

Проводящие пути в культуре неонатальных кардиомиоцитов

А.А. Низамиева, М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, Н.Н. Кудряшова, К.И. Агладзе

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

В данной работе рассматривается вопрос о механизме формирования, в присутствии различного количества фибробластов, неонатальными кардиомиоцитами синцития, способного как к синхронному механическому сокращению, так и к электрическому проведению. Известным фактом является способность кардиомиоцитов генерировать потенциал действия в отличие от фибробластов и миофибробластов. В данной работе рассмотрена модель формирования в монослое цепи проводящих клеток, состоящая полностью из кардиомиоцитов.

Для компьютерного моделирования данной задачи применяется теория перколяции. В качестве классического примера, задача формулируется следующим образом: задается двумерная квадратная решетка из узлов и соединяющих их ребер, где с некоторой вероятностью p каждое ребро может быть удалено. Основной вопрос заключается в определении порога перколяции, то есть в количестве ребер, которые можно удалить так, чтобы все еще существовал путь, соединяющий два противоположных края решетки. В моделировании клеточной культуры эта задача формулируется следующим образом: каков должен быть процент кардиомиоцитов, чтобы сигнал, зарождающийся с одного края монослоя культуры сердечной ткани, прошел до противоположного края. Согласно теории и компьютерному моделированию проведения электрического сигнала в монослое сердечной ткани, для прохождения электрического сигнала по всему образцу необходимо как минимум 40% содержания кардиомиоцитов в монослое, состоящем из кардиомиоцитов и фибробластов.^[1]

Однако при работе с культурой установлено, что проведение возможно при 18% кардиомиоцитов, более того, при 30% кардиомиоцитов культура стабильно проводит электрический импульс (рис.1). Из данного факта можно вывести два предположения:

- 1) фибробласты способны к проведению электрического импульса. Данная гипотеза в работе не рассматривается.
- 2) Взаимное расположение кардиомиоцитов не является случайным (в задаче перколяции случайность удаления связей является необходимым условием), а существует некоторый механизм, в соответствии с которым кардиомиоциты самоорганизуются в проводящие пути — цепочки клеток, обладающие проводимостью.

Для подтверждения вышеупомянутого предположения культура неонатальных кардиомиоцитов с добавлением различной доли фибробластов исследовалась по следующему протоколу:

- 1) На монослое трехдневных кардиомиоцитов проводилось оптическое картирование^[2] с использованием красителя Fluo4, для выявления проведения электрического импульса вдоль всего образца.
- 2) Следующим шагом образец исследовался на наличие единого синхронного механического сокращения кардиомиоцитов посредством контрастной фазовой микроскопии.

- 3) Далее, методом конфокальной микроскопии ^[3] с использованием кальциевого красителя Fluo4 проверялось синхронное проведение электрического импульса соседствующими клетками кардиомиоцитов.
- 4) С использованием иммуноцитохимии образцы были покрашены на специфичный для кардиомиоцитов альфа-актинин; на ДНК (ядра, DAPI) и f-актин, присутствующие как в кардиомиоцитах, так и в фибробластах. Анализировалась структура монослоя. Количество клеток каждого типа считалось либо посредством конфокальной микроскопии, либо сортированием.

Посредством конфокальной микроскопии в совокупности с результатами остальных методов исследования монослоя сердечной ткани, экспериментально было показано, что во всех образцах, способных к проведению сигнала, существуют проводящие пути, что подтверждает гипотезу о наличии неслучайного механизма формирования сердечной ткани (рис. 2).

Выражаем благодарность А.В. Крашенинниковой, И.С. Ерофееву и В.Н. Качалову за неоценимый вклад в развитие данного проекта.

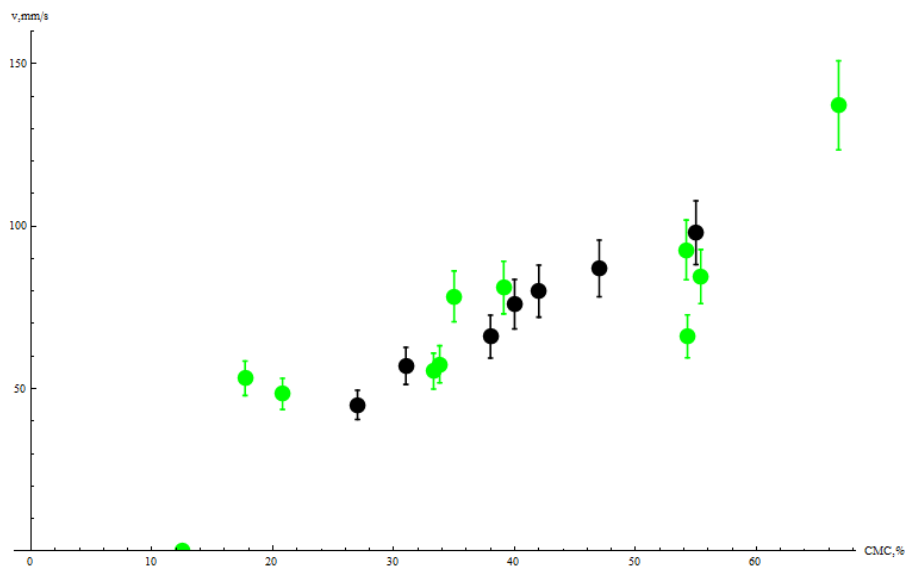


Рис. 1. Зависимость скорости проведения волны возбуждения от доли кардиомиоцитов в монослое сердечной ткани. Соотношение клеток измерялось: ● - на конфокальном микроскопе ● - методом сортирования.

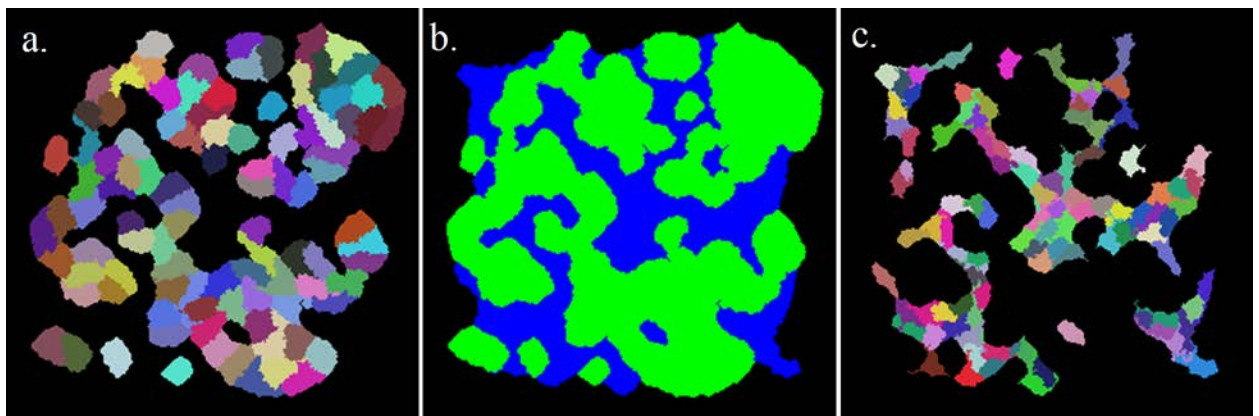


Рис. 2. Образование проводящих путей: а. клетки кардиомиоцитов; б. кластеризация кардиомиоцитов и фибробластов, формирование проводящих путей; с. клетки фибробластов.

Литература

1. *Alonso, S., [et. al]* Effective Medium Theory for Reaction Rates and Diffusion Coefficients of Heterogeneous Systems // Physical Review Letters. – 2009. – 102, 238302.
2. *Fast V.G., Darrow B.J., Saffitz J.E., and Kleber A.G.* Anisotropic Activation Spread in Heart Cell Monolayers Assessed by High-Resolution Optical Mapping // Circulation research. – 1996. – 79, 115-127
3. *Efimov I. R., Nikolski V.P., Salama G.* Optical imaging of the heart // Circulation research. – 2004. – 95. P. 21-33