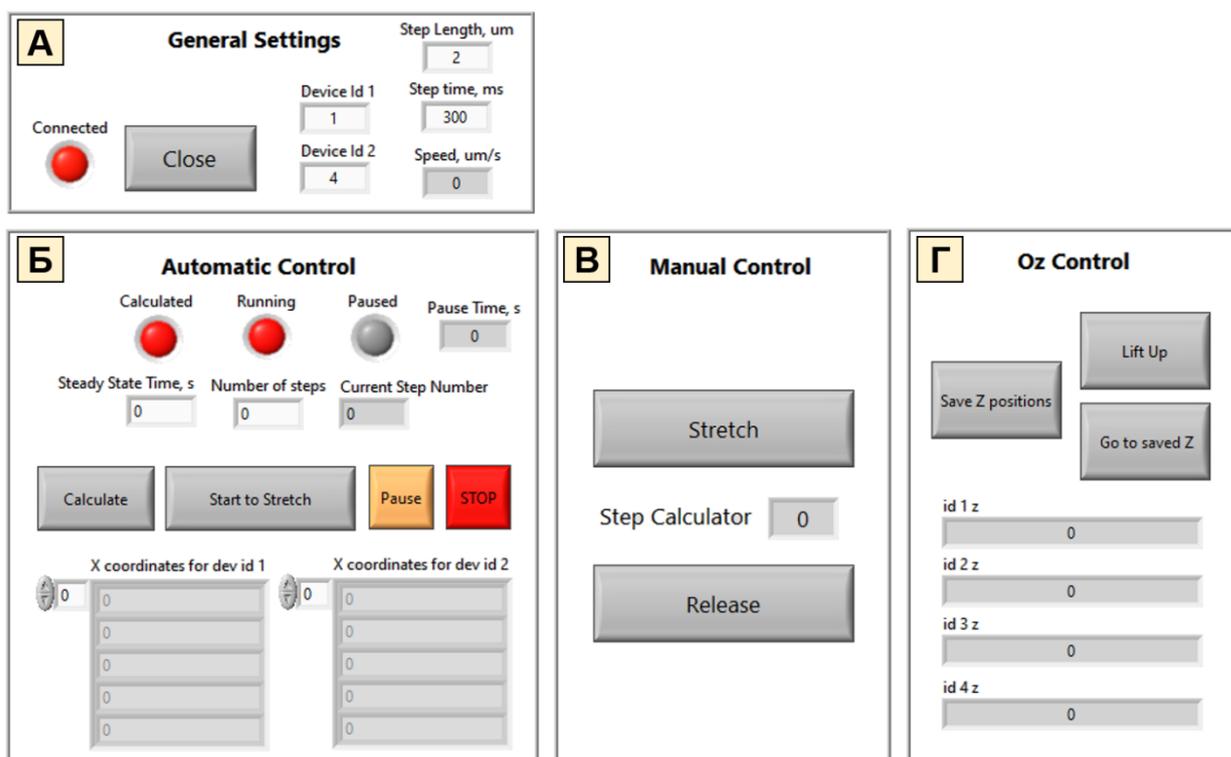


Рисунок 3.2 – Передняя панель разработанного ПО управления системой цифрового микроманипулирования Sensarex для изучения зависимостей «длины-напряжения». А:

Блок, ответственный за общие настройки экспериментальной установки; Б: Блок, предоставляющий возможность автоматического проведения протокола растяжения; В: Блок, обеспечивающий проведение протокола полностью в ручном режиме; Г: Блок, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси

1) Блок передней, лицевой панели виртуального прибора, ответственный за общие настройки экспериментальной установки (рисунок 3.2.А):

- предоставляет выбор порядковых номеров двух активных (осуществляющих растяжение-сжатие) манипуляторов;
- отображает наличие или отсутствие соединения с манипуляторами цветом виртуального светодиода;
- запрашивает базовые параметры шага растяжения – длину в мкм и время в мс;
- при помощи события тайм-аут (*Timeout*) рассчитывает скорость шага, заданного параметрами;

- останавливает выполнение программы и обрывает связь с манипуляторами при помощи события выключение программы (*Close*).

2) Блок лицевой панели виртуального прибора, предоставляющий возможность автоматического проведения протокола растяжения (рисунок 3.2.Б):

- использует параметры шага, введенные в блоке общих настроек;
- требует ввода таких параметров как количество шагов и время стационарного состояния - время между шагами;
- использует событие расчёт координат манипуляторов для автоматического протокола (*Calculate*) для предварительного расчета координат положений манипуляторов, что будут пройдены в ходе протокола. Данная задача является менее ресурсоемкой, чем одновременное проведение протокола и динамический расчёт положений манипуляторов в ходе протокола;
- использует событие автоматическое растяжение кардиомиоцита (*Start to Stretch*) для запуска автоматического протокола, в ходе которого будет произведено заданное количество шагов растяжения и последующий возврат на исходную длину клетки;
- в ходе проведения автоматического протокола возможно поставить выполнение протокола на паузу и снять с нее, также возможна принудительная остановка протокола с обязательным возвращением манипуляторов на исходные координаты;
- для визуального контроля и удобства экспериментатора блок отображает все рассчитанные координаты положений двух манипуляторов, текущий шаг автоматического протокола и текущее время паузы при приостановке автоматического протокола.

3) Блок лицевой панели виртуального прибора, обеспечивающий проведение протокола эксперимента полностью в ручном режиме (рисунок 3.2.В):

- использует параметры шага, введенные в блоке общих настроек;
- использует событие растяжение кардиомиоцита в ручном режиме (*Stretch*) для осуществления одного шага растяжения незамедлительно по нажатию соответствующей кнопки;
- использует событие сжатие кардиомиоцита в ручном режиме (*Release*) для завершения протокола и возвращения манипуляторов на исходные позиции начала протокола. Исходные позиции запоминаются автоматически при первом запуске события растяжения кардиомиоцита в ручном режиме (*Stretch*);
- для визуального контроля и удобства экспериментатора блок отображает количество совершенных шагов в текущем протоколе.

4) Блок лицевой панели виртуального прибора, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси (рисунок 3.2.Г):

- использует событие сохранение координат манипуляторов по вертикальной оси (*Save Z Positions*) для сохранения текущих вертикальных координат всех манипуляторов. Предполагается использование данное событие, когда манипуляторы перед началом эксперимента приведены в исходные позиции в экспериментальной ванночке;
- использует событие подъем манипуляторов по вертикальной оси (*Lift Up*) для подъема всех манипуляторов вертикально вверх из экспериментальной ванночки до 99% допустимой высоты;
- использует событие движение манипуляторов на сохраненные координаты по вертикальной оси (*Go to Saved Z*) для возвращения всех манипуляторов на сохраненные вертикальные координаты.

Подпрограмма реентерабельных функций перемещения

Подпрограмма реентерабельных функций перемещения обеспечивает синхронное перемещение двух выбранных манипуляторов на необходимые координаты посредством асинхронных вызовов реентерабельных версий функций библиотеки разработчиков манипуляторов *int32_t ump_goto_position_ext* (рисунок 3.3) [81].

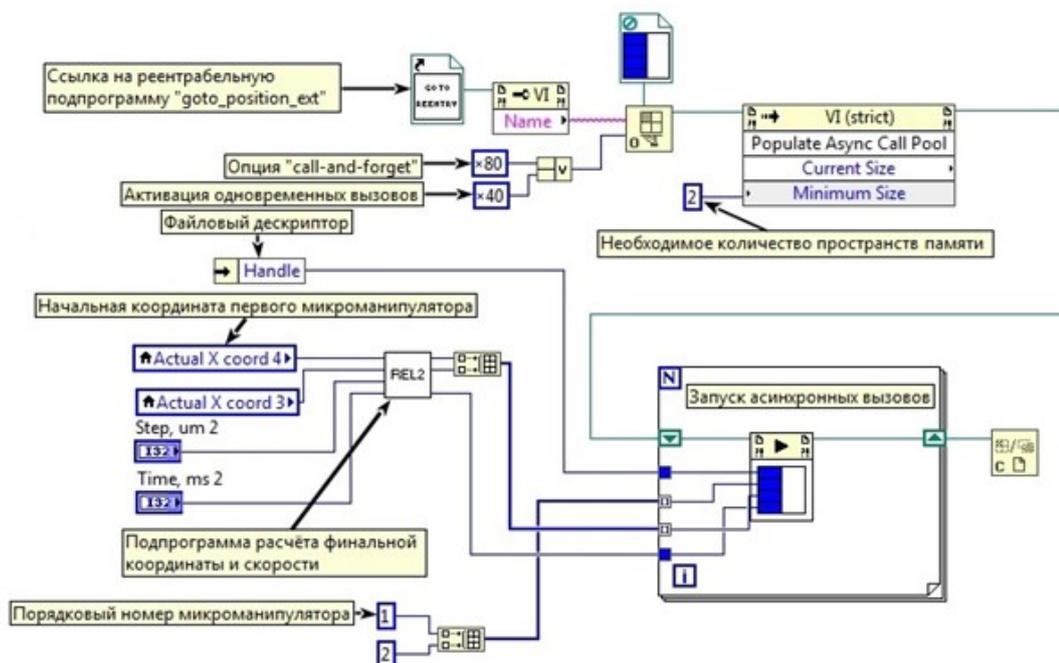


Рисунок 3.3 – Подпрограмма реентерабельных функций перемещения

- 0x40 – Опция включения одновременных вызовов. Включение данной опции позволяет провести параллельные вызовы подпрограммы, указанной по ссылке. Без указания данной опции, LabVIEW, несмотря на то, что подпрограмма реентерабельна, произведет последовательные вызовы.

- 0x80 – Опция *Call-and-Forget*, позволяет запустить подпрограмму, и не собирать выходные данные подпрограммы.

Программа-анализатор сетевого трафика Wireshark (The Wireshark team) распознает пакеты управления, сформированные данной подпрограммой, как отправленные одновременно: задержка между двумя управляющими пакетами на два микроманипулятора равна 0 мкс [81].

3.3.2 Модуль управления режимом сокращения кардиомиоцита

Функция библиотеки разработчиков манипуляторов `int32_t ump_goto_position_ext`, использованная в подпрограмме реинтерабельных функций перемещения, поддерживает только линейное перемещение – из точки с координатами (x_1, y_1, z_1) в точку с координатами (x_2, y_2, z_2) . В наборе средств разработки Sensarex не существует функции, поддерживающей нелинейное перемещение.

Было принято решение аппроксимировать усредненный сигнал изменения длины кардиомиоцита во время его сокращения (рисунок 3.4.А) синусоидой (рисунок 3.4.Б), а затем аппроксимировать полученную синусоиду равнобедренной трапецией (рисунок 3.4.В).

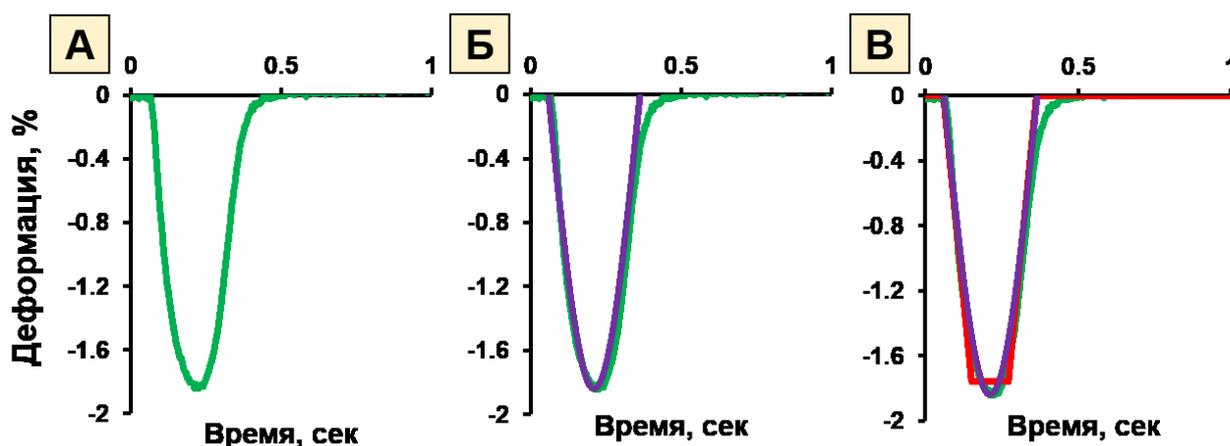


Рисунок 3.4 – Получение управляющего сигнала цифровых микроманипуляторов в виде равнобедренной трапеции. А: Усредненный из десяти сокращений график деформации кардиомиоцита при частоте стимуляции 1 Гц; Б: Аппроксимация сигнала нормированного сокращения синусоидой; В: аппроксимация синусоиды равнобедренной трапецией

Разработанное ПО опрашивает порт АЦП платы L-502, на который поступает аналоговый сигнал изменения длины сокращающегося кардиомиоцита, производимый системой оптического контроля IonOptix, и формирует массив усредненного сигнала сокращения.

В данном массиве программа находит время достижения минимальной длины клетки t_1 – время достижения максимума сокращения, с использованием необходимых операций сглаживания для избегания срабатывания поиска минимума на шумовые выбросы сигнала (рисунок 3.5.А).

Затем программа применяет операцию дифференцирования функции, заданной таблично, формулой центральных разностей, для нахождения момента начала сокращения t_2 , анализируя мгновенные скорости (рисунок 3.5.А).

Разность $t_2 - t_1$ есть $1/4$ периода аппроксимирующей синусоиды, где минимум синусоиды совпадает с минимумом длины кардиомиоцита.

Был выведен метод определения оптимальной аппроксимации трапецией синусоиды путем решения следующей математической задачи – нахождения параметра c , который в данном идеализированном случае определяет и высоту трапеции и продолжительность боковых сторон (рисунок 3.5.Б).

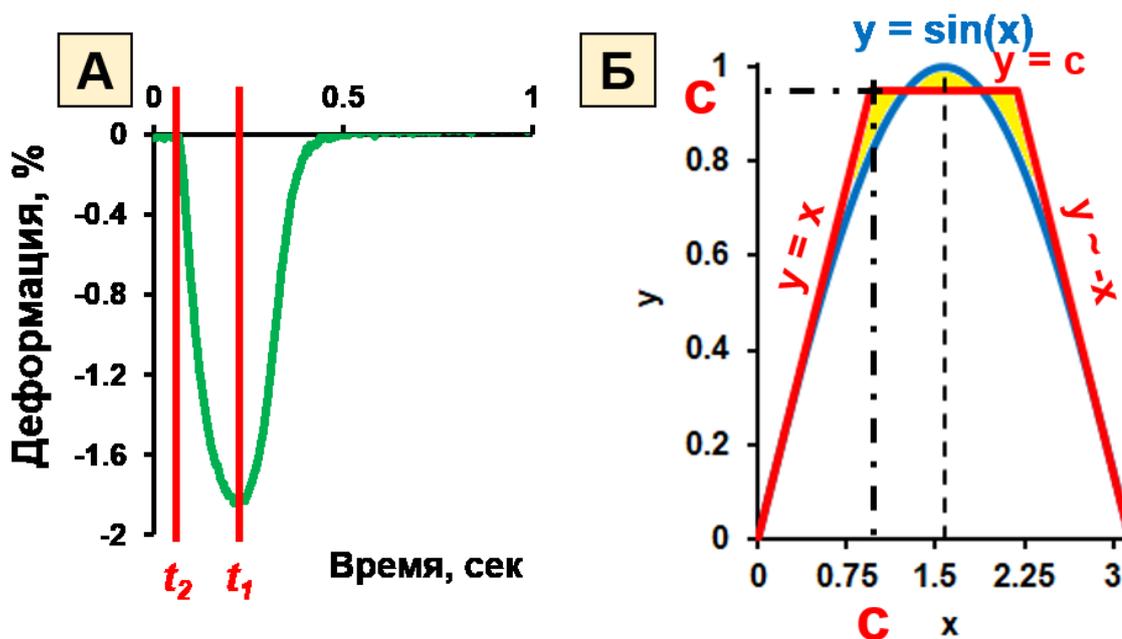


Рисунок 3.5. А: Нахождение одной четвертой периода аппроксимирующей синусоиды. Б: Постановка условия математической задачи

Трапеция оптимально аппроксимирует синусоиду тогда и только тогда, когда площадь, выделенная жёлтым цветом на рисунке 3.5.Б минимальна (достаточно рассмотреть одну симметричную половину фигуры, например, от 0 до $\pi/2$).

$$S = \left(\int_0^c x dx + \int_c^{\sin^{-1}c} c dx - \int_0^{\sin^{-1}c} \sin x dx \right) + \left(\int_{\sin^{-1}c}^{\pi/2} \sin x dx - \int_{\sin^{-1}c}^{\pi/2} c dx \right), (3.3)$$

Взяв производную данной площади и приравняв к нулю, находим значение параметра c :

$$c \approx 0.95261, (3.4)$$

Используя полученную константу программа способна аппроксимировать полученную ранее синусоиду трапецией. Результатом данной аппроксимации являются четыре параметра (рисунок 3.6):

- h или *amplitude of movement* – рекомендуемая амплитуда движения (высота трапеции);
- t_{w1} или *first waiting time* – время первого ожидания (время задержки начала сокращения кардиомиоцита после импульса стимуляции);
- t_m или *time of movement* – время движения манипуляторов;
- t_{w2} или *second waiting time* – время второго ожидания (время нахождения на верхнем основании трапеции).

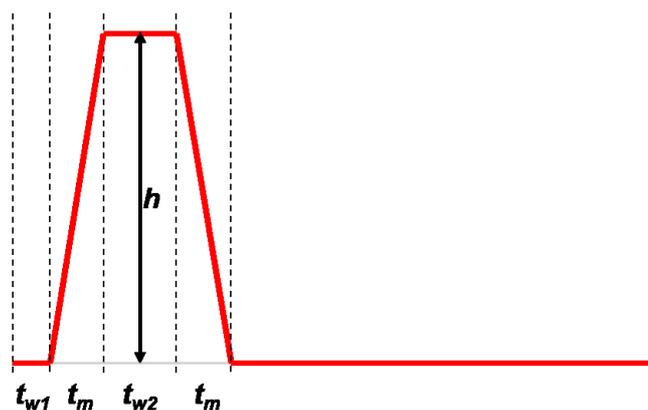


Рисунок 3.6 – Параметры трапецидальной аппроксимации

На рисунке 3.7 представлена передняя панель ПО, предоставляющего возможность управления изометрическим режимом сокращения кардиомиоцита при помощи системы цифрового микроманипулирования.

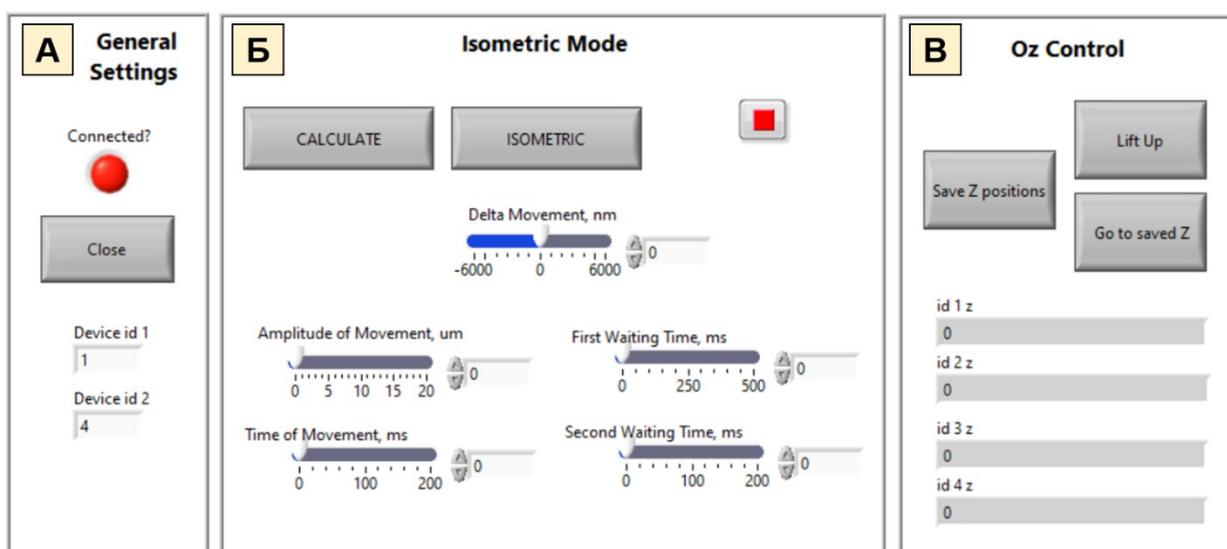


Рисунок 3.7 – Передняя панель разработанного ПО управления системой цифрового микроманипулирования Sensapex для управления режимом сокращения кардиомиоцита.

А: Блок, ответственный за общие настройки экспериментальной установки; Б: Блок, предоставляющий возможность расчёта и изменения в реальном времени параметров управляющего трапецидального сигнала; В: Блок, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси

Блок передней, лицевой панели виртуального прибора, ответственный за общие настройки экспериментальной установки (рисунок 3.7.А) аналогичен разработанному ранее (пункт 3.3.1 рисунок 3.2.А).

Блок лицевой панели виртуального прибора, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси (рисунок 3.6.В) аналогичен разработанному ранее (пункт 3.3.1 рисунок 3.2.Г).

Блок лицевой панели виртуального прибора, предоставляющий возможность расчёта и изменения в реальном времени параметров управляющего трапецеидального сигнала (рисунок 3.7.Б):

- использует событие расчёта параметров трапецеидальной аппроксимации (*Calculate*) для обращения к порту АЦП платы L-502 для получения аналогового сигнала изменения длины сокращающегося кардиомиоцита и последующей трапецеидальной аппроксимации сигнала с расчётом параметров h или *amplitude of movement*, t_{w1} или *first waiting time*, t_m или *time of movement*, t_{w2} или *second waiting time*;
- использует событие изометрического режима сокращения кардиомиоцита (“*Isometric*”) для обращения к порту АЦП платы L-502 для синхронизации с поступающим сигналом стимуляции и подачи относительно времени его поступления команд трапецеидального движения на цифровые микроманипуляторы по параметрам, рассчитанным ранее. Команды пересчитываются при каждом считывании сигнала стимулятора, поэтому экспериментатор имеет возможность в ходе эксперимента вручную варьировать все параметры *amplitude of movement*, *first waiting time*, *time of movement*, *second waiting time* относительно значений, предложенных программой, а также параметр *delta movement*, представляющий собой добавочное слагаемое к параметру *amplitude of movement*, для возможности задания амплитуды движения микроманипуляторов с максимально возможным разрешением движения 5 нм.

3.3.3 Модуль изучения вязкоупругих свойств

На рисунке 3.8 представлена передняя панель ПО, предоставляющего возможность проведения биофизических экспериментов, направленных на изучение вязкоупругих свойств кардиомиоцитов.

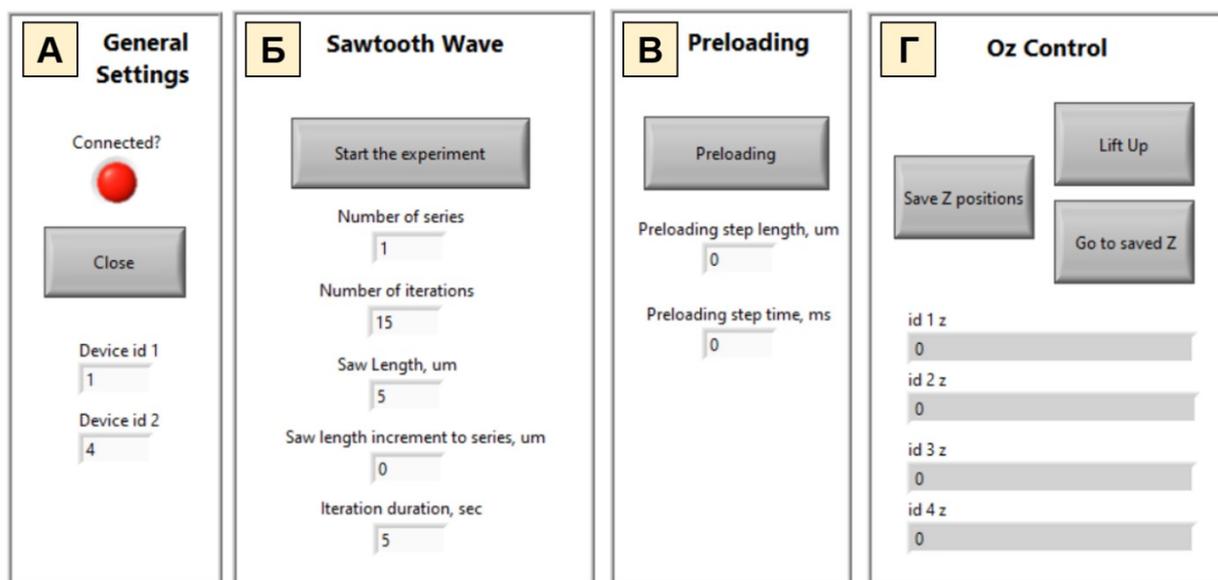


Рисунок 3.8 – Передняя панель разработанного ПО управления системой цифрового микроманипулирования Sensapex для изучения вязкоупругих свойств кардиомиоцитов. А:

Блок, ответственный за общие настройки экспериментальной установки; Б: Блок, предоставляющий настройку параметров управляющего пилообразного сигнала; В: Блок, предоставляющий возможность управлять длиной кардиомиоцита; Г: Блок, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси

Блок передней, лицевой панели виртуального прибора, ответственный за общие настройки экспериментальной установки (рисунок 3.8.А) аналогичен разработанному ранее (пункт 3.3.1 рисунок 3.2.А).

Блок лицевой панели виртуального прибора, автоматизирующий управление движением четырех манипуляторов по вертикальной оси (рисунок 3.7.Г) аналогичен разработанному ранее (пункт 3.3.1 рисунок 3.2.Г).

Блок лицевой панели виртуального прибора, предоставляющий возможность управлять длиной кардиомиоцита (рисунок 3.8.В), позволяет

экспериментатору растягивать клетку до нужной начальной длины между запусками серий пилообразного сигнала. Аналогичен разработанному ранее блоку (пункт 3.3.1 рисунок 3.2.В).

Блок лицевой панели виртуального прибора, предоставляющий настройку параметров управляющего пилообразного сигнала (рисунок 3.8.Б), содержит следующие настраиваемые параметры:

- *number of series* – количество серий пилообразного сигнала;
- *number of iterations* – количество периодов пилообразного сигнала в одной серии;
- *saw length* – амплитуда пилообразного сигнала первой серии в мкМ;
- *saw length increment to series* – увеличение амплитуды пилообразного сигнала между сериями в мкМ;
- *iteration duration* – период пилообразного сигнала в секундах.

При проведении экспериментов на стимулируемом препарате генератор сигналов производит логические маркеры, единицы TTL, регистрируемые ПО IonWizard, для точного определения начала сокращения.

Однако, в связи с тем, что исследование вязкоупругих свойств кардиомиоцитов производится на покоящемся препарате в отсутствии электрической стимуляции, в начале каждого периода пилообразного сигнала непосредственно данный разработанный программный комплекс формирует и отправляет единицу TTL на порт ввода блока Data System Interface DSI 300 для последующей возможности автоматического усреднения ответа пилообразного сигнала по поступившим логическим маркерам.

3.4 Программное обеспечение управления системой аналогового микроманипулирования

3.4.1 Модуль управления режимом сокращения кардиомиоцита

Микроманипуляторы Sensapex поддерживают исключительно линейное перемещение и не способны полностью воспроизвести сложный профиль сокращения кардиомиоцита. В свою очередь, пьезодвигатели PU 65 HR способны воспроизводить любое движение с разрешением движения 0.13 нм, заданное формой аналогового управляющего сигнала в диапазоне до частоты резонанса пьезокристалла, что требует разработки нового программного комплекса.

ПО управления системой аналоговых одноосных пьезодвигателей для управления режимом сокращения кардиомиоцита основано на методике записи и воспроизведения входного сигнала изменения эффективной длины кардиомиоцита (деформации кардиомиоцита), сокращающегося в ауксотоническом режиме, представленной в пункте 1.2.

На рисунке 3.9 представлена передняя панель ПО, предоставляющего возможность проведения биофизических экспериментов, направленных на изучение влияния изменения режима сокращения кардиомиоцита.

Разработанное ПО управления системой аналоговых одноосных пьезодвигателей PU 65 HR полностью основывается на взаимодействии с платой АЦП/ЦАП L-502.

Программный код построен в виде цикла While со встроенной Case Structure (структурой выбора).

Настройка многофункциональной платы АЦП/ЦАП L-502 (рисунок 3.9.А) производится перед входом в цикл While при помощи блока лицевой панели виртуального прибора:

- Включается первый логический (четвертый физический) канал АЦП в дифференциальном режиме с диапазоном ± 10 В, который подключен к

электрической цепи стимулятора для обнаружения подаваемых импульсов в виде единицы ТТЛ;

- Включается второй логический (девятый физический) канал АЦП в дифференциальном режиме с диапазоном ± 10 В, который подключен к порту D/A1 блока Data System Interface DSI 300 для записи передаваемого аналогового сигнала изменения длины сокращающегося кардиомиоцита;
- Включается первый канал ЦАП для передачи аналогового сигнала управления одноосными пьезодвигателями PU 65 HR во входящий порт блока NV 40/3 и в порт A/D1 блока Data System Interface DSI 300 для одновременной записи данного сигнала с экспериментальными данными;
- Устанавливается общая частота сбора равной 5000 Гц, частота сбора на канал – 2500 Гц, частота вывода – 2500 Гц.

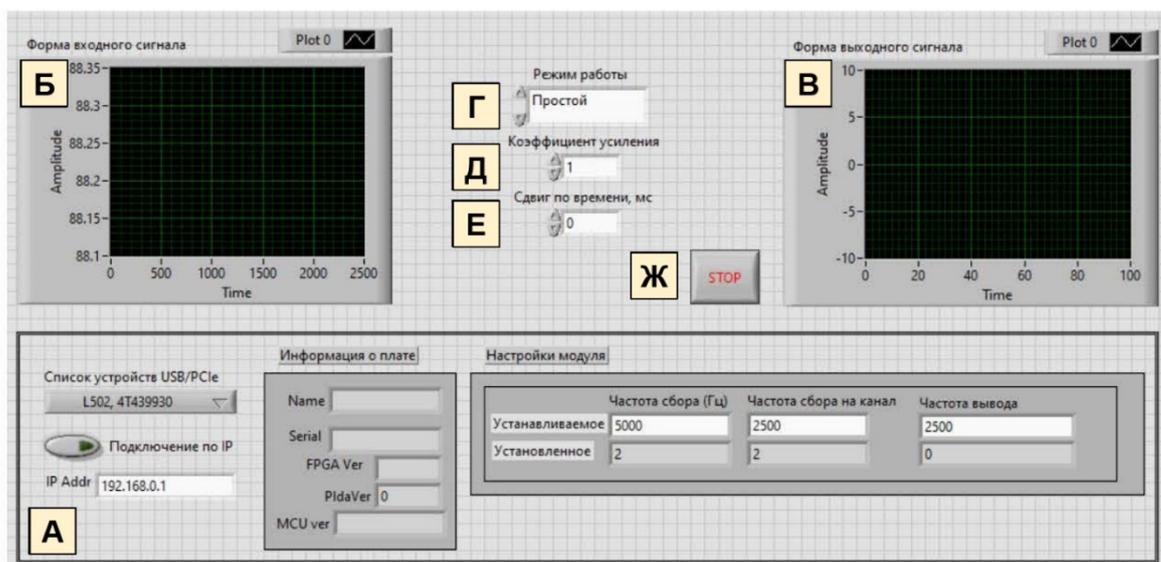


Рисунок 3.9 – Передняя панель разработанного ПО управления системой аналоговых одноосных пьезодвигателей для управления режимом сокращения кардиомиоцита. А: Блок управления многофункциональной платой АЦП/ЦАП L-502. Б: Виртуальный осциллограф, демонстрирующий входной аналоговый сигнал. В: Виртуальный осциллограф, демонстрирующий выходной аналоговый сигнал. Г: Поле выбора режима работы установки – «Простой», «Запись», «Изометрический режим», «Изотонический режим». Д: Поле выбора коэффициента усиления выходного аналогового сигнала. Е: Поле выбора сдвига выходного аналогового сигнала по времени. Ж: Кнопка остановки работы экспериментальной установки

Далее программа переходит к выполнению цикла While в котором непрерывно анализирует буфер АЦП в поисках единицы TTL, означающей поступление стимулирующего импульса в экспериментальную ванночку. В момент обнаружения импульса дальнейшее действие программы определяет Case Structure, варианты которой прописаны в поле выбора режима работы установки, расположенной на лицевой панели виртуального прибора - «Простой», «Запись», «Изометрический режим», «Изотонический режим» (рисунок 3.9.Г).

- режим «Простой» заставит программу пропустить полученный импульс и ожидать следующего;
- режим «Запись» заставит программу записать следующие десять секунд, сохранить усредненный сигнал сокращения кардиомиоцита и вывести его на виртуальный осциллограф (рисунок 3.8.Б);
- режим «Изометрический режим» заставит программу инвертировать сохраненный ранее усредненный сигнал сокращения кардиомиоцита, обработать данный сигнал фильтром скользящего среднего для недопущения появления частот в выходном сигнале близких к резонансной частоте пьезодвигателей PU 65 HR равной 1320 Гц, применить к выходному сигналу значения, введенные в поля передней, лицевой панели виртуального прибора, выбора коэффициента усиления выходного аналогового сигнала (рисунок 3.8.Д), выбора сдвига выходного аналогового сигнала по времени (рисунок 3.8.Е), вывести получившийся сигнал на первый канал ЦАП и на виртуальный осциллограф (рисунок 3.8.В). Так как генерирование выходного сигнала происходит каждый раз при получении единицы TTL, экспериментатор может варьировать значения коэффициента усиления и временного сдвига непосредственно в ходе эксперимента, от сокращения к сокращению;
- режим «Изотонический режим» идентичен режиму «Изометрический режим» за исключением отсутствия инвертирования выходного сигнала.

3.5 Выводы по главе 3

Разработанные программные комплексы управления системой цифрового микроманипулирования и аналоговых пьезодвигателей предлагают экспериментатору широкий спектр настроек приложения механического нагружения к кардиомиоциту, включающий в себя: шаговое растяжение для исследования зависимостей «длины-напряжения» и динамическое пилообразное растяжение препарата для регистрации вязкоупругого гистерезиса кардиомиоцита, позволяющего оценить пассивные физические свойства клетки. Также программный комплекс предоставляет возможность управления режимом сокращения кардиомиоцита: ауксотоническим, изометрическим, изотоническим, и проводить анализ получаемых результатов.

Дополнительные модули автоматизированного перемещения микроманипуляторов, функции запоминания позиций, а также возможность тонкой настройки всех необходимых параметров движения микроманипуляторов непосредственно в ходе эксперимента в ручном режиме значительно облегчают и ускоряют проведение экспериментальных протоколов, что позволяет получить больше данных за один экспериментальный день.

Анализ подпрограммы реентерабельных функций перемещения, лежащей в основе программных комплексов управления цифровыми микроманипуляторами, программой-сниффером Wireshark показал, что пакеты управления, сформированные данной подпрограммой, отправляются одновременно и синхронно: задержка между двумя управляющими пакетами на два микроманипулятора равна 0 мкс.

Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2021610500 Российская Федерация. Программа управления цифровыми манипуляторами для задания последовательного растяжения биологической ткани или одиночной клетки.

ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ И РЕЗУЛЬТАТЫ БИОФИЗИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

4.1 Описание биологического объекта и экспериментальных протоколов

Перед проведением биофизических экспериментов на разработанной экспериментальной установке было необходимо:

- разработать экспериментальные протоколы для исследования активных сократительных и пассивных вязкоупругих свойств кардиомиоцитов (пункт 4.1.4);
- апробировать разработанную экспериментальную установку путем проведения тестовых экспериментов (пункт 4.2);

Были проведены следующие серии биофизических экспериментов:

- исследование региональных особенностей активных сократительных свойств кардиомиоцитов в норме и при экспериментальном СД1 (пункт 4.3):
 - исследование влияния режима сокращения кардиомиоцита: сравнение влияния ненагруженного и ауксотонического режима сокращения; сравнение влияния ауксотонического и изометрического режима сокращения (пункт 4.3.1);
 - исследование влияния конечно-диастолической длины препарата (пункт 4.3.2);
- исследование региональных особенностей активных сократительных свойств кардиомиоцитов в норме и при экспериментальном СД1 (пункт 4.4):

Экспериментальная модель СД1 рассматривается с одной стороны, как тестовая задача для расширения диапазона измеряемых величин в патологическую область, с другой стороны решается актуальная биофизическая задача, приобретаются новые данные о характеристиках

сократительной функции кардиомиоцита при таком социально-значимом заболевании, как СД1.

4.1.1 Постановка экспериментальной модели СД1

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с принципами Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и одобрены Этическим комитетом ИИФ УрО РАН. Использовались крысы-самцы линии Wistar в возрасте 12 недель массой 300-350 г. Животные содержались в равных условиях (12 часов света/12 часов темноты), по 5-6 крыс в клетке. Крысы получали стандартный корм (комбикорм для лабораторных мышей и крыс Дельта Фидс, ЛБК 120 С-19 (БиоПро)) со свободным доступом к корму и воде.

Аллоксановый диабет моделировали путем трехкратного внутрибрюшинного введения в течение недели раствора аллоксана (Sigma-Aldrich, США) в воде для инъекций из расчета 100 мг/кг массы крысы, общая доза составила 300 мг/кг [3]. Инъекции аллоксана проводили после 12-часового голодания под эфирным наркозом. Животных группы при экспериментальном СД1 выводили из эксперимента через 6 недель после первой инъекции аллоксана.

4.1.2 Изоляция кардиомиоцитов

Одиночные кардиомиоциты из свободной стенки ЛЖ, МЖП и свободной стенки ПЖ сердца самцов крыс линии Вистар в возрасте 18-19 недель (рисунок 4.1) были получены методом ретроградной перфузии сердца крысы по Лангендорфу с авторскими модификациями [23, 57].

Непосредственно после эвтаназии сердце подвергалось быстрой канньюляции через аорту и промывалось содержащим гепарин (10000 ед/кг) буфером Кребса-Хенселейта (см. таблицу 4.1, раствор первичной перфузии) для установления нормальной циркуляции через коронарные сосуды. После 10 минут перфузия переключалась на низкокальциевый буфер Кребса-Хэнселейта с высокой концентрацией ионов K^+ (см. таблицу 4.1, раствор для

остановки сердца). Перфузия номинально бескальциевым раствором продолжалась в течение 10 минут после полного ингибирования сокращений, что приводило к ослаблению межклеточных контактов между интеркалярными дисками. Далее сердце подвергалось ферментативному перевариванию (14 – 16 мин) посредством перфузии раствором, содержащим коллагеназу и протеазу (см. таблицу 4.1, раствор для расщепления внеклеточного каркаса). Скорость перфузии поддерживалась 4 мл/мин при температуре 35.5 °C при постоянном насыщении смесью 95 % O₂ + 5 % CO₂.

Далее сердце удалялось с установки перфузии по Лангендорфу и разделялось на отдельные камеры (предсердия, ЛЖ и ПЖ). Ткань аккуратно подвергалась механическому измельчению, после чего содержащий миоциты супернатант фильтровался и ре-суспендировался с низкокальциевым буфером Кребса-Хэнселейта (свободным от ферментов и EGTA (с pH 7.25)) с добавлением бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, United States) для ингибирования активности фермента и осаждался при комнатной температуре без использования центрифуги. Далее процесс седиментации повторялся несколько раз с последовательным увеличением Ca²⁺ концентрации в растворе до физиологических значений (1.8 mM CaCl₂).

Готовая суспензия изолированных миоцитов хранилась в HEPES-содержащем буфере Тирод (см. таблицу 4.1, раствор для хранения и работы с кардиомиоцитами) при 22–24 °C и использовалась в течение 6-8 часов.

Таблица 4.1 – Составы растворов

Вещество	Раствор первичной перфузии	Раствор для остановки сердца	Раствор для расщепления внеклеточного каркаса	Раствор для хранения
NaCl, mM	121	105	105	140
KCl, mM	14.7	14.7	14.7	5.4
MgSO ₄ , mM	5.0	5.0	5.0	1.0
KH ₂ PO ₄ , mM	1.2	1.2	1.2	
NaHCO ₃ , mM	10	10	10	
HEPES, mM	10	10	10	10
Таурин, mM	20	20	20	
Аденозин, mM	2.0	2.0	2.0	
D-глюкоза, mM	11.1	11.1	11.1	11.1
CaCl ₂ , mM	1.0	0.05	0.025	1.8
EGTA, mM		0.15		
Коллагеназа, мг/мл			0.6	
Протеаза XIV, мг/мл			0.06	
pH	7.25 с NaOH на 35 ⁰ C	7.25 с NaOH на 35 ⁰ C	7.25 с NaOH на 35 ⁰ C	7.4 с NaOH на 37 ⁰ C
Аэрация 95 % O ₂ + 5 % CO ₂				

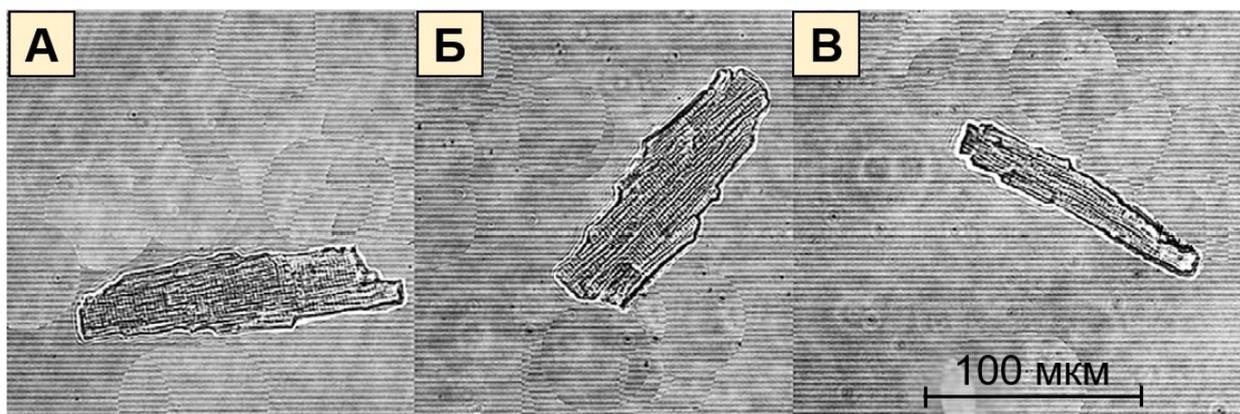


Рисунок 4.1 – Репрезентативные изображения одиночных кардиомиоцитов. А: Кардиомиоцит из свободной стенки ЛЖ. Б: Кардиомиоцит из МжП. В: Кардиомиоцит из свободной стенки ПЖ. Адаптирован из [23]

4.1.3 Статистические методы

Статистический анализ полученных данных производился при помощи RStudio (Posit Software PBC, США).

Полученные значения величин представлены как медиана \pm межквартильный интервал. В связи с малым значением n ($n \approx 6$) было принято решение использовать непараметрические методы дисперсионного анализа. В зависимости от количества факторов применялся: однофакторный дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса, двухфакторный дисперсионный анализ Шейрера – Рэя – Хейра.

Применялись критерий Данна для множественных сравнений между группами с поправкой Холма – Бонферрони; критерий Вилкоксона для парных сравнений.

Достоверными считались различия при значениях $p < 0.05$.

4.1.4 Разработка экспериментальных протоколов для исследования характеристик механической функции кардиомиоцитов

Подробно эксплуатация экспериментальной установки и программного обеспечения описана в пунктах пункты 2.1, 3.2 (см. выше).

При помощи литературных данных и эмпирических опытов были подобраны параметры биофизических экспериментов для: исследования

зависимостей «длины-напряжения»; исследования влияния изменения режима сокращения; исследования вязкоупругих свойств.

Универсально для всех протоколов исследования разработана процедура прекондиционирования препарата: после фиксации четырьмя карбоновыми волокнами кардиомиоцит подвергается стимуляции электрическим полем частотой в 1 Гц в течении 120 – 180 с. Было показано, что данная процедура уменьшает вероятность соскальзывания карбоновых волокон с мембраны кардиомиоцита при дальнейшем растяжении его карбоновыми волокнами [37].

Протокол исследования зависимостей «длины-напряжения»

Для изучения зависимостей «длины-напряжения», по истечении процедуры прекондиционирования препарата, кардиомиоцит последовательно растягивался каждые 30-40 сократительных циклов (или по достижении стационара) синхронными шагами двух цифровых микроманипуляторов, управляющих пинцетом из гибких карбоновых волокон, на 2 мкм со скоростью 6 мкм/с для формирования серии ауксотонических укорочений кардиомиоцита на различных конечно-диастолических длинах клетки (рисунок 4.2.А). Одновременная регистрация длин саркомеров и длины клетки дает возможность контролировать качество фиксации карбоновых волокон к клетке. В ходе данного протокола анализируются амплитуда сокращения, время достижения максимума сокращения и время расслабления саркомеров и клетки, амплитуда развиваемого напряжения, формируются зависимости «длины-напряжения» (рисунок 4.2.Б) (см. пункты 2.1, 3.2).

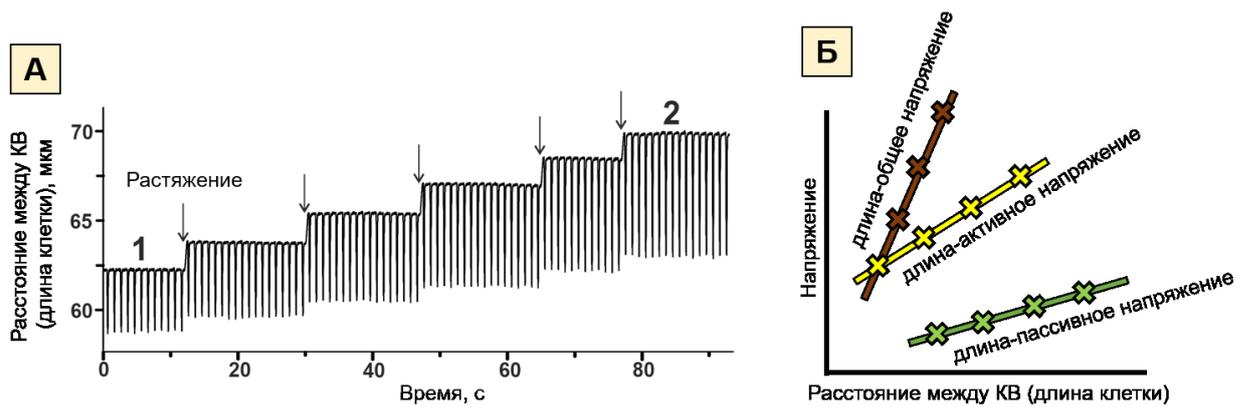


Рисунок 4.2. А: Репрезентативный протокол исследования зависимостей «длины-напряжения». Б: Зависимость пассивного напряжения от эффективной длины клетки (длина-пассивное напряжение), общего напряжения от длины (длина-общее напряжение), активного напряжения от длины (длина-активное напряжение)

Протокол исследования влияния режима сокращения кардиомиоцита

Для сравнения влияния ненагруженного и ауксотонического режима сокращения на характеристики деформации кардиомиоцита необходимо записать сигнал сокращения саркомеров кардиомиоцита в ненагруженном состоянии, затем зафиксировать кардиомиоцит четырьмя карбоновыми волокнами, по истечении процедуры прекондиционирования препарата ещё раз записать сигнал сокращения саркомеров.

Далее, для сравнения влияния режима сокращения на характеристики деформации и развиваемого напряжения кардиомиоцитом с ауксотонического на изометрический и изотонический использовать разработанный программный комплекс управления одноосными пьезодвигателями следующим образом: записать входной сигнал сокращения кардиомиоцита в ауксотоническом режиме, включить управление в изометрическом режиме, и, вручную настраивая программные параметры добиться визуального отсутствия изменения длины кардиомиоцита при активном сокращении. Это будет означать, что достигнут изометрический режим сокращения кардиомиоцита (рисунок 4.3.А). Основной исследуемый параметр – развиваемое напряжение. Далее, необходимо переключить программу в режим управления изотоническим режимом сокращения, и, также вручную

настраивая программные параметры, добиться совпадения амплитуды сокращения кардиомиоцита и амплитуды движения микроманипуляторов. Это будет означать, что достигнут изотонический режим с поддержанием нулевой силы – имитация ненагруженного режима (рисунок 4.3.Б). В данном случае, основной исследуемый параметр – временные характеристики сокращения (см. пункты 2.1, 3.2).

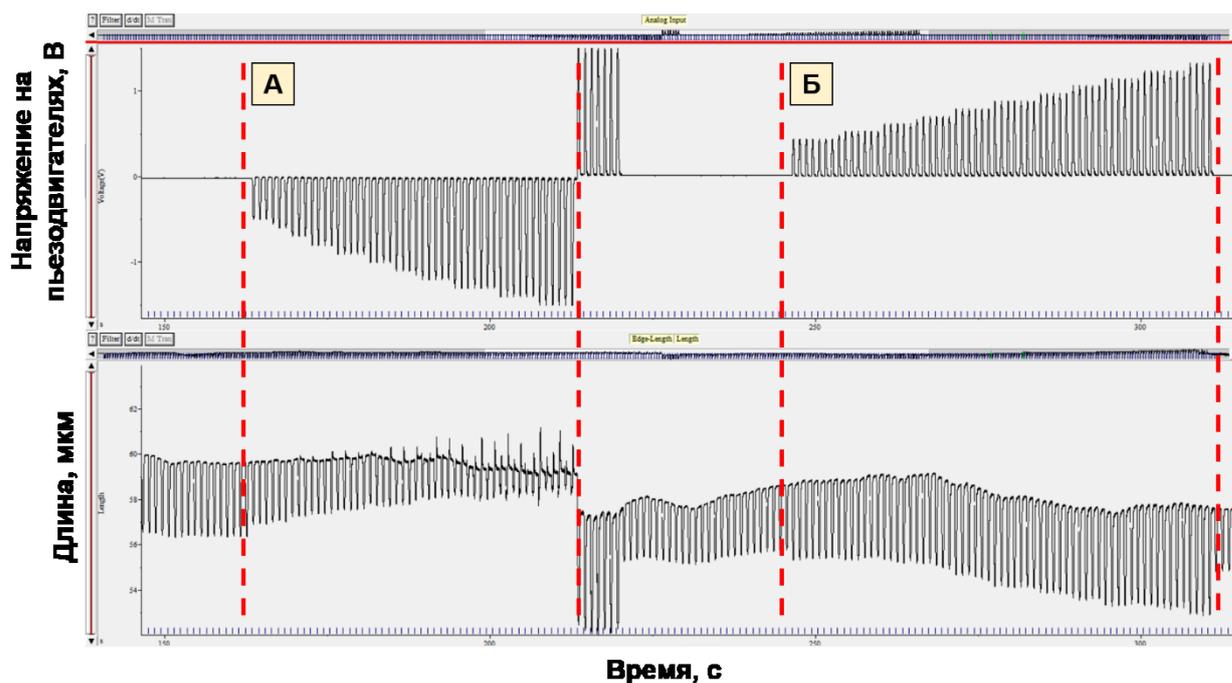


Рисунок 4.3 – сигналы, зарегистрированные ПО IonWizard, сверху: электрическое напряжение, подаваемое на аналоговые одноосные пьезодвигатели PU 65 HR, прямо пропорционально перемещению пьезодвигателей, снизу: сигнал деформации кардиомиоцита. А: управление изометрическим режимом. Б: Управление изотоническим режимом

Протокол исследования вязкоупругих свойств

Основываясь на предыдущих протоколах изучения вязкоупругих свойств, проведенных на папиллярной мышце [73], клетка предварительно растягивалась на 5 мкм (3-5% от исходной длины клетки в состоянии покоя) и применялись последовательные циклы растяжения-сжатия амплитудой 5 мкм при частоте 0.2 Гц в течение 1 мин (Рисунок 4.4.А).

Для изучения развития пассивного напряжения при различной конечно-диастолической длине клетки между последовательными циклами пилообразного сигнала кардиомиоцит растягивался на 5 мкм за 300-400 мс (Рисунок 4.4.А).

Ответный сигнал развиваемого пассивного напряжения препарата отличается от подаваемого пилообразного, входного, по амплитуде и фазе, и на формирует вязкоупругий гистерезис в координатах «длина-напряжение» (Рисунок 4.4.Б).

В ходе данного протокола анализируется площадь петли гистерезиса как разность определенных интегралов двух функций третьего порядка, аппроксимирующих петлю гистерезиса (формула 1.1) (см. пункты 2.1, 3.2).

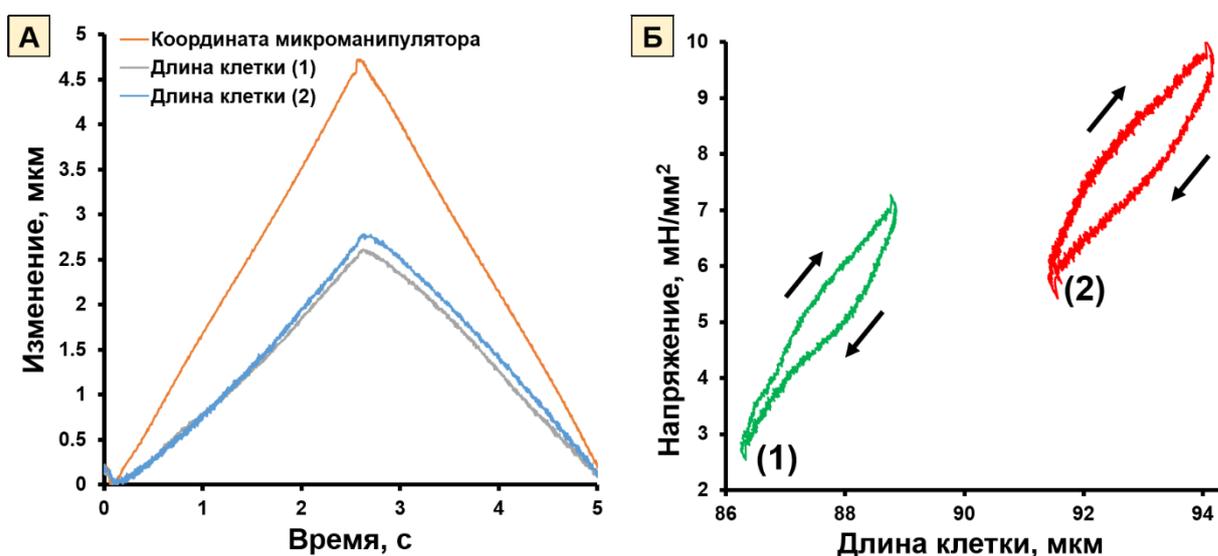


Рисунок 4.4. А: Репрезентативный пилообразный сигнал движения микроманипуляторов и репрезентативные ответные сигналы кардиомиоцита при разных конечно-диастолических длинах. Б: Репрезентативные петли вязкоупругого гистерезиса при разных конечно-диастолических длинах

4.2 Тестовые эксперименты

4.2.1 Апробация разработанного программного комплекса управления системой цифровых микроманипуляторов

Апробация протокола шагового движения

Для оценки погрешности движения цифровых микроманипуляторов Sensapex без использования биологического препарата был задан протокол движения: два цифровых микроманипулятора одновременно совершают десять последовательных шагов, длина шага каждого микроманипулятора составляет 2,5 мкм, время шагового движения 300 мс. Тестирование показало, что движение микроманипулятора было параллельным, периодическое считывание координат было стабильным, разница координат находилась в диапазоне ± 100 нм, что допустимо для биомеханических экспериментов (рисунок 4.5.Б), и что, в свою очередь, меньше разрешения системы оптического контроля – 294 нм на пиксель.

Для растяжения кардиомиоцита до длины саркомеров 2.16 мкм потребовалось 17 шагов по 2 мкм. Развиваемое клеткой напряжение составило 13.74 мН/мм².

Апробация протокола изменения режима сокращения

Для апробации управления режимом сокращения кардиомиоцита (переключения с ауксотонического на изометрический) был проведен пробный биофизический эксперимент на кардиомиоцитах из контрольной группы. На рисунке 4.6 показаны репрезентативные усредненные сигналы деформации кардиомиоцита и развиваемого клеткой напряжения в ауксотоническом и изометрическом режимах сокращения.

Для достижения изометрического режима сокращения амплитуда компенсирующего движения микроманипуляторов была в два раза выше (~ 4 мкм), чем амплитуда изменения длины клетки в ауксотоническом режиме сокращения. Максимальное развитое напряжение клеткой в ауксотоническом режиме составило 0.86 мН/мм² и 2.22 мН/мм² в изометрическом режиме

(рисунок 4.6.В). Подобное соотношение (различие в 2,5 раз) развитых клеткой напряжений в ауксотоническом и изометрическом режимах соотносится с представленными ранее исследованиями (см пункт 2.10 таблица 2.2) [37]. Минимальные значения деформаций также подтверждают смену режима сокращения: в ауксотоническом режиме деформация составила -2.86%, в изометрическом -0.39%.

4.2.2 Апробация разработанного программного комплекса управления системой аналоговых пьезодвигателей

Для апробации управления режимом сокращения кардиомиоцита (переключения с ауксотонического на изометрический и на изотонический) был проведен пробный биофизический эксперимент.

Для оценки погрешности движения двух аналоговых одноосных пьезодвигателей PU 65 HR был сгенерирован и подан одновременно на оба пьезодвигателя управляющий синусоидальный сигнал с частотой 1 Гц и амплитудой 1 В.

На каждом пьезодвигателе было установлено карбоновое волокно, и система оптического контроля записывало движение каждого из них, а также рассчитывало разницу их положений (рисунок 4.7).

Разность движения двух аналоговых одноосных пьезодвигателей не была постоянной. Максимальное отклонение от среднего положение не превышало 250 нм, что, в свою очередь, меньше разрешения системы оптического контроля.

При помощи разработанного программного комплекса управления одноосными аналоговыми пьезодвигателями удалось достичь изометрического и изотонического режимов сокращения кардиомиоцита. Репрезентативные записи развития напряжения одним кардиомиоцитом в трех различных режимах сокращения – в ауксотоническом, изотоническом, изометрическом приведены на рисунке 4.8.

Гарантированно идентифицировать смену режима сокращения позволяют минимальные значения деформации и максимальные значения развитого напряжения: при изотоническом режиме (наибольшая деформация, наименьшее развиваемое напряжение) деформация составила -3.86% , развиваемое напряжение 0.17 мН/мм^2 ; при изометрическом режиме (наименьшая деформация, наибольшее развиваемое напряжение) деформация составила -0.67% , развиваемое напряжение 4.21 мН/мм^2 .

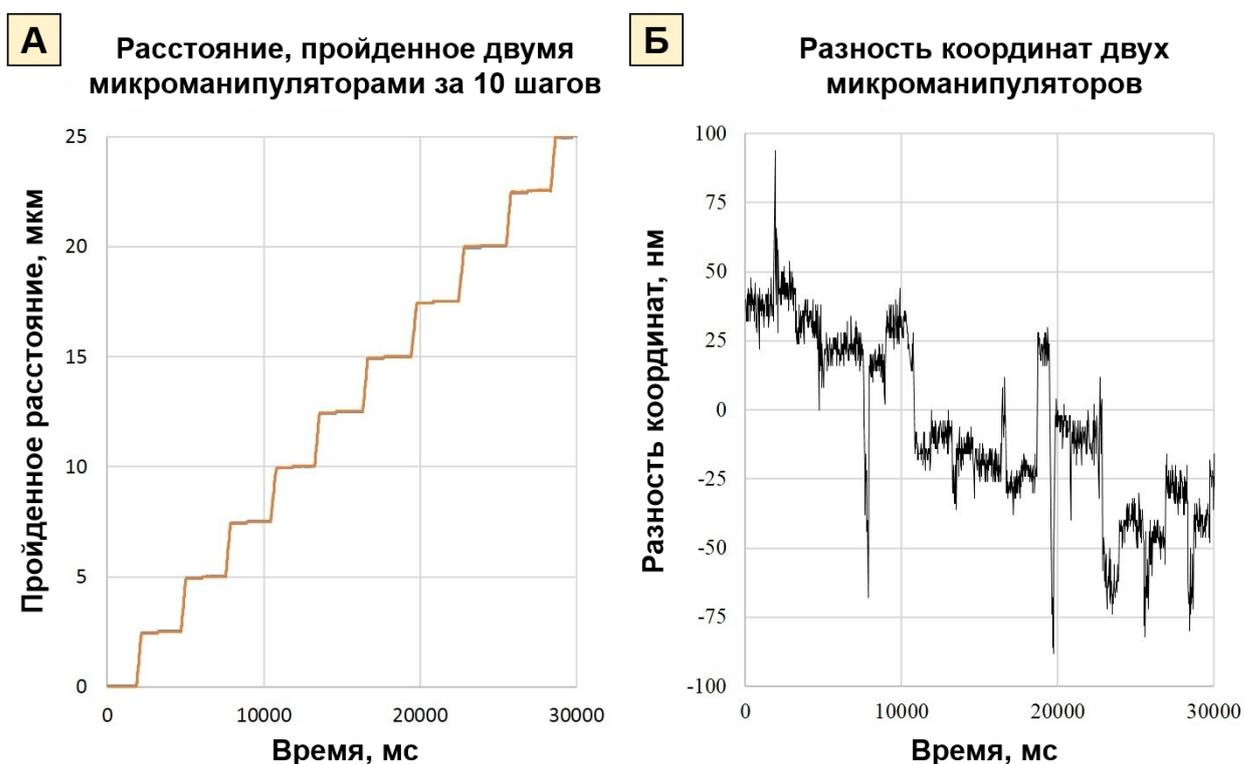


Рисунок 4.5 – Тестирование десяти последовательных шагов цифровых микроманипуляторов. А: Расстояние, пройденное двумя цифровыми микроманипуляторами. Б: Разность координат двух цифровых микроманипуляторов

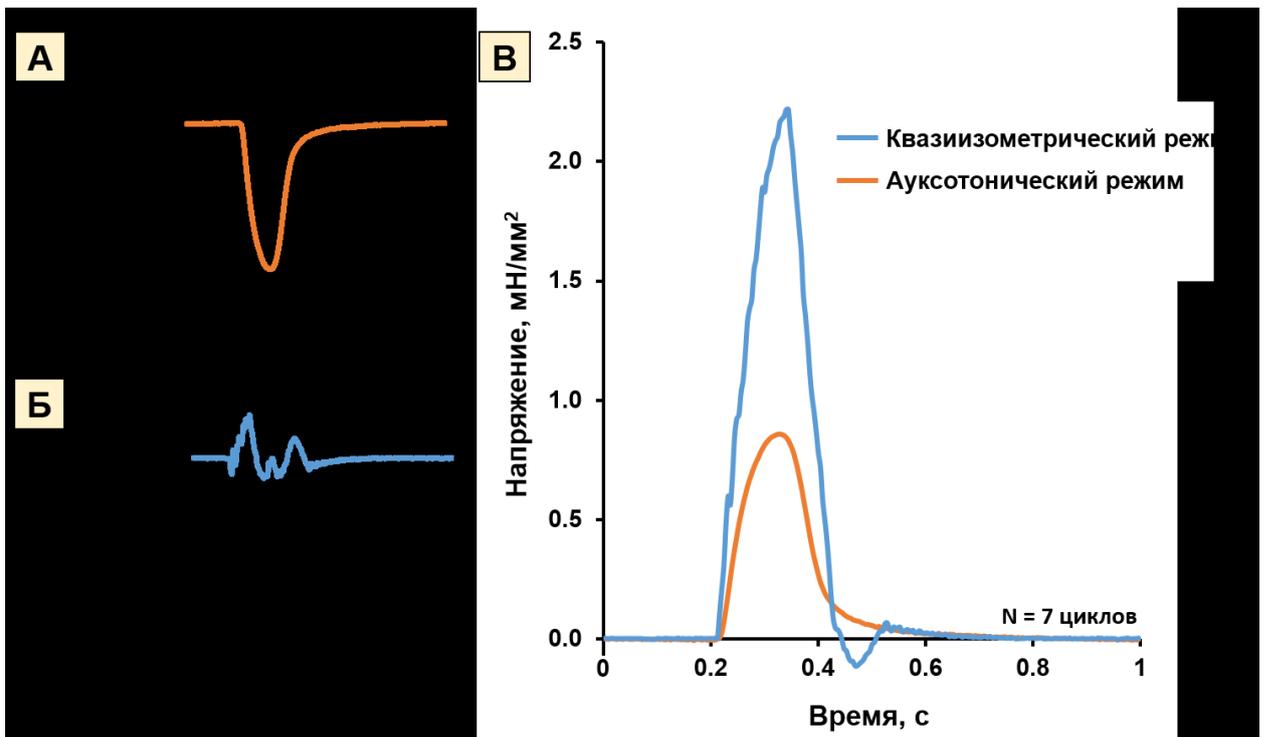


Рисунок 4.6 – А: График деформации кардиомиоцита в ходе активного сокращения в ауксотоническом режиме, вызванного стимуляцией электрическим полем частотой 1 Гц. Б: График деформации кардиомиоцита в ходе активного сокращения в изометрическом режиме. В: Сравнение ауксотонического и изометрического напряжений. Все записи усреднены по семи циклам сокращения

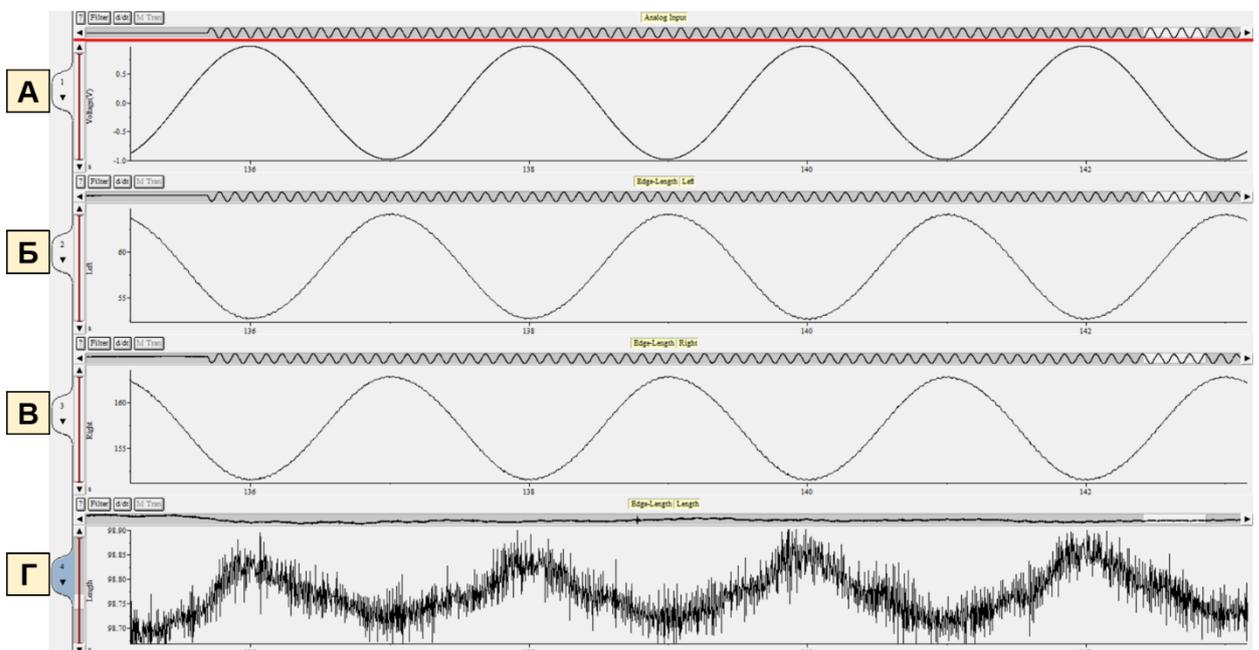


Рисунок 4.7 – А: Запись синусоидального управляющего сигнала с частотой 1 Гц и амплитудой 1 В. Б, В: Графики движения двух аналоговых одноосных пьезодвигателей. Г: Разница между положениями пьезодвигателей

4.3 Биофизические исследования региональных особенностей активных сократительных свойств кардиомиоцитов в норме и при экспериментальном СД1

4.3.1 Исследование влияния режима сокращения

Сравнение влияния ненагруженного и ауксотонического режима сокращения

Контрольная группа

Для решения поставленных задач были проанализированы следующие параметры клеток ЛЖ, ПЖ и МЖП в норме и при СД1: в ненагруженном режиме исследовались амплитуды сокращения саркомеров и времена достижения максимума сокращения саркомеров; в ауксотоническом и изометрическом режимах измерялись амплитуды развиваемых напряжений.

В контрольной группе значимых различий между регионами в амплитудах развиваемых напряжений и амплитудах сокращения саркомеров обнаружено не было (рисунок 4.9.А, рисунок 4.10).

Для контрольной группы изменение режима сокращения с ненагруженного на ауксотонический не привело к значимым изменениям амплитудно-временных характеристик сокращения саркомеров (рисунок 4.9).

Патологическая группа

Экспериментальный СД1 привёл к значимому уменьшению амплитуды сокращения и времени достижения максимума сокращения саркомеров для кардиомиоцитов ПЖ, но не для кардиомиоцитов ЛЖ и МЖП (рисунок 4.9). При СД1 амплитуды развиваемых напряжений уменьшились для регионов ЛЖ и ПЖ, но не для МЖП по сравнению с контрольными значениями (рисунок 4.10.А).

Сравнение влияния ауксотонического и изометрического режима сокращения

Патологическая группа

Обнаружив повышенную чувствительность кардиомиоцитов ПЖ, но не МжП к изменению режима сокращения при экспериментальном СД1, особенным интересом было сравнить изменение напряжения, развиваемому кардиомиоцитами ПЖ и МжП, при переходе от ауксотонического режима сокращения (средний уровень механической нагрузки) к изометрическому режиму сокращения (максимальный уровень механической нагрузки) при экспериментальном СД1.

При смене режима сокращения от ауксотонического к изометрическому, было обнаружено статистически значимое увеличение амплитуд напряжений, развиваемых кардиомиоцитами ПЖ, но не МжП (рисунок 4.11). Значения амплитуд напряжений не отличались между группами ПЖ и МжП.

Несмотря на то, что медианные значения амплитуд напряжений для группы МжП изменились на 188%, а для группы ПЖ – на 172%, коэффициент вариации (отношение межквартильного интервала к медианному значению) был выше в группе МжП, чем в группе ПЖ (на 194% в ауксотоническом режиме сокращения и на 110% в изометрическом режиме сокращения, таблица 4.2). Таким образом, регион МжП показывает большую вариабельность значений амплитуд напряжений при изменении механической нагрузки на максимальную, чем регион ПЖ, который более однороден в своем механическом ответе на изменение нагрузки. Так, меньшая вариабельность амплитуд напряжений кардиомиоцитов ПЖ делает регион ПЖ более чувствительным к механической нагрузке.

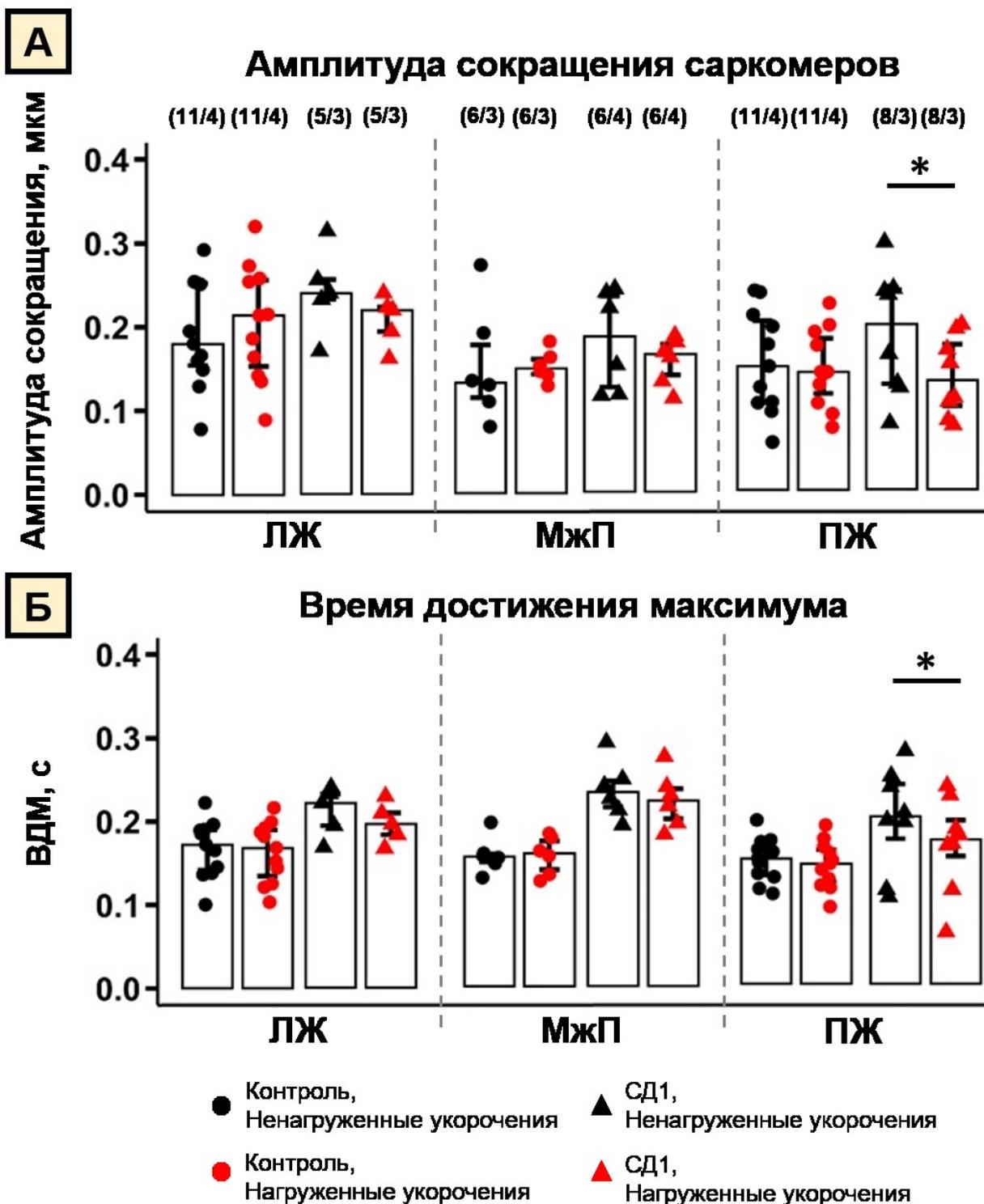


Рисунок 4.9 – Сравнение амплитуд сокращений (А) и времени достижения максимума сокращения саркомеров (Б) в одиночных кардиомиоцитах из свободной стенки ЛЖ, МжП и свободной стенки ПЖ в норме и при экспериментальном СД1. Каждая точка представляет значение для отдельной клетки. Количество клеток/сердец (животных) представлено сверху графика. Данные представлены как медиана и межквартильный разброс. * $p < 0.05$, тест Шейрера – Рэя – Хейра, критерий Вилкоксона для парных сравнений

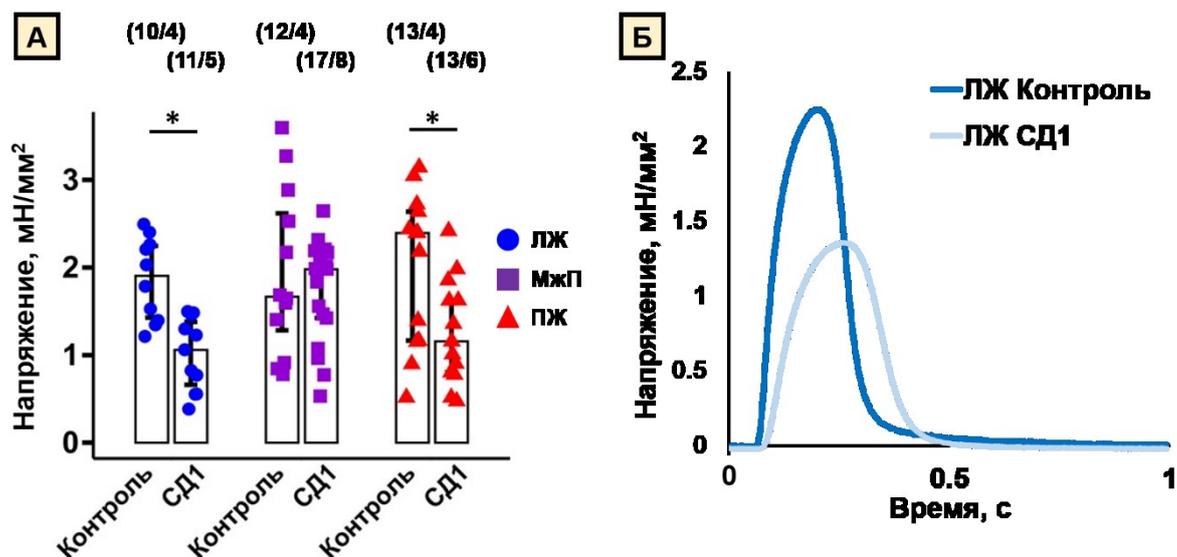


Рисунок 4.10. А: Сравнение амплитуд напряжений, развиваемых кардиомиоцитами ЛЖ, МжП и ПЖ, в ауксотоническом режиме сокращения в норме и при экспериментальном СД1. Каждая точка представляет значение для отдельной клетки. Количество клеток/сердец (животных) представлено в скобках вверху графика. Данные представлены как медиана и межквартильный разброс. * $p < 0.05$, тест Шейрера – Рэя – Хейра, критерий Данна для множественных сравнений между группами, поправка Холма – Бонферрони.

Б: Графики развития напряжения репрезентативными клетками ЛЖ в норме и при СД1.

Таблица 4.2 – Сравнение медианных значений, межквартильного разброса (IQR) и коэффициента вариации ($CV = IQR/\text{медиана}$) амплитуд развиваемых напряжений в ауксотоническом и изометрическом режимах сокращения кардиомиоцитов МжП и свободной стенки ПЖ

Регион и Режим сокращения	Медиана, мН/мм ²	IQR	CV
МжП Ауксотонический	1.14	0.77	0.68
МжП Изометрический	3.29	1.41	0.43
ПЖ Ауксотонический	1.31	0.30	0.23
ПЖ Изометрический	3.57	0.73	0.20

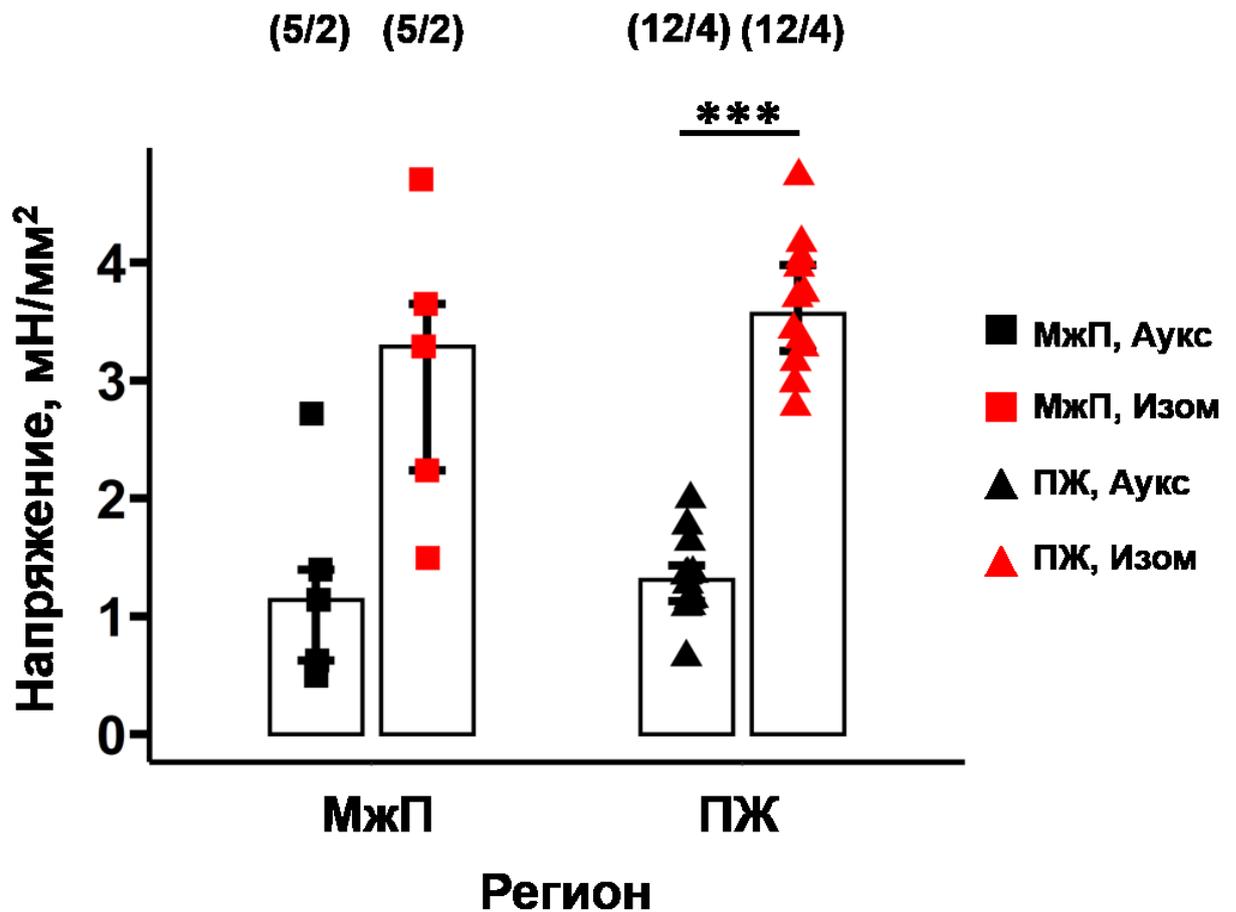


Рисунок 4.11 – Сравнение амплитуд развиваемых напряжений в ауксотоническом (Аукс) и изометрическом (Изом) режимах сокращения одиночных кардиомиоцитов из МжП и свободной стенки ПЖ при экспериментальном СД1. Каждая точка представляет значение для отдельной клетки. Количество клеток/сердце (животных) представлено вверху графика. Данные представлены как медиана и межквартильный разброс. *** $p < 0.001$, тест Шейрера – Рэя – Хейра, критерий Вилкоксона для парных сравнений

4.3.2 Исследование зависимостей «длины-напряжения» в норме и при экспериментальном СД1

При помощи разработанной методики было проведено исследование зависимостей «длины-напряжения» кардиомиоцитов ЛЖ, ПЖ, МжП в норме и при СД1.

В таблице 4.3 представлены медиана и межквартильный интервал угловых коэффициентов наклонов соотношений «длина-пассивное напряжение», «длина-активное напряжение» и «длина-общее напряжение» в норме и при экспериментальном СД1.

Контрольная группа

В контрольной группе значения углового коэффициента прямых «длина-пассивное напряжение», характеризующего жесткость кардиомиоцитов, для регионов ЛЖ, ПЖ и МжП не отличались между собой (рисунок 4.12.Б). Также не отличались значения углового коэффициента прямых «длина-общее напряжение» (рисунок 4.12.Г). Угловой коэффициент прямых «длина-активное напряжение», характеризующий сократимость кардиомиоцитов, был значимо ниже для региона МжП по сравнению с регионом ПЖ (рисунок 4.12.В). Следовательно, в норме сократимость кардиомиоцитов ПЖ выше сократимости кардиомиоцитов МжП.

Патологическая группа

Значимых региональных различий угловых коэффициентов прямых «длины-напряжения» в патологической группе не выявлено

Контрольная группа vs. Патологическая группа

Экспериментальный СД1 привёл к значимому уменьшению наклонов соотношений «длина-пассивное напряжение», «длина-активное напряжение» и «длина-общее напряжение» во всех регионах (рисунок 4.13).

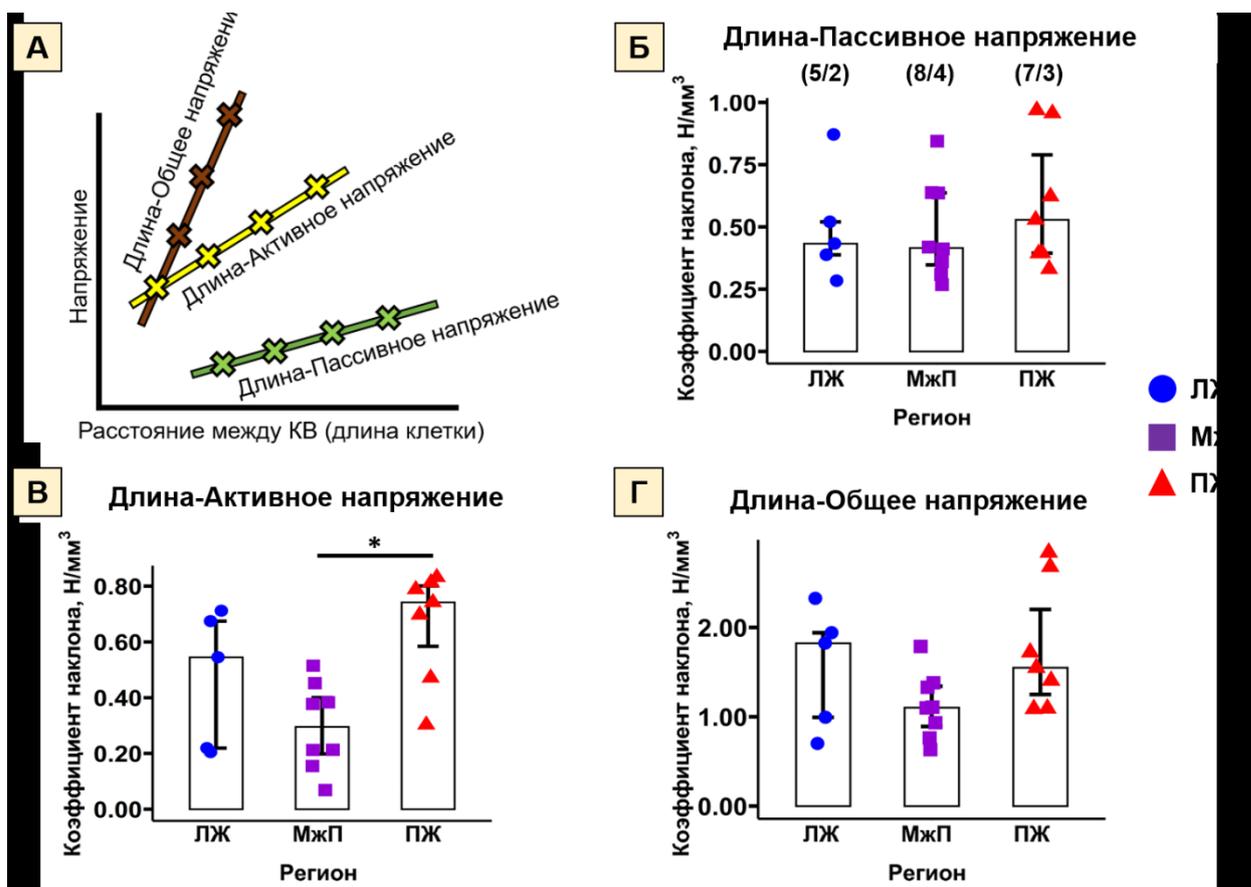


Рисунок 4.12 – Сравнение угловых коэффициентов зависимости Франка-Старлинга в одиночных кардиомиоцитах из свободной стенки ЛЖ, МжП и свободной стенки ПЖ. А: Зависимость пассивного напряжения от эффективной длины клетки («длина-пассивное напряжение»), общего напряжения от длины («длина-общее напряжение»), активного напряжения от длины («длина-активное напряжение»). Б: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-пассивное напряжение». В: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-активное напряжение». Г: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-общее напряжение». Каждая точка представляет значение для отдельной клетки. Количество клеток/сердец (животных) представлено в скобках на панели «Б». Данные представлены как медиана и межквартильный разброс. * $p < 0.05$, тест Краскела — Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений между группами, поправка Холма – Бонферрони

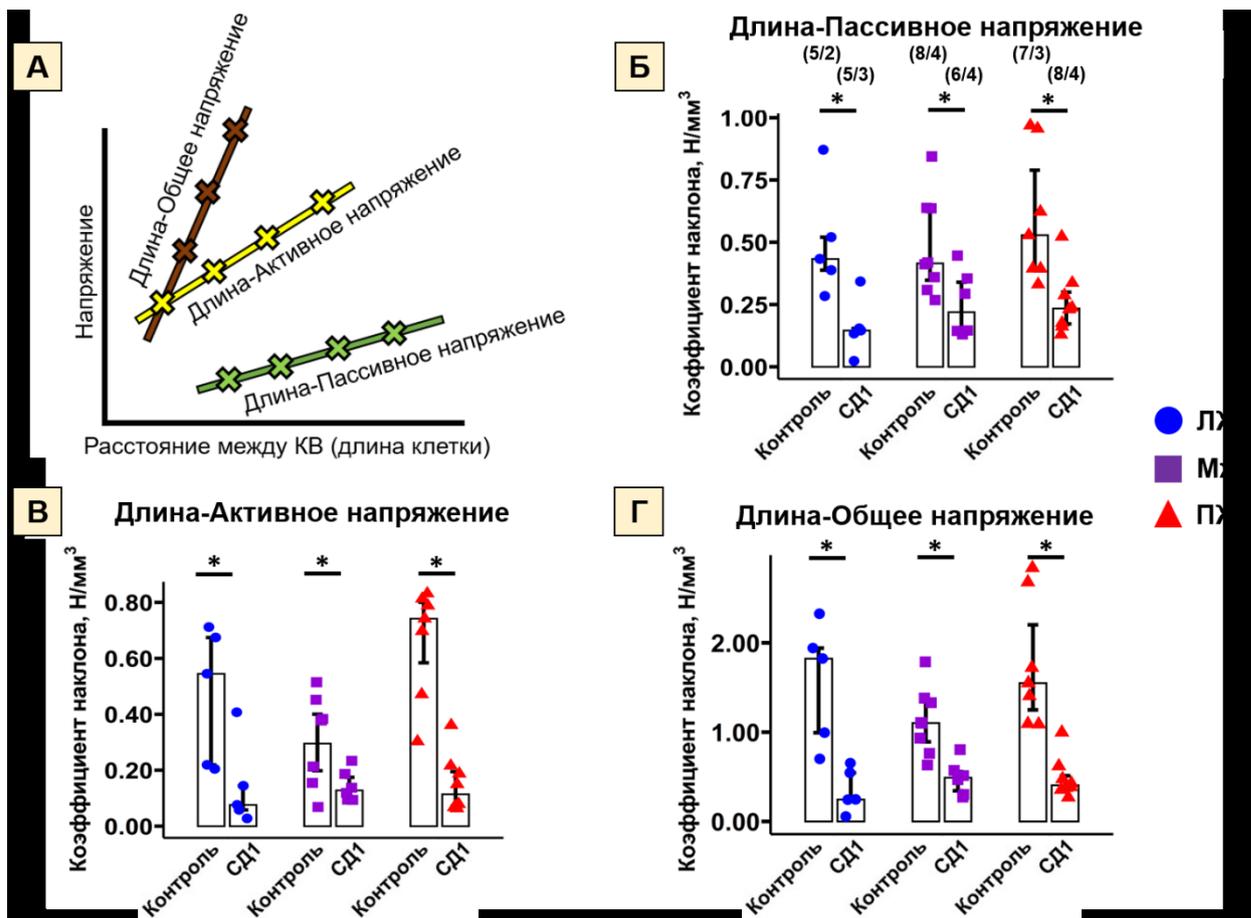


Рисунок 4.13 – Сравнение угловых коэффициентов зависимости Франка-Старлинга в одиночных кардиомиоцитах из свободной стенки ЛЖ, МЖП и свободной стенки ПЖ половозрелых крыс-самцов линии Wistar возрастом 18 недель в норме и при экспериментальном СД1. А: Зависимость пассивного напряжения от эффективной длины клетки («длина-пассивное напряжение»), общего напряжения от длины («длина-общее напряжение»), активного напряжения от длины («длина-активное напряжение»). Б: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-пассивное напряжение». В: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-активное напряжение». Г: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-общее напряжение». Каждая точка представляет значение для отдельной клетки. Количество клеток/сердеч (животных) представлено в скобках на панели «Б». Данные представлены как медиана и межквартильный разброс. * $p < 0.05$, тест Шейрера – Рэя – Хейра, критерий Данна для множественных сравнений между группами, поправка Холма – Бонферрони

Несмотря на то, что угловой коэффициент прямых «длина-активное напряжение», характеризующий сократимость кардиомиоцитов, был значимо ниже для региона МжП по сравнению с регионом ПЖ (рисунок 4.13.В), в группе СД1 региональных отличий выявлено не было.

Следовательно, было выявлено, что СД1 приводит к уменьшению региональных отличий в параметре сократимости кардиомиоцитов желудочков (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Сравнение значений угловых коэффициентов (медиана и межквартильный интервал).

	ЛЖ Контроль	МжП Контроль	ПЖ Контроль	ЛЖ СД1	МжП СД1	ПЖ СД1
Длина-Пассивное напряжение	0.43 (0.13)	0.42 (0.29)	0.53 (0.40)	0.15 (0.02)	0.22 (0.19)	0.23 (0.13)
Длина-Активное напряжение	0.55 (0.46)	0.30 (0.20)	0.74 (0.22)	0.08 (0.09)	0.13 (0.07)	0.11 (0.12)
Длина-Общее Напряжение	1.82 (0.95)	1.10 (0.45)	1.55 (0.95)	0.25 (0.30)	0.49 (0.21)	0.41 (0.14)

4.4 Биофизические исследования региональных особенностей пассивных вязкоупругих свойств кардиомиоцитов норме и при экспериментальном СД1

При помощи разработанной методики были получены вязкоупругие гистерезисы кардиомиоцитов ЛЖ, ПЖ и МжП в норме и при СД1, для анализа пассивных физических свойств, выраженных диссипацией кардиомиоцитом энергии упругой деформации (формула 1.1).

Контрольная группа

Анализ предварительных данных показал, что в норме кардиомиоциты ЛЖ (рис. 4.14.А), ПЖ (рис. 4.14.Б) и МжП (рис. 4.14.В) демонстрировали различные площади петель гистерезиса после первого быстрого растяжения, а также различные уровни прироста площади петель гистерезиса после второго быстрого растяжения (таблица 4.4). Движение по петле гистерезиса в исследованной вязкоупругой структуре пассивного миокарда всегда

направлено по часовой стрелке, что характерно для диссипативных систем [29].

Контрольная группа vs. Патологическая группа

Петли гистерезиса для кардиомиоцитов МжП при СД1 имеют менее выраженную форму остроугольной петли, относительно кардиомиоцитов МжП здоровых животных, что свидетельствует о потере вязкостных характеристик репрезентативной клетки. Также площадь петель гистерезиса кардиомиоцитов МжП при СД1 после второго быстрого растяжения демонстрирует меньший прирост относительно кардиомиоцитов МжП здоровых животных.

Таблица 4.4 – Площади петель гистерезиса

Петля гистерезиса (см. рисунок 4.11)	Площади петель гистерезиса, нДж/мм ²			
	А	Б	В	Г
1	0.515	0.419	0.084	0.101
2	0.674	0.732	0.295	0.148

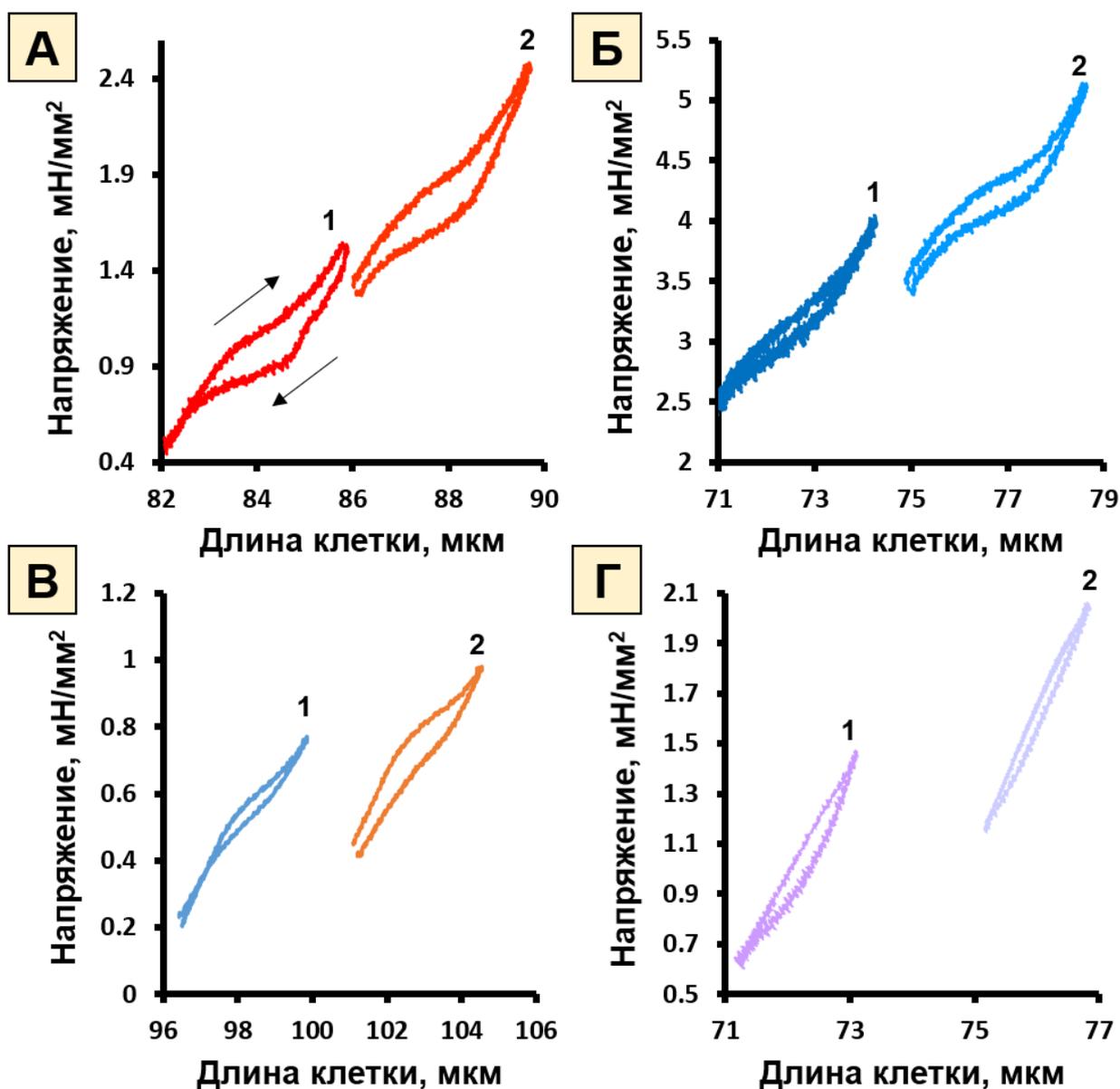


Рисунок 4.14 – Вязкоупругий гистерезис, полученный из усредненного ответа клетки на подаваемые пилообразные последовательные сигналы растяжения-сжатия, репрезентативные записи. А: кардиомиоцит ЛЖ, контрольная группа. Б: кардиомиоцит ПЖ, контрольная группа. В: кардиомиоцит МжП, контрольная группа. Г: кардиомиоцит МжП группа СД1.

Полученные первичные репрезентативные данные позволяют считать, что вязкоупругие свойства кардиомиоцитов могут различаться регионально и в норме, и при СД1.

4.5 Математическое моделирование региональных особенностей сократительных свойств кардиомиоцитов в норме

Для воспроизведения основных феноменов, обнаруженных экспериментально, использовался механический блок оригинальной математической модели, разработанной в ИИФ УрО РАН [42, 47], пункт 1.6.

Математическая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений. Для расчета численных значений переменных использован метод Эйлера с шагом по времени 10 мкс. В качестве референтной модели использована модель с параметрами, подробно описанными в [47]. Параметры модели подбирались последовательным перебором в диапазоне 0...200 % с шагом 0.01% от исходного. На основании набора полученных данных были выбраны модели, корректно описывающие экспериментальные данные (% отклонения от экспериментального медианного значения – не более 1%).

В качестве экспериментального набора данных был взят набор зависимостей «длины-напряжения» кардиомиоцитов ЛЖ, ПЖ, МЖП в норме, представленный в Главе 4, разделе 4.3.2, рисунок 4.12.

Как и в реальном биофизическом эксперименте в первую очередь подбиралась жесткость карбонового волокна. Были подобраны таким образом коэффициенты α_3 и β_3 , определяющие жесткость карбонового волокна, прикрепленного к мембране кардиомиоцита (формула 1.4), чтобы соответствовать значениям развиваемых напряжений, полученных в биофизическом эксперименте.

Слишком высокая жесткость виртуального карбонового волокна аналогично высокой жесткости реального карбонового волокна, прикрепленного к мембране кардиомиоцита, приведёт к тому, что сокращающийся кардиомиоцит не будет способен изогнуть карбоновое волокно, следовательно, измеряемое напряжение будет равно нулю.

Аналогично, слишком низкая жесткость прикрепленного карбонового волокна (что равно отсутствию нагрузки на кардиомиоцит) заставит кардиомиоцит сокращаться в псевдоненагруженном режиме.

Несмотря на то, что в контрольной группе значения углового коэффициента прямых «длина-пассивное напряжение», характеризующего жесткость кардиомиоцитов, для регионов ЛЖ, ПЖ и МжП не отличались значимо между собой, коэффициенты α_2 и β_2 (формула 1.5), описывающие элемент PE (рисунок 1.15) были подобраны таким образом, чтобы воспроизвести наблюдаемую в биофизическом эксперименте биологическую вариабельность (максимальное отклонение от медианного значения <7%).

В рамках эксперимента наблюдалась значимо более высокая сократимость кардиомиоцитов ПЖ относительно сократимости кардиомиоцитов МжП, требовалось выяснить за счет каких параметров модели возможно воспроизвести эти отличия.

Для формирования соответствующего наклона зависимости «длина-активное напряжение» изменялись следующие параметры формул: g_1 , g_2 – параметры модели, определяющие вероятность нахождения миозиновой головкой свободного места на активной нити, n_{1A} – вероятность присоединения миозина к актину (формулы 1.8, 1.9, 1.10).

На рисунке 4.15 и таблице 4.5 продемонстрирован результат математического моделирования основных феноменов, наблюдаемых экспериментально:

1. значения углового коэффициента прямых «длина-пассивное напряжение», характеризующего жесткость кардиомиоцитов, для регионов ЛЖ, ПЖ и МжП не отличаются значимо между собой, но присутствует биологическая вариабельность;
2. сократимость кардиомиоцитов ПЖ значимо выше относительно сократимости кардиомиоцитов МжП и выше сократимости кардиомиоцитов ЛЖ.

Таблица 4.5 – Значения параметров механического блока математической модели

	α_3	β_3	α_2	β_2	g_1	g_2	$n1_A$
ЛЖ	32.840	-1.288	22.360	-1.647	2.450	0.020	2.850
МжП			22.200	-1.635	2.200		2.250
ПЖ			23.586	-1.740	2.600		3.000

Показано, что большая вероятность присоединения миозина к актину определяемая параметром $n1_A$ (формула 1.10) в кардиомиоцитах ПЖ в ходе их сокращения позволяет объяснить их большую сократимость по сравнению с кардиомиоцитами ЛЖ и МжП в норме. Дальнейшие исследования необходимы для проверки данной гипотезы.

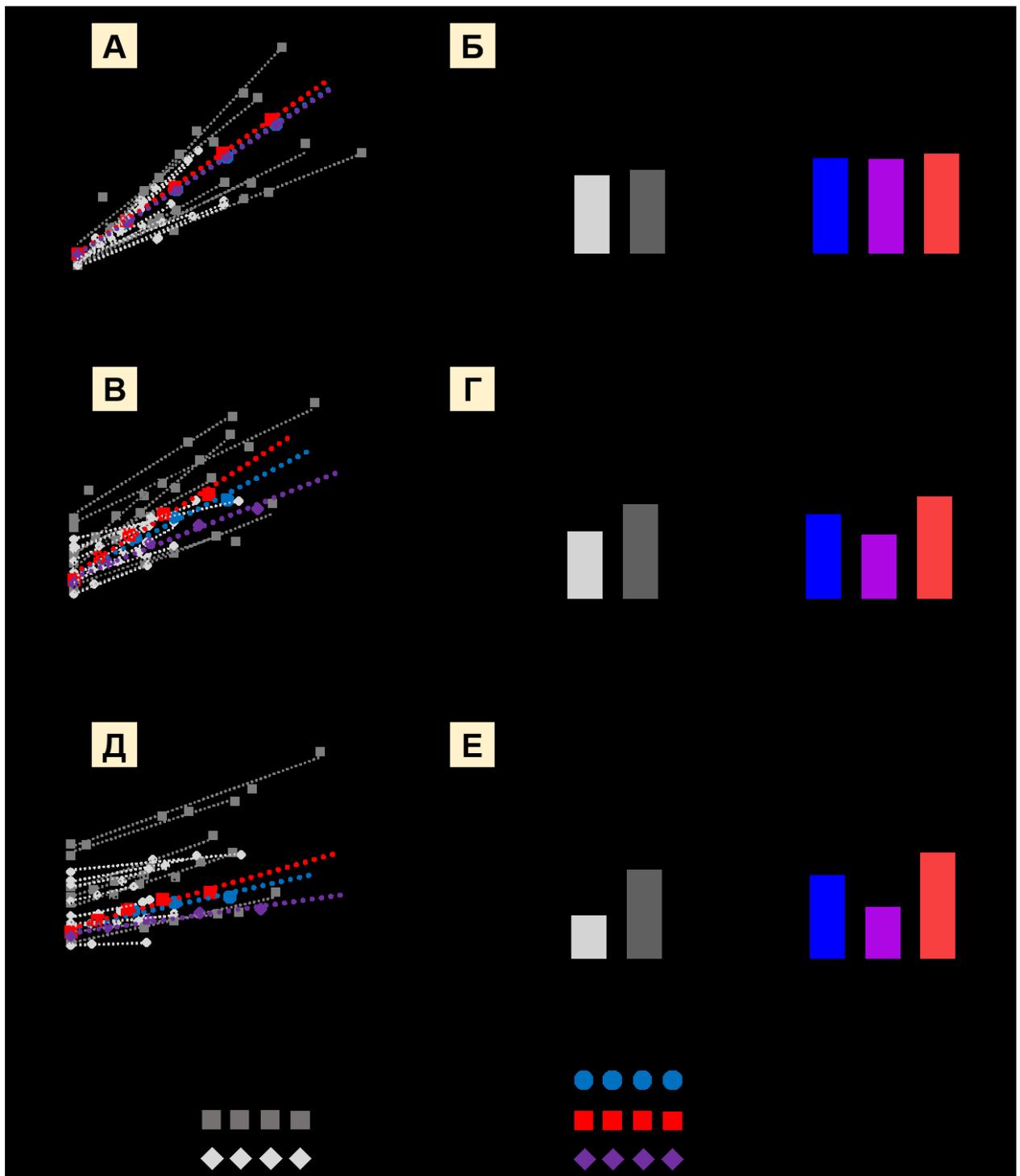


Рисунок 4.15 – Сравнение угловых коэффициентов зависимости Франка-Старлинга в одиночных кардиомиоцитах из свободной стенки ЛЖ, МжП и свободной стенки ПЖ в экспериментах и математических моделях. А: Графики зависимостей «длина-пассивное напряжение» в эксперименте и модели. Б: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-пассивное напряжение» в эксперименте и модели. В: Графики зависимостей «длина-общее напряжение» в эксперименте и модели. Г: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-общее напряжение» в эксперименте и модели. Д: Графики зависимостей «длина-активное напряжение» в эксперименте и модели. Е: Угловой коэффициент наклона прямой «длина-активное напряжение» в эксперименте и модели. * $p < 0.05$, тест Шейрера – Рэя – Хейра, критерий Данна для множественных сравнений между группами, поправка Холма – Бонферрони

4.6 Выводы по главе 4

1) Разработанная экспериментальная установка позволяет растягивать кардиомиоцит в диапазоне длин саркомеров от 1.8 мкм до 2.2. мкм, измерять напряжение, развиваемое желудочковым кардиомиоцитом крысы, в диапазоне значений от 0 до 14 мН/мм².

2) Разработанное ПО управления системой цифровых микроманипуляторов и аналоговых пьезодвигателей позволяет управлять режимом сокращения кардиомиоцита с допустимой асинхронностью перемещения карбоновых волокон менее разрешения системы оптического контроля – 294 нм на пиксель.

3) Исследовано влияние изменения режима сокращения кардиомиоцитов в норме и при СД1. Обнаружено, что при СД1 типа изменение режима сокращения с ненагруженного на ауксотонический вызывает значимое уменьшение амплитуды напряжения и времени максимума сокращения кардиомиоцитов ПЖ, но не ЛЖ и МжП.

При СД1 амплитуды развиваемых напряжений в ауксотоническом режиме значимо уменьшились для регионов ЛЖ и ПЖ, но не для МжП по сравнению с контрольными значениями.

При смене режима сокращения от ауксотонического к изометрическому в группе СД1 было обнаружено статистически значимое увеличение амплитуд напряжений, развиваемых кардиомиоцитами ПЖ, но не МжП.

Была выявлена повышенная чувствительность региона ПЖ к механической нагрузке.

4) Исследованы зависимости «длины-напряжения» кардиомиоцитов в норме и при СД1. Обнаружено, что в норме угол наклона зависимости «конечно-систолическая длина – активное напряжение» для кардиомиоцитов ПЖ значимо выше относительно кардиомиоцитов МжП. Следовательно, в норме сократимость кардиомиоцитов ПЖ выше сократимости кардиомиоцитов МжП. При экспериментальном СД1 углы наклонов всех

зависимостей «длины-напряжения» значимо уменьшаются. Следовательно, СД1 приводит к значимому снижению жесткости и сократимости кардиомиоцитов всех регионов сердца. Также, было выявлено, что СД1 приводит к уменьшению региональных отличий в параметре сократимости кардиомиоцитов желудочков.

5) Разработанная методика позволяет получать вязкоупругий гистерезис кардиомиоцитов и оценивать диссипацию кардиомиоцитами энергии упругой деформации. Полученные первичные репрезентативные данные позволяют считать, что вязкоупругие свойства кардиомиоцитов могут различаться регионально и в норме, и при СД1.

6) Отличия параметров построенных математических моделей механической функции кардиомиоцитов для различных отделов желудочков сердца позволяют предположить, что большая вероятность присоединения миозина к актину в кардиомиоцитах ПЖ в ходе их сокращения обуславливает их большую сократимость по сравнению с кардиомиоцитами ЛЖ и МЖП в норме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы работы состоят в следующем:

1) Разработанная экспериментальная установка позволяет проводить измерение пассивных вязкоупругих и активных сократительных свойств одиночных кардиомиоцитов, амплитудных характеристик и параметров временного хода развития напряжения и деформации, с учетом их межжелудочковых различий.

Разработанная экспериментальная установка обеспечивает:

- термостатирование суспензии с одиночными кардиомиоцитами на выбранной температуре в диапазоне значений 15-40 °С, допустимые колебания температуры ± 0.5 °С;
- обеспечивает надежный контакт кардиомиоцит-углеродное волокно-микроманипулятор, позволяющий изучать физические свойства одиночных кардиомиоцитов во всем физиологическом диапазоне длин саркомеров (1.8 – 2.2 мкм)
- стимуляцию суспензии с одиночными кардиомиоцитами электрическим импульсом с настраиваемыми параметрами: амплитуда 15-35 В, длительность 1-10 мс, частота 1-4 Гц, форма импульса – меандр;
- регистрацию деформации кардиомиоцита с частотой 250 Гц, с разрешением 0.294 мкм на пкс;
- возможность прецизионного перемещения четырех углеродных волокон в диапазоне 2 см по осям x,y,z, с разрешением движения 5 нм;
- возможность управления перемещением углеродного волокна с разрешением 0.13 нм в диапазоне 65 мкм генерированием аналогового сигнала произвольной формы.

2) Разработанные программные комплексы управления системой цифрового микроманипулирования и аналоговых пьезодвигателей предлагают экспериментатору широкий спектр настроек приложения механического нагружения к кардиомиоциту, включающий в себя: шаговое растяжение для

исследования зависимостей «длины-напряжения» и динамическое пилообразное растяжение препарата для регистрации вязкоупругого гистерезиса кардиомиоцита, позволяющего оценить пассивные физические свойства клетки. Также программный комплекс предоставляет возможность управления режимом сокращения кардиомиоцита: ауксотоническим, изометрическим, изотоническим, и проводить анализ получаемых результатов.

3) Разработанная экспериментальная установка позволяет измерять физические свойства кардиомиоцитов в физиологическом диапазоне регистрируемых величин в норме, а также их изменения, связанных с патологией.

Исследовано влияние изменения режима сокращения кардиомиоцитов в норме и при СД1. Обнаружено, что при СД1 типа изменение режима сокращения с ненагруженного на ауксотонический вызывает значимое уменьшение амплитуды сокращения саркомеров и времени максимума сокращения кардиомиоцитов ПЖ, но не ЛЖ и МЖП.

При СД1 амплитуды развиваемых напряжений в ауксотоническом режиме значимо уменьшились для регионов ЛЖ и ПЖ, но не для МЖП по сравнению с контрольными значениями.

При смене режима сокращения от ауксотонического к изометрическому в группе СД1 было обнаружено статистически значимое увеличение амплитуд напряжений, развиваемых кардиомиоцитами ПЖ, но не МЖП.

Была выявлена повышенная чувствительность региона ПЖ к механической нагрузке.

Исследованы зависимости «длины-напряжения» кардиомиоцитов в норме и при СД1. Обнаружено, что в норме угол наклона зависимости «конечно-систолическая длина – активное напряжение» для кардиомиоцитов ПЖ значимо выше относительно кардиомиоцитов МЖП. Следовательно, в норме сократимость кардиомиоцитов ПЖ выше сократимости кардиомиоцитов МЖП. При экспериментальном СД1 углы наклонов всех

зависимостей «длины-напряжения» значимо уменьшаются. Следовательно, СД1 приводит к значимому снижению жесткости и сократимости кардиомиоцитов всех регионов сердца. Также, было выявлено, что СД1 приводит к уменьшению региональных отличий в параметре сократимости кардиомиоцитов желудочков

4) Разработанная математическая модель воспроизводит различия в параметрах сократимости кардиомиоцитов желудочков, наблюдаемые в биофизическом эксперименте, и выявляет возможные механизмы, лежащие в основе этих различий.

Отличия параметров построенных математических моделей механической функции кардиомиоцитов для различных отделов желудочков сердца позволяют предположить, что большая вероятность присоединения миозина к актину в кардиомиоцитах ПЖ в ходе их сокращения обуславливает наблюдаемую в биофизическом эксперименте их большую сократимость по сравнению с кардиомиоцитами ЛЖ и МЖП в норме.

Перспективы дальнейшей разработки

Продолжение исследований физических свойств изолированных сердечных мышечных клеток возможно модернизацией разработанной и созданной в ходе работы экспериментальной установки добавлением модуля лазерно-флуоресцентного анализа.

При помощи данного модуля будет возможна запись сигнала изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} одновременно с уже доступной записью сигнала деформации кардиомиоцита и развиваемого им напряжения, что даст более подробную информацию о параметрах сократимости кардиомиоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ЛЖ – левый желудочек

МжП – межжелудочковая перегородка

ПЖ – правый желудочек

ПО – программное обеспечение

СД1 – сахарный диабет первого типа

ЦАП – цифро-аналоговый преобразователь

ШИМ – широтно-импульсная модуляция

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф. Гистология, эмбриология, цитология: Учебник / Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф., 6-е изд., перераб. и доп.-е изд., М: ГЭОТАР–Медиа, 2012. 800 с.
2. Васильева, А. Д. Математическое моделирование трансмуральных особенностей электрической и механической функции миокарда желудочка 2015.
3. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета // 2014.
4. Евлахов В. И., Пуговкин А. П., Шалковская Л. Н. Основы физиологии сердца: Учебное пособие / Евлахов В. И., Пуговкин А. П., Шалковская Л. Н., СПб: СпецЛит, 2015. 335 с.
5. Козлов В.И. Анатомия сердечно-сосудистой системы: учебное пособие для студентов медицинских вузов / Козлов В.И., М.: Практическая медицина, 2013. 192 с.
6. Мархасин В. С. [и др.]. Проблема неоднородности миокарда // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2009. № 9 (95). С. 919–943.
7. Смолюк Л.Т. Вязкоупругий гистерезис папиллярной мышцы // Российский журнал биомеханики. 2011. (2). С. 24–31.
8. Соловьева О. [и др.]. Математическое моделирование живых систем / О. Соловьева, В. Мархасин, Л. Кацнельсон, Т. Сульман, А. Васильева, [и др.], Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2013. 325 с.
9. Сульман Т. Математическое моделирование нарушений электрической и механической функции миокарда при перегрузке кардиомиоцитов кальцием 2008.

10. Трэвис Дж., Кринг Дж. LabVIEW для всех / Трэвис Дж., Кринг Дж., 4-е изд., перераб. и доп.-е изд., М: ДМК Пресс, 2015. 904 с.
11. Amuzescu V. [и др.]. Evolution of mathematical models of cardiomyocyte electrophysiology // *Mathematical Biosciences*. 2021. (334). С. 108567.
12. Aneja A. [и др.]. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options // *The American Journal of Medicine*. 2008. № 9 (121). С. 748–757.
13. Anto Michel N. [и др.]. Cellular Heterogeneity of the Heart // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022. (9). С. 868466.
14. Appleyard R. F., Glantz S. A. Pulmonary model to predict the effects of series ventricular interaction. // *Circulation Research*. 1990. № 5 (67). С. 1225–1237.
15. aursc20dev Documents // Aurora Scientific [Электронный ресурс]. URL: <https://aurorascientific.com/support/documents/> (дата обращения: 17.07.2023).
16. Bastos M. B. [и др.]. Invasive left ventricle pressure–volume analysis: overview and practical clinical implications // *European Heart Journal*. 2020. № 12 (41). С. 1286–1297.
17. Bell D. S. H. Heart Failure // *Diabetes Care*. 2003. № 8 (26). С. 2433–2441.
18. Bollensdorff C., Lookin O., Kohl P. Assessment of contractility in intact ventricular cardiomyocytes using the dimensionless ‘Frank–Starling Gain’ index // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2011. № 1 (462). С. 39–48.
19. Boukens B. J. [и др.]. Transmural electrophysiological heterogeneity, the T-wave and ventricular arrhythmias // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016. № 3 (122). С. 202–214.
20. Brady A. J. Mechanical properties of isolated cardiac myocytes // *Physiological Reviews*. 1991. № 2 (71). С. 413–428.

21. Brady A. J., Farnsworth S. P. Cardiac myocyte stiffness following extraction with detergent and high salt solutions // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1986. № 6 (250). C. H932–H943.
22. Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells // *Nature Reviews Genetics*. 2005. № 11 (6). C. 826–835.
23. Butova X. A., Myachina T. A., Khokhlova A. D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // *MethodsX*. 2021. (8). C. 101189.
24. Cazorla O., Le Guennec J.-Y., White E. Length–Tension Relationships of Sub-epicardial and Sub-endocardial Single Ventricular Myocytes from Rat and Ferret Hearts // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000. № 5 (32). C. 735–744.
25. Copelas L. [и др.]. A method for recording isometric tension development by isolated cardiac myocytes: transducer attachment with fibrin glue // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1987. № 3 (408). C. 315–317.
26. De Tombe P. P. [и др.]. Myofilament length dependent activation // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010. № 5 (48). C. 851–858.
27. Fukuda N. [и др.]. Titin and Troponin: Central Players in the Frank-Starling Mechanism of the Heart // *Current Cardiology Reviews*. 2009. № 2 (5). C. 119–124.
28. Hamill O. P. [и др.]. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 1981. № 2 (391). C. 85–100.

29. Helmes M. [и др.]. Mechanically Driven Contour-Length Adjustment in Rat Cardiac Titin's Unique N2B Sequence: Titin Is an Adjustable Spring // *Circulation Research*. 1999. № 11 (84). С. 1339–1352.
30. Helmes M. [и др.]. Mimicking the cardiac cycle in intact cardiomyocytes using diastolic and systolic force clamps; measuring power output // *Cardiovascular Research*. 2016. № 1 (111). С. 66–73.
31. Henton A. Calcium and Contractility System // IonOptix [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ionoptix.com/products/systems/calcium-and-contractility-system/> (дата обращения: 08.07.2023).
32. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *The Journal of Physiology*. 1952. № 4 (117). С. 500–544.
33. Hofmann P. A., Hartzell H. C., Moss R. L. Alterations in Ca²⁺ sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. // *Journal of General Physiology*. 1991. № 6 (97). С. 1141–1163.
34. Iribarren C. [и др.]. Glycemic Control and Heart Failure Among Adult Patients With Diabetes // *Circulation*. 2001. № 22 (103). С. 2668–2673.
35. Iribe G. [и др.]. Load dependency in force–length relations in isolated single cardiomyocytes // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2014. № 2–3 (115). С. 103–114.
36. Iribe G. Development in Cell Manipulation Techniques for the Study of Single Cardiomyocyte Mechanics под ред. G. M. Artmann [и др.], Singapore: Springer Singapore, 2018.С. 193–207.
37. Iribe G., Helmes M., Kohl P. Force-length relations in isolated intact cardiomyocytes subjected to dynamic changes in mechanical load // *American*

Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2007. № 3 (292). С. H1487–H1497.

38. Izakov VYa [и др.]. Cooperative effects due to calcium binding by troponin and their consequences for contraction and relaxation of cardiac muscle under various conditions of mechanical loading. // Circulation Research. 1991. № 5 (69). С. 1171–1184.

39. Kadappu K. K. [и др.]. Changes in left atrial volume in diabetes mellitus: more than diastolic dysfunction? // European Heart Journal - Cardiovascular Imaging. 2012. № 12 (13). С. 1016–1023.

40. Kalik Z. M. [и др.]. Sex and regional differences in rabbit right ventricular L-type calcium current levels and mathematical modelling of arrhythmia vulnerability // Experimental Physiology. 2017. № 7 (102). С. 804–817.

41. Katsnelson L. Mathematical Modeling of Relations Between the Kinetics of Free Intracellular Calcium and Mechanical Function of Myocardium // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 1996. № 3 (28). С. 475–486.

42. Katsnelson L., Konovalov P., Solovyova O. New Mathematical Model of Electromechanical Coupling in Rat Cardiomyocytes 2018.

43. Katz A. M., Katz P. B. Homogeneity out of heterogeneity. // Circulation. 1989. № 3 (79). С. 712–717.

44. Kelly R. G. [и др.]. Cell history determines the maintenance of transcriptional differences between left and right ventricular cardiomyocytes in the developing mouse heart // Journal of Cell Science. 2003. № 24 (116). С. 5005–5013.

45. Khamzin S. [и др.]. Machine Learning Prediction of Cardiac Resynchronisation Therapy Response From Combination of Clinical and Model-Driven Data // Frontiers in Physiology. 2021. (12). С. 753282.

46. Khokhlova A. [и др.]. The effects of load on transmural differences in contraction of isolated mouse ventricular cardiomyocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018. (114). С. 276–287.
47. Khokhlova A. [и др.]. The Effects of Mechanical Preload on Transmural Differences in Mechano-Calcium-Electric Feedback in Single Cardiomyocytes: Experiments and Mathematical Models // *Frontiers in Physiology*. 2020. (11). С. 171.
48. Khokhlova A. [и др.]. Type 1 Diabetes Impairs Cardiomyocyte Contractility in the Left and Right Ventricular Free Walls but Preserves It in the Interventricular Septum // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. № 3 (23). С. 1719.
49. Koiwa Y. [и др.]. Measurement of instantaneous viscoelastic properties by impedance-frequency curve of the ventricle // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1986. № 4 (250). С. H672–H684.
50. Kondo R. P. [и др.]. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform: Interventricular heterogeneity of cardiac myocyte contractions // *The Journal of Physiology*. 2006. № 1 (571). С. 131–146.
51. Kopton R. A. [и др.]. Electromechanical Assessment of Optogenetically Modulated Cardiomyocyte Activity // *Journal of Visualized Experiments*. 2020. № 157. С. 60490.
52. Kopton R. A. [и др.]. Electromechanical Assessment of Optogenetically Modulated Cardiomyocyte Activity // *Journal of Visualized Experiments*. 2020. № 157. С. 60490.
53. Le Guennec J. A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: Length dependence of passive and active tension // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1990. № 10 (22). С. 1083–1093.

54. Li G. [и др.]. Differential Wnt-mediated programming and arrhythmogenesis in right versus left ventricles // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018. (123). С. 92–107.
55. Modesti P. A. [и др.]. Different Growth Factor Activation in the Right and Left Ventricles in Experimental Volume Overload // *Hypertension*. 2004. № 1 (43). С. 101–108.
56. Molina C. E. [и др.]. Differences in Left Versus Right Ventricular Electrophysiological Properties in Cardiac Dysfunction and Arrhythmogenesis // *Arrhythmia & Electrophysiology Review*. 2016. № 1 (5). С. 14.
57. Myachina T. A., Butova X. A., Khohlova A. D. A modified Langendorff-free method for isolation of cardiomyocytes from adult rat heart Ekaterinburg, Russia; 2019.С. 020140.
58. Naeije R., Badagliacca R. The overloaded right heart and ventricular interdependence // *Cardiovascular Research*. 2017. № 12 (113). С. 1474–1485.
59. Najafi A. [и др.]. End-diastolic force pre-activates cardiomyocytes and determines contractile force: role of titin and calcium // *The Journal of Physiology*. 2019. № 17 (597). С. 4521–4531.
60. Niederer S. A., Campbell K. S., Campbell S. G. A short history of the development of mathematical models of cardiac mechanics // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2019. (127). С. 11–19.
61. Nishimura S. [и др.]. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004. № 1 (287). С. H196–H202.
62. Nowbar A. N. [и др.]. Mortality From Ischemic Heart Disease: Analysis of Data From the World Health Organization and Coronary Artery Disease Risk

Factors From NCD Risk Factor Collaboration // *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2019. № 6 (12). C. e005375.

63. Ohayon J., Chadwick R. S. Effects of collagen microstructure on the mechanics of the left ventricle // *Biophysical Journal*. 1988. № 6 (54). C. 1077–1088.

64. Peyronnet R. [и др.]. Load-dependent effects of apelin on murine cardiomyocytes // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2017. (130). C. 333–343.

65. Prosser B. L., Ward C. W., Lederer W. J. X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart // *Science*. 2011. № 6048 (333). C. 1440–1445.

66. Radovits T. [и др.]. Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009. № 1 (297). C. H125–H133.

67. Sakhno K., Volzhaninov D., Balakin A. The development of the thermostat based on the small sized Peltier elements for maintaining the predefined temperature of a biological preparation Ekaterinburg, Russia:, 2022.C. 090020.

68. Sandler H., Dodge H. T. Left Ventricular Tension and Stress in Man // *Circulation Research*. 1963. № 2 (13). C. 91–104.

69. Sanz J. [и др.]. Anatomy, Function, and Dysfunction of the Right Ventricle // *Journal of the American College of Cardiology*. 2019. № 12 (73). C. 1463–1482.

70. Shepherd N., Vornanen M., Isenberg G. Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1990. № 2 (258). C. H452–H459.

71. Shiels H. A., White E. The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes // *Journal of Experimental Biology*. 2008. № 13 (211). C. 2005–2013.

72. Smail M. M. A. [и др.]. Regional effects of streptozotocin-induced diabetes on shortening and calcium transport in epicardial and endocardial myocytes from rat left ventricle // *Physiological Reports*. 2016. № 22 (4). С. e13034.
73. Smoluk A. [и др.]. Experimental study and modelling the evolution of viscoelastic hysteresis loop at different frequencies in myocardial tissue // *Acta of Bioengineering and Biomechanics*; 03/2017; ISSN 1509-409X. 2017.
74. Solovyova O. [и др.]. Mechano-electric heterogeneity of the myocardium as a paradigm of its function // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016. № 1–3 (120). С. 249–254.
75. Starc V., Yellin E. L., Nikolic S. D. Viscoelastic behavior of the isolated guinea pig left ventricle in diastole // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996. № 4 (271). С. H1314–H1324.
76. Suga H. Ventricular energetics // *Physiological Reviews*. 1990. № 2 (70). С. 247–277.
77. Sugiura S. [и др.]. Carbon fiber technique for the investigation of single-cell mechanics in intact cardiac myocytes // *Nature Protocols*. 2006. № 3 (1). С. 1453–1457.
78. Tarr M. [и др.]. Sarcomere length-resting tension relation in single frog atrial cardiac cells. // *Circulation Research*. 1979. № 4 (45). С. 554–559.
79. Tarr M., Trank J. W., Goertz K. K. Voltage-tension relations in single frog atrial cardiac cells. // *Circulation Research*. 1986. № 4 (59). С. 447–455.
80. Tung L., Morad M. Contractile force of single heart cells compared with muscle strips of frog ventricle // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1988. № 1 (255). С. H111–H120.

81. Volzhaninov D., Khokhlova A. Parallel Control of Two Digital Micromanipulators for Biomechanical Experiments Using LabVIEW Yekaterinburg, Russia: IEEE, 2019.С. 167–170.
82. Volzhaninov D., Khokhlova A. Biomechanical tests for studying contractility and viscoelastic properties of single cardiac muscle cells Ekaterinburg, Russia:, 2020.С. 080033.
83. White E. [и др.]. The effects of increasing cell length on auxotonic contractions; membrane potential and intracellular calcium transients in single guinea-pig ventricular myocytes // *Experimental Physiology*. 1993. № 1 (78). С. 65–78.
84. White E., Boyett M. R., Orchard C. H. The effects of mechanical loading and changes of length on single guinea-pig ventricular myocytes. // *The Journal of Physiology*. 1995. № 1 (482). С. 93–107.
85. Widya R. L. [и др.]. Right Ventricular Involvement in Diabetic Cardiomyopathy // *Diabetes Care*. 2013. № 2 (36). С. 457–462.
86. Wold L. E. [и др.]. Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of Ca²⁺ cycling proteins, NADPH oxidase, poly(ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyme // *Free Radical Biology and Medicine*. 2006. № 8 (40). С. 1419–1429.
87. Yasuda S. [и др.]. Unloaded shortening increases peak of Ca²⁺ transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003. № 2 (285). С. H470–H475.
88. Yasuda S.-I. [и др.]. A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001. № 3 (281). С. H1442–H1446.

89. Zhang X. [и др.]. Evaluation of a Novel Finite Element Model of Active Contraction in the Heart // *Frontiers in Physiology*. 2018. (9). С. 425.
90. uMp micromanipulator - support // *Ultraprecise Micromanipulator – Sensapex* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sensapex.com/support/ump-micromanipulator-support-2/> (дата обращения: 16.07.2023).
91. NV 40/3 – Precise Multi-Channel Analog Piezo Controller – Piezosystem [Электронный ресурс]. URL: <https://www.piezosystem.com/products/amplifiers/multi-channel/40ma-multi-channel-amplifiers/> (дата обращения: 17.07.2023).
92. Семейство плат АЦП / ЦАП на шину PCIeexpress | L-502 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.lcard.ru/products/boards/l-502> (дата обращения: 17.07.2023).