

На правах рукописи

Агладзе Константин Игоревич

Экспериментальные модели для исследования волн реентри

03.02.01- биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Долгопрудный

2020

Работа прошла апробацию на кафедре физики живых систем федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

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

Защита состоится «23» декабря 2020 года в 12.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ03.01.02.012, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «24» августа 2020 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Волны возбуждения, или автоволны, играют большую роль в функционировании множества систем живой и неживой природы. Существует множество природных объектов, в которых они наблюдаются: колебательные химические реакции в активных средах (например, реакция Белоусова – Жаботинского), распространение импульсов возбуждения по нервным волокнам, волновая химическая сигнализация в колониях определенных микроорганизмов, волны распространяющейся депрессии в нервной ткани (в частности, сетчатке глаза), автоволны в сегнетоэлектрических и полупроводниковых пленках, популяционные волны и волны распространения эпидемий и генов и многие другие явления. Нервные импульсы, которые служат типичным примером волн возбуждения или автоволн в активной среде с восстановлением, были изучены еще в 1850 году Германом фон Гельмгольцем. Свойства нервных импульсов, характерные для простейших автоволновых решений (универсальная форма и амплитуда, не зависящие от начальных условий и аннигиляции при столкновениях), были установлены в 1920–1930-х годах XX века. Однако, наибольшее развитие наука о волнах возбуждения получила в приложении к исследованию электрических волн в сердце.

Дело в том, что правильное функционирование сердца, позволяющее ему эффективно выполнять свою насосную функцию, зависит от скоординированного сокращения отдельных элементов сердечной мышцы. Эта координация контролируется распространяющимися по миокарду электрическими волнами, запускающими сокращение. Нарушение правильного ритма сердца, или аритмия, как правило связана с нарушением распространения волны возбуждения. Наиболее опасными аритмиями являются тахикардии, проявляющиеся в физиологически неоправданном учащенном сокращении сердца и часто приводящие к фибрилляции желудочков, которые в этом случае перестают нагнетать кровь. Широко известно, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) одной из основных медицинских проблем в большинстве стран современного мира. В частности, каждый год от ССЗ в Европе умирают 4 млн человек, из которых 1 млн приходится на Россию. Сердечно-сосудистые заболевания все еще остаются первой по статистике причиной смертей в России — 46% граждан погибают именно от них.

В нарушении ритма сердца важнейшую роль играет появление паразитных источников возбуждения, дезорганизующих его работу. Одним из наиболее распространенных источников такого рода является волна реентри: циркуляция волны возбуждения, перехватывающая у синусового узла контроль над ритмическим сокращением сердца. Появление нескольких волн реентри приводит к автономному, не синхронизованному сокращению различных частей сердца. В предельном случае максимального размножения источников реентри возникает фибрилляция сердца. Отсюда

становится понятным, что для успешной борьбы с тахикардиями наиболее важно знать:

- механизмы возникновения волн реентри;
- способы их подавления.

Разработке этой темы было посвящено множество теоретических и экспериментальных работ, значительная часть которых отражена в приведенной библиографии. К сожалению, поскольку динамика волн возбуждения в сердце сильно нелинейна, создание адекватной теории для их количественного описания оказалось по сию пору невозможным. Поиск решений уравнений, описывающих сердечную ткань, основывается на методах компьютерного моделирования, продвигаясь по мере совершенствования вычислительной техники. В пору несовершенства компьютеров, большая часть результатов, описывающих поведение волн возбуждения и, в частности, вращающихся волн, была получена с помощью модельных сред, из которых главную роль сыграла химическая активная среда на основе реакции Белоусова - Жаботинского. Аналогично, 4-5 десятилетий назад инструментарий электрофизиолога, изучающего функционирование сердца, был с современной точки зрения крайне скуден и едва ли позволял проводить измерение простейших характеристик волны возбуждения, таких как скорость распространения и рефрактерность. Даже исчерпывающее доказательство существования вращающихся волн возбуждения, анатомически не привязанных к особому пути, было получено только после появления методов оптического картирования возбуждения в 90-е годы прошлого века. Таким образом, экспериментальная работа по изучению фундаментальных характеристик волн реентри первоначально опиралась на модельные среды, главным образом, представленные слоями реакции Белоусова - Жаботинского. Эта логика отражена в представленной диссертации: каждый раздел главы "Результаты" начинается с описания данных, полученных на химической активной среде.

С развитием двух независимых методов исследования: культуры сердечной ткани и оптического картирования волн возбуждения, базирующегося на применении флуоресцентных маркеров возбуждения, стало возможным приблизить экспериментальную модель к настоящей сердечной ткани. В особенности, такие модели сделало актуальными развитие в последнее десятилетие методов тканевой инженерии сердца и клеточного репрограммирования.

Создание тканевоинженерных конструкций, позволяющих исследовать фундаментальные механизмы образования и гибели волн реентри было одной из основных задач представленного исследования. Для понимания механизмов, лежащих в основе нормальной и патологической активности сердца человека, требуются сравнительные исследования электрофизиологии и возбуждения-сокращения в различных

областях сердца, как в нормальных, так и в патофизиологических ситуациях. Традиционно для этого используются животные модели, в том числе и культуры неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крысы. Поскольку электрофизиологические характеристики крысиного и человеческого сердца различаются, необходима разработка экспериментальных моделей, базирующихся на человеческих кардиомиоцитах.

В последние годы эта задача решается двумя принципиально различными путями. Первый путь — это получение препаратов человеческого сердца из сердец, замещенных или отвергнутых при трансплантации. Нетрудно видеть, что источник такого типа препаратов имеет случайный характер, а препараты получаются из сердец, как правило, находящихся в состоянии глубокой патологии. Второй путь — это создание препаратов сердечной ткани методами тканевой инженерии путем использования кардиомиоцитов, дифференцирующихся из стволовых клеток человека. Благодаря открытию Shinya Yamanaka клеточного репрограммирования стало возможным трансформировать специализированные тканевые клетки в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), за что Yamanaka была присуждена Нобелевская премия 2012 г. Этот метод также не лишен недостатков, т.к. полученные тканево-инженерные конструкции не являются полным аналогом нативной сердечной ткани. Однако, он быстро развивается, в частности, в представленной работе были получены принципиальные результаты по контролю архитектуры выращиваемой сердечной ткани с помощью полимерных нановолокон.

Таким образом, в исследовании прослеживается следующая логика: обнаружение эффекта на модельной химической активной среде - подтверждение на компьютерной модели - верификация и дальнейшее исследование особенностей поведения волн реентри на тканево-инженерных конструкциях, в том числе, полученных методом клеточного репрограммирования.

Цели и задачи исследования

Основными целями продолжающегося исследования были:

1. Определение наиболее общих механизмов спонтанного возникновения волн реентри в активной среде, в частности, в сердечной ткани. В том числе, с целью противодействия им.
2. Определение наиболее общих механизмов подавления (терминации) волн реентри имеющих потенциал практического использования.

Основными задачами, решаемыми в исследовании, были:

1. Совершенствование техники работы с химической активной средой на основе Белоусова - Жаботинского, позволяющее использовать ее в качестве модельной системы для изучения поведения спиральных волн (волн реентри).

2. Воспроизводимое получение различных типов волн реентри, таких как многорукавные спиральные волны и трехмерные свитки, а также исследование особенности их динамики.

3. Создание тканево-инженерных конструкций из кардиомиоцитов, пригодных как для исследования волн возбуждения в сердечной ткани, так и для целей регенеративной медицины.

4. Исследование роли границы и геометрии участка среды в распространении волны возбуждения и образования реентри. Применение полученных данных для разработки теста на аритмогенность.

5. Исследование влияния параметров (возбудимости) среды на динамику реентри, в том числе в нестационарных системах, с изменяющимися от времени параметрами. В том числе, исследование процессов столкновения и коллапса разнонаправленных спиральных волн и процессов образования и терминции реентри при изменении возбудимости среды.

6. Исследование распространения возбуждения в анизотропных средах, имитирующих распространение возбуждения вдоль и поперек сердечных волокон.

7. Исследование способов терминции волны реентри, в том числе базирующихся на вынужденном дрейфе спиральных волн.

Научная новизна работы

В ходе выполнения представляемого цикла исследований был получен ряд приоритетных результатов, опубликованных в ведущих международных высокорейтинговых изданиях, в частности, три публикации в Nature и одна в Science. Ряд фундаментальных свойств волн реентри в возбудимых средах был получен на модельных средах на основе реакции БЖ, а затем подтвержден в экспериментах с тканево-инженерными конструкциями. К ним, в частности, относятся вынужденный дрейф спиральных волн под воздействием синхронизирующего источника и образование реентри на препятствии, имеющем высокую локальную кривизну (острый угол).

В тканевой инженерии сердца были впервые получены волны реентри на слоях человеческих сердечных клеток и показана возможность их использования для сравнения

эффективности антиаритмиков. Впервые было показано, что полимерные нановолокна задают направление роста и развития сердечных клеток и могут быть использованы для контроля архитектуры выращиваемой сердечной ткани.

Научно-практическая значимость

Результаты, полученные в ходе выполнения исследования имеют несомненную практическую ценность. Так, обнаружение и исследование вынужденного дрейфа спиральных волн закладывает механистическую базу под разработку методов низковольтной дефибрилляции, а обнаруженный механизм образования волн реентри на острых углах невозбужденного препятствия дал возможность разработать универсальный тест на аритмогенность на основе слоев человеческих сердечных клеток. Контроль архитектуры культивируемой ткани с помощью нановолокон заложил основы нового направления тканевой инженерии сердца.

Публикации

Результаты цикла исследований опубликованы в 50 статьях в журналах, входящих в базу данных Web of Science. Список публикаций по теме диссертации приведен перед общей библиографией.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, трех разделов основного текста, заключения и списка цитируемой литературы. Работа содержит 270 страниц, 142 рисунка. Библиография включает 314 наименований.

Содержание работы

В разделе 1 дано вводное описание актуальности, проблематики и методологии работы.

В разделе 2 проводится анализ литературных данных, посвящённых экспериментальным моделям, используемым для исследования волн реентри: химической активной среды, сердца и сердечной ткани.

В разделе 3 описываются основные методики, использованные в работе, приводятся протоколы приготовления образцов и проведения экспериментов.

Раздел 4 состоит из шести подразделов, в нем подробное описание полученных результатов работы. А именно:

- полученные в ходе работы типы волн реентри, такие, как многорукавные спиральные волны, коллапсирующие трехмерные реентри;

- полученные в ходе работы тканево-инженерные модели возбудимой среды;
- полученные данные о роли границы и геометрии участка среды в распространении волны возбуждения и образования волн реентри;
- данные о влиянии параметров (возбудимости) среды на динамику реентри;
- распространение возбуждения в анизотропных средах;
- способы терминации волны реентри.

В заключении даётся перечень результатов и обсуждаются возможные пути их практического применения.

Основные результаты работы

Сложность построения аналитического описания сильно нелинейных возбудимых сред и, в частности, вращающихся волн в них, привела к тому, что главную роль в анализе процессов генерации и распространения возбуждения стало играть моделирование. Разумеется, в первую очередь, это компьютерное моделирование. Однако в то время, когда началось активное исследование волн реентри, возможности компьютеров были технически сильно ограничены, расчет относительно простых задач (уравнения Фитцхью - Нагумо на сетке 8×8 занимал много дорогостоящего вычислительного времени. Выходом стало использование модельных сред, в первую очередь, на основе реакции Белоусова - Жаботинского (БЖ). Действительно, и уравнения, описывающие распространение возбуждения в сердечной и нервной ткани, как и распространение концентрационной волны в реакции БЖ относятся к одному классу уравнений реакции-диффузии. Доступность и относительная легкость наблюдения и регистрации волн в реакции БЖ привела к тому, что волновая среда на ее основе стала рассматриваться как своего рода "аналоговый компьютер", и акцент с феноменологического описания волновых структур в ней был перенесен на моделирование с ее помощью различных автоволновых режимов. С помощью химической активной среды удалось исследовать различные типы вращающихся волн в двумерной и трехмерной средах, различные типы дрейфа спиральных волн, процессы зарождения и гибели реентри-волн. Позднее, многие обнаруженные феномены были исследованы на моделях, максимально приближенных к настоящему сердцу - на тканево-инженерных моделях сердечной ткани. Таким образом, логика описания исследованных в данной работе явлений часто требует сначала изложения результатов, полученных с помощью реакции БЖ, а затем - с помощью культивируемых лоскутов сердечной ткани.

Наблюдаемые типы реентри

Многорукавные спиральные волны

В относительно небольшом разделе, посвященном наблюдаемым типам реентри приведены наиболее значимые результаты, полученные автором при разработке модельной возбудимой среды на основе химической активной среды. Так, впервые были получены многорукавные спиральные волны и изучена их стабильность. К началу исследования, однорукавные спиральные волны были известны уже около 10 лет. Вращающиеся структуры более высокого порядка симметрии, такие многорукавные вихри, теоретически не были запрещены, но не наблюдались экспериментально. В нашей работе были получены двух-, трех- и четырехрукавные вращающиеся спиральные вихри в активной химической среде. Эти структуры были достаточно стабильными, наблюдалось их вращение в течение более получаса (т.е. наблюдали около 100 вращений), что резко контрастировало с нестабильными множественными вихрями, теоретически предсказанными для многих других физических систем (таких как сверхтекучий гелий или сверхпроводники).

Многорукавные вихри были получены следующим образом. Волновая картина приводилась к конфигурации, когда несколько волн циркулировали вокруг невозбудимого препятствия. Затем размер препятствия уменьшался до полного его исчезновения. Полученные структуры показаны на рис. 1.

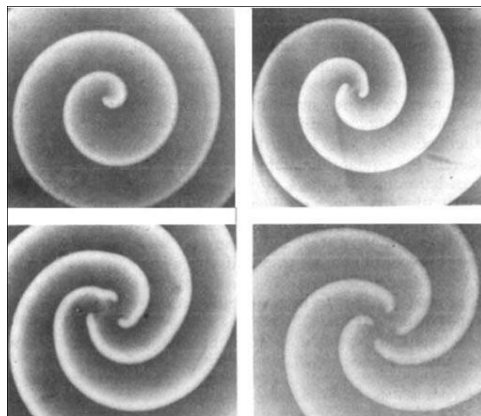


Рисунок 1. Одно-, двух-, трех- и четырехрукавные вихри в активной химической среде.

Несмотря на то, что структуры оказались довольно устойчивыми, удавалось наблюдать распад вихрей. Распад обычно наблюдался через 50-60 мин после смешивания реагентов. По-видимому, процесс распада был вызван изменением параметров активной среды со временем. Двухрукавные вихри почти всегда разрушались после 60 мин реакции. Распад трехрукавного вихря наблюдался только в одном из семи экспериментов, однако ни в одном из десяти проведенных экспериментов не наблюдалось распада четырехрукавного вихря. В то же время все типы вихрей были совершенно устойчивы к внешним воздействиям и возмущениям. Повышение температуры на 15 ° С привело к уменьшению длины волны и периода, но никаких признаков распада многорукавных вихрей не наблюдалось. В экспериментах, где многорукавный вихрь был смещен высокочастотными волнами возбуждения, структура как ядра, так и внешней области вихря была радикально изменена. Но в каждом эксперименте вихрь восстанавливался при отключении внешнего источника высокочастотных волн.

Полученные результаты были опубликованы в:

- K.I. Agladze, V.I. Krinsky "Multi-armed Vortices in an Active Chemical Medium", Nature, 1982, v. 296, 424-426.
- Кринский В.И., Агладзе К.И. "Вихри с топологическим зарядом 2, 3 и 4 в химической активной среде", Докл. АН СССР, 1982, т. 263, стр. 335-337.

Трехмерные вращающиеся волны

Трехмерные автоволны были обнаружены в реакции БЖ еще в 1973 году А. Winfree. Динамика трехмерных вихревых колец, являющихся обобщением двумерных волн реентри в возбудимых средах была широко изучена в численных экспериментах. Используя модель Фитцхью-Нагумо

А.В. Панфилов и А.М. Перцов обнаружили такие динамические свойства вихревых колец, как их самопроизвольный дрейф вдоль оси тора, сжатие и коллапс а также расширение. В проведенных автором экспериментах был экспериментально изучен вопрос воспроизводимости предсказанных эффектов и обнаружен коллапс коллапс вихревых колец самой различной конфигурации, в том числе, имеющих спиральную форму нити, получаемую при "самодостройке" двумерной спиральной волны в трехмерном пространстве. Однако, спонтанный дрейф вихревых колец экспериментально подтвержден не был. Дальнейший теоретический и компьютерный анализ, выполненный А.

Панфиловым, показал, что для адекватного описания поведения вихревых колец необходимо рассмотрение не только быстрой, но и медленной переменной системы Фитцхью-Нагумо. Оказалось, что при равных коэффициентах диффузии должен наблюдаться только коллапс вихревого кольца, как и было показано в экспериментах.

- K.I. Agladze, V.I. Krinsky, A.V. Panfilov, H. Linde, L. Kuhnert "Three-Dimensional Vortex with a Spiral Filament in a Chemically Active Medium" Physica D, v. 39, pp 38-42, 1989.

- K.I. Agladze, R.A. Kocharyan, V.I. Krinsky "Direct observation of vortex ring collapse in a chemically active medium", Physica D, v. 49, pp. 1-4, 1991.

Тканево-инженерные модели возбудимой среды

Тканево-инженерные модели разрабатываются с целью исследования различных режимов распространения волн возбуждения, в частности, поведения волн реентри. Необходимо уметь задавать геометрию среды, динамически управлять ее параметрами, задавать локальную архитектуру расположения и развития кардиомиоцитов, использовать сердечные клетки разного происхождения.

Простые физико-химические методы создания структурированной сердечной ткани

С помощью внесения в среду невозбудимых препятствий удалось исследовать зависящее от кривизны распространение волн и отрыв волн от острых углов. Образование разрывов волн из-за чрезмерной локальной кривизны волн и возникающего в результате возникновения спиральной волны было продемонстрировано в компьютерном моделировании и экспериментах с реакцией Белоусова Жаботинского. В данной работе представлены экспериментальные доказательства того, что разрывы волн в сердечной ткани также могут возникать из-за высокой локальной кривизны волновых фронтов. Аналогично, согласно результатам, описанным Pertsov et al., 1996, сильно изогнутые сегменты волнового фронта возникают, когда распространяющиеся волны взаимодействуют с конкретными структурными дефектами и распространяются вокруг невозбудимых препятствий с острыми углами. Однако, высокая частота волнового цуга не является необходимым условием: разрывы волн появляются на частотах до 0,2 Гц или даже для одиночных распространяющихся волн, если возбудимость ткани снижается за счет применения гептанола. Мы изучали влияние препятствий различной формы на распространение волн. На рис. 3 показаны волны, отрывающиеся от препятствия в слоях кардиомиоцитов.

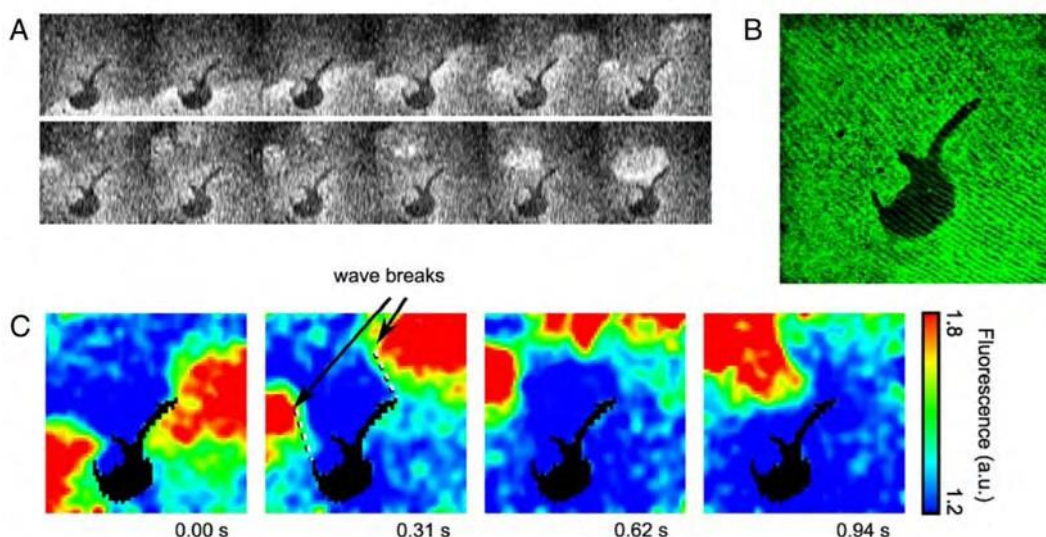


Рисунок 2. Отрыв волн от препятствий с острыми чертами.

(А) Последовательность необработанных изображений, снятых с интервалом 0,13 с. Последовательные позиции волнового фронта. (В) Высокое разрешение (512 X 512 пикселей) изображения препятствия. (С) Формирование волновых разрывов показано в псевдоцвете. Необработанные данные получены с помощью конфокального микроскопа LSM-510. Размер поля зрения 2,2 мм X 2,2 мм. Кадры из фильма были обработаны для уменьшения шума.

С помощью препятствий из силиконовой смазки и/или тонких разрезов в культуре удалось также оценить характерные минимальные размеры проницаемого для волны створа ("гейта"). Что позволило измерить критический размер сегмента волны возбуждения, способного распространяться и определить критический радиус кривизны фронта. Оказалось, что невозможность распространения через узкий створ наблюдается только при достаточной частоте следования цуга волн, а одиночная волна в неингибированной культуре проходит всегда. Этот вывод был подтвержден компьютерной симуляцией с использованием модели Luo - Rudy.

- Magome N., Agladze K. "Patterning and excitability control in cardiomyocyte tissue culture" PHYSICA D, 2010, 239(16) 1560-1566

- Kadota, S, Kay, MW, Magome, N, Agladze, K "Curvature-Dependent Excitation Propagation in Cultured Cardiac Tissue." JETP Letters, vol. 94, issue 11, p. 824-830, 2012.

Управление возбудимостью ткани с помощью света

Желаемая геометрия культуры ткани, в принципе, может быть достигнута путем нанесения рисунка или хирургического удаления ненужных клеток. Однако полученная геометрия является статической и не может быть легко изменена в ходе эксперимента. В

нашей работе мы изучили возможность создания динамических сетей клеток, с топологией и локальными функциональными свойствами, которые можно изменять в режиме «реального времени» с помощью фотопереклюателей. В частности, мы сфокусировались на производных азобензола, которые, как показало наше подробное исследование модулируют потенциал-зависимые ионные каналы в зависимости от фотоизомеризации. Мы продемонстрировали, что монослой неонатальных кардиомиоцитов, обработанных азобензолтриметиламмонийбромидом (AzoTAB) могут стать невозбудимыми при освещении светом 440 нм и могут полностью восстановить свою возбудимость, когда длина волны освещения переключается на 350 нм. Используя одновременное освещение на двух длинах волн с правильно подобранными интенсивностями, можно контролировать скорость распространения потенциалов действия (AP) и спонтанную электрическую активность кардиомиоцитов. Используя структурированное освещение, оказалось возможным динамически структурировать возбудимую сеть, направляя волны возбуждения по определенному пути и создавая пейсмекеры в желаемых местах.

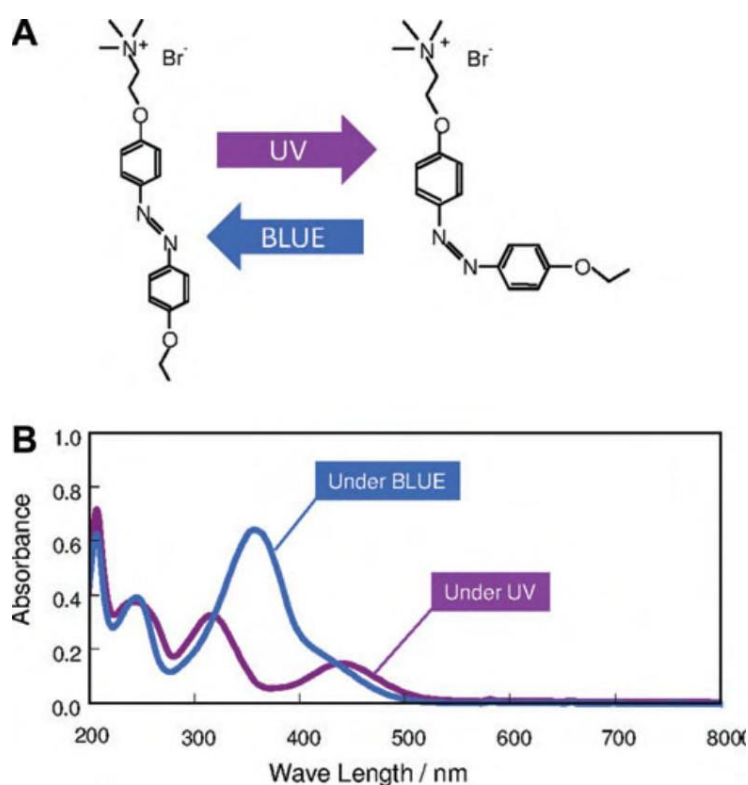


Рисунок 3. Фотоизомеризация AzoTAB.

(А) Схематическая иллюстрация изомеризации AzoTAB: транс- (слева) и цис- (справа) изомеры AzoTAB. (В) Спектр поглощения 0,05 мМ AzoTAB в растворе Тироде. АзоТАБ, азобензол триметиламмоний бромид.

AzoTAB имеет две изоформы, которые схематически показано на рисунке 3А. Спектр поглощения трансизомера (синяя линия) имеет ярко выраженный пик при 365 нм (Рис. 3В). Облучение этого изомера на длине волны поглощения вызывает переход в цис-конформацию, которая характеризуется спектром, показанным фиолетовым цветом (рис. 3В). Спектр цис-изомера имеет дополнительный пик около 450 нм. Освещение на этой длине волны вызывает цис-транс изомеризация. Транс-изомерная конформация энергетически более стабильна, чем цис-изомер, и цис-изомер самопроизвольно возвращается к транс-конформации в отсутствие ультрафиолетового освещения.

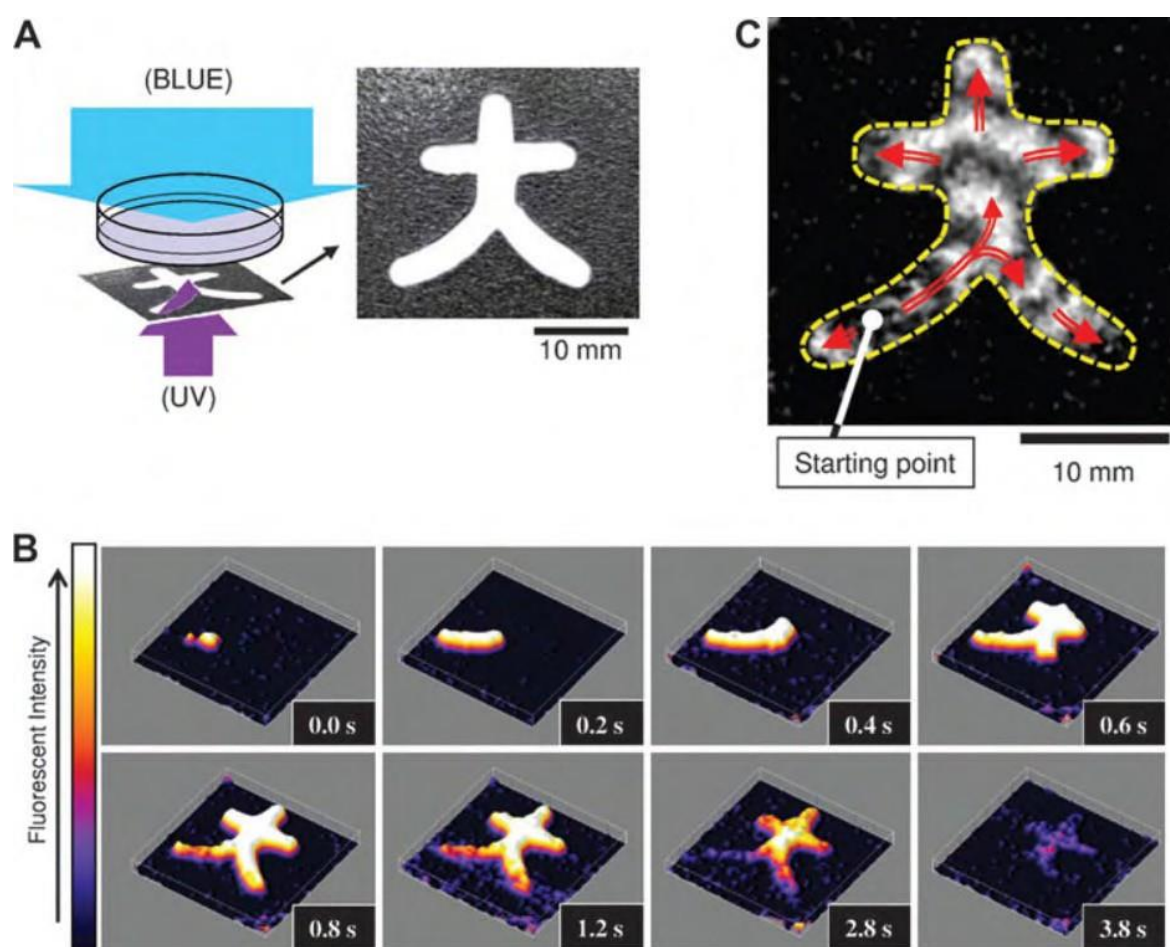


Рисунок 4. Фотоуправляемый путь распространения волн в культуре тканей кардиомиоцитов.
 А) Схематическое изображение «частичного возбуждения» с помощью затенения УФ-света. Синее и ультрафиолетовое освещение проводилось сверху и снизу, соответственно. (В) Распространение волны спонтанного возбуждения в области УФ-освещения. Возбужденная область показана псевдоцветом в зависимости от интенсивности флуоресценции. Время от старта волны указано на рисунках. (С) Эта панель показывает перекрывающееся изображение положения фронта волны, показанного на рисунке В. Красные стрелки указывают направление распространения. [AzoTAB] = 0,7 мМ.

На рисунке 4 показан эксперимент, в котором ультрафиолетовое освещение было

структурировано в форме символа кандзи «дай», что означает «большой» или «великий» (это первая часть японского слова «дайгаку» или «университет»). Проецирование этого паттерна на сплошной монослой сердечных миоцитов приводит к появлению возбудимой сети, имеющей форму характера dai (остальная часть монослоя осталась невозбужденной). Возбуждение возникло в нижнем левом углу и постепенно заполняло остальную часть возбудимого домена (красные стрелки указывают направление распространения), что выявило общую форму домена.

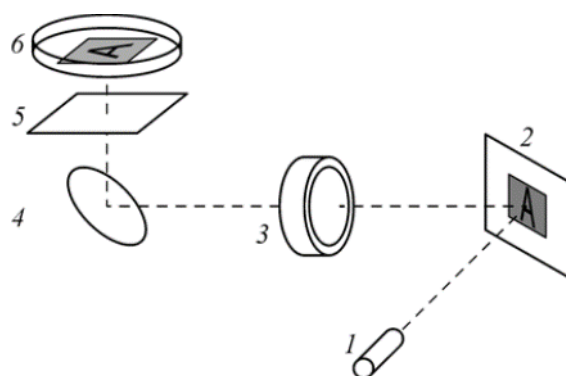


Рисунок 5. Схема установки: 1 - ультрафиолетовый диод, 2 - матрица DMD проектора, 3 - фокусирующая линза, 4 - зеркало, 5 - режущий фильтр видимого света, 6 - чашка Петри с культурой. Культуру наблюдали сверху.

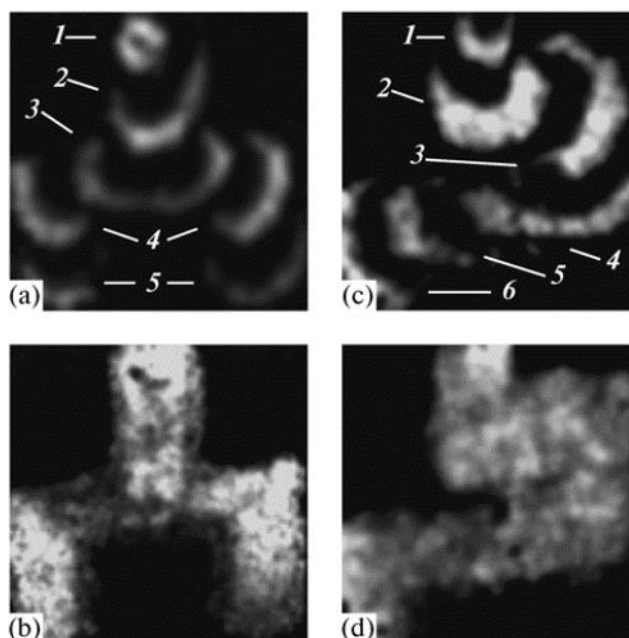


Рисунок 6. Примеры проецируемых путей. (a), (c) Последовательности волновых фронтов, (b), (d) Полученные пути (проекция всех фронтов). Интервал между последовательными фронтами составляет 0,32 с для кадра (a) и 0,20 с для кадра (c).

Для моделирования различных проводящих путей использовалась также проекционная система, управляемая компьютером, рис. 5. Она позволила нам сохранить соотношение интенсивности между областями, подверженными воздействию ультрафиолета, до 10: 1, что было достаточно для почти полного восстановления возбуждения в области, подверженной воздействию ультрафиолета, сохраняя при этом полное подавление возбуждения в частях, освещаемых только синим светом. Рисунок 6 иллюстрирует различные пути в культуре ткани, созданной проекцией УФ на слой кардиомиоцитов: рис. 6а, 6б - Y-образная, или «вилка», рис. 6с, 6д - S-образный путь. Края дорожек были слегка размытыми с характерным переходом между возбудимой и не возбудимой областями около 1 мм. Кроме проводящих путей возможно было получение различных типов «реентри»: распространение по кругу, спиральные волны.

С помощью фотоконтроля исследовали процесс возмущения стабильно вращающейся спиральной волны, уменьшая возбудимость системы со временем. Эта процедура напрямую связана с проблемой прекращения стабильного (функционального) реентри в сердце. Считается, что стабильно вращающиеся спиральные волны в сердечной ткани являются так называемыми «закрепленными» волнами, где неоднородность в ядре стабилизирует спиральную волну, в то время как незакрепленные, свободно вращающиеся волны либо являются по сути нестабильными, либо могут мигрировать или дрейфовать в естественно неоднородной сердечной ткани. Недавно было показано, что дестабилизацию и прекращение закрепленных волн можно осуществить, применяя внешнюю стимуляцию, либо с высокой частотой стимуляции, либо с точной подачей стимулирующего импульса. Наши данные показали, что снижение возбудимости в ткани может также привести к дестабилизации спиральной волны и легко приводит к ее прекращению.

- Magome N., Agladze K. "Patterning and excitability control in cardiomyocyte tissue culture" PHYSICA D, 2010, 239(16) 1560-1566.

- Magome N, Kanaporis G, Moisan N, Tanaka K, Agladze K. "Photo-Control of Excitation Waves in Cardiomyocyte Tissue Culture." Tissue Eng Part A. Volume: 17 Issue: 21-22 Pages: 2703-2711 DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0745 Published: NOV 2011.

- Erofeev, IS, Magome, N, Agladze, KI "Digital photo-control of the network of live excitable cells." JETP Letters, vol. 94, issue 6, p. 477-480, 2011.

- Erofeev IS, Agladze KI. Formation of virtual isthmus: new scenario of spiral wave death after decrease of excitability. JETP Lett. 2015; 102(10): 780-784.

- SR Frolova, O Gaiko, VA Tsvelaya, OY Pimenov, KI Agladze “Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes” PLOS ONE (2016) 11 (3), e0152018.

Структурирование выращиваемой сердечной ткани с помощью полимерных волокон

Конфлюэнтные культивируемые монослои кардиомиоцитов являются эффективным инструментом для изучения фундаментальных свойств возбудимых клеточных сетей, и они обеспечивают подход к регенеративной медицине. Следующий шаг в направлении имитации естественной сложности сердечной мышцы был сделан путем культивирования упорядоченных монослоев анизотропных клеток. Выравнивание клеток обеспечивается путем микроабразии или микропрорезания субстрата, микропаттернинга с точно упорядоченными фибронектиновыми линиями или с помощью коллагена, натертого кистью. Таким образом, упорядоченная структура сердечных монослоев определяется топографическими особенностями твердого субстрата, на котором растут клетки. Однако для восстановления сократительной способности поврежденной сердечной мышцы имплантируемые тканевые конструкции должны обладать достаточной сократительной силой и механической прочностью. Очевидно, что монослои кардиомиоцитов на основе твердого субстрата не полностью удовлетворяют этим требованиям. Ожидается, что при встраивании в трехмерную (3D) среду клетки будут образовывать высокоупорядоченные структуры, которые имеют межклеточные контакты и внеклеточный матрикс (ECM). В инженерных тканях роль ECM поручается системе скаффолдов, которая должна соответствовать определенным требованиям. Как минимум, они должны обладать биосовместимостью, способностью к биологическому разложению, устойчивыми механическими свойствами, структурой, соответствующей масштабу экстраклеточного матрикса, и для сердечной ткани должны позволять клеткам выполнять свою сократительную функцию. Полимеры (как природные, так и синтетические) представляют собой самый большой класс биоматериалов, используемых сегодня для приготовления каркасов в геле или в твердом состоянии. Наиболее часто используемые синтетические биоразлагаемые полимеры для инженерии сердечной ткани — это полиуретан, полиэтиленкапролактон (PCL), полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA) и их сополимеры. Среди природных полимеров наиболее распространенными являются коллаген, эластин, желатин, фибриноген, фиброин шелка, альгинаты.

Дальнейший прогресс в разработке имплантируемых сердечных заменителей и изучении сердечного возбуждения требует культивирования тканей с более сложными структурами, включая контролируемое выравнивание клеток, которое обеспечивает волокнообразные элементы, распространяющиеся в трехмерное пространство. Мы разработали систему *in vitro* для конструирования сердечной ткани с контролируемой анизотропией путем выращивания клеток на сетке, состоящей из полимерных нановолокон. Сетка представляет собой слой нановолокна полученного электроспиннингом (электроформованием), либо отпечатанный на покровном стекле, либо подвешенный в пространстве на держателе из полидиметилсилоксана (PDMS). Электроспиннинг позволяет манипулировать рядом параметров, определяющих конфигурацию сетки, в частности ориентацию волокна (например, случайное или выровненное), плотность позиционирования волокна (то есть количество собранных волокон на мм) и длину волокна. Подвешенные нановолокна без субстрата обеспечивают достаточную поддержку прикрепляющимся и растущим клеткам, которые образуют возбудимую сеть со структурой, напоминающей ажурную ткань, рис. 7.

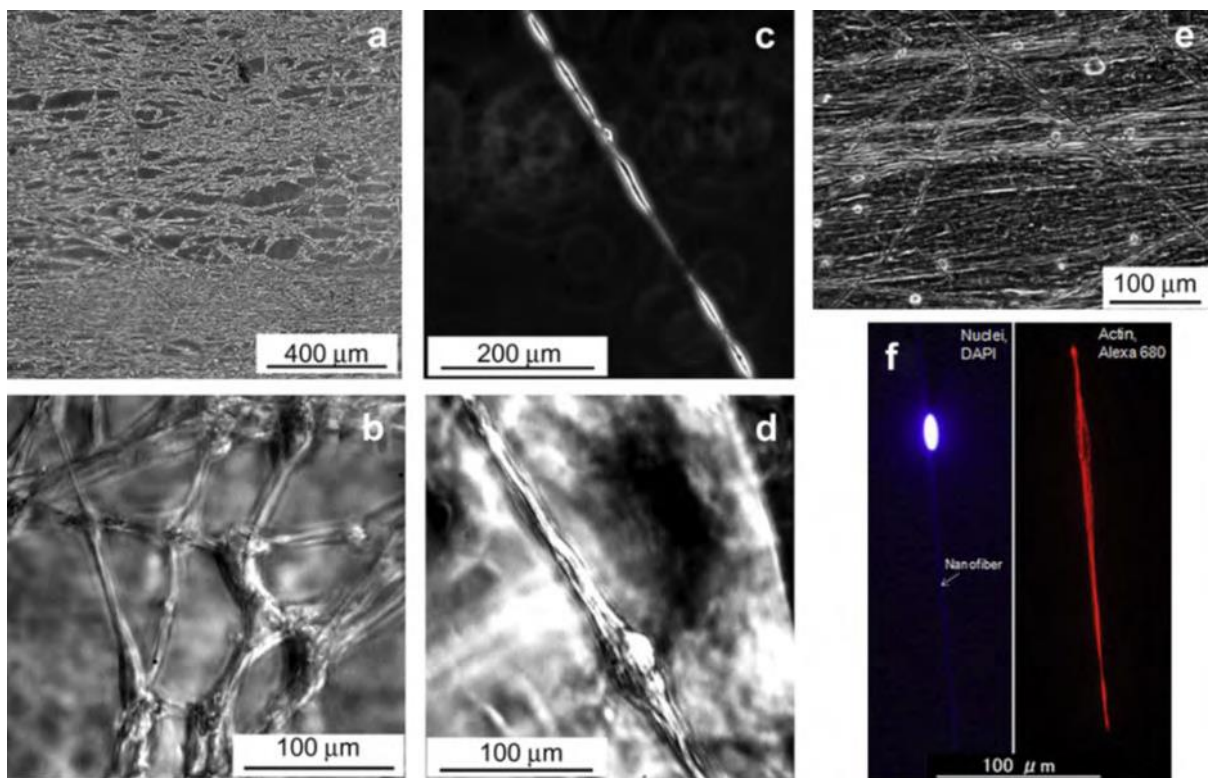


Рисунок 7. Сердечная ткань, выращенная на висячих нановолокнах PMGI, натянутых поперек щели на блоке PDMS: ткань сердца, выращенная на случайных (а, б) или выровненных (с,е) нановолокнах; одно нановолокно PMGI, способное нести несколько клеток (с) или одну клетку (д); (f) флуоресцентное окрашивание отдельной клетки, растущей вдоль нановолокна.

В отношении материалов, в данной работе была исследована способность рекомбинантного спидроина служить субстратом для выращиваемой сердечной ткани. С этой целью кардиомиоциты новорожденных крыс высевали на матрицы из спидроинового полимерного волокна и культивировали для образования плотных сердечных монослоев. Помимо анализа адгезии и иммуногистохимического анализа, мы проверили способность культивируемых кардиомиоцитов формировать функциональный синцитий сердца, изучая распространение возбуждения в культивируемой ткани с помощью оптического картирования. Было продемонстрировано, что сетки спидроиновых волокон непосредственно подходят для адгезии и роста кардиомиоцитов без дополнительного покрытия факторами прикрепления, такими как фибронектин, рисунок 8.

Рекомбинантный спидроин был предоставлен коллегами из Государственного научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов и методика его получения описана в нашей совместной статье в Plos One (в списке публикаций к разделу).

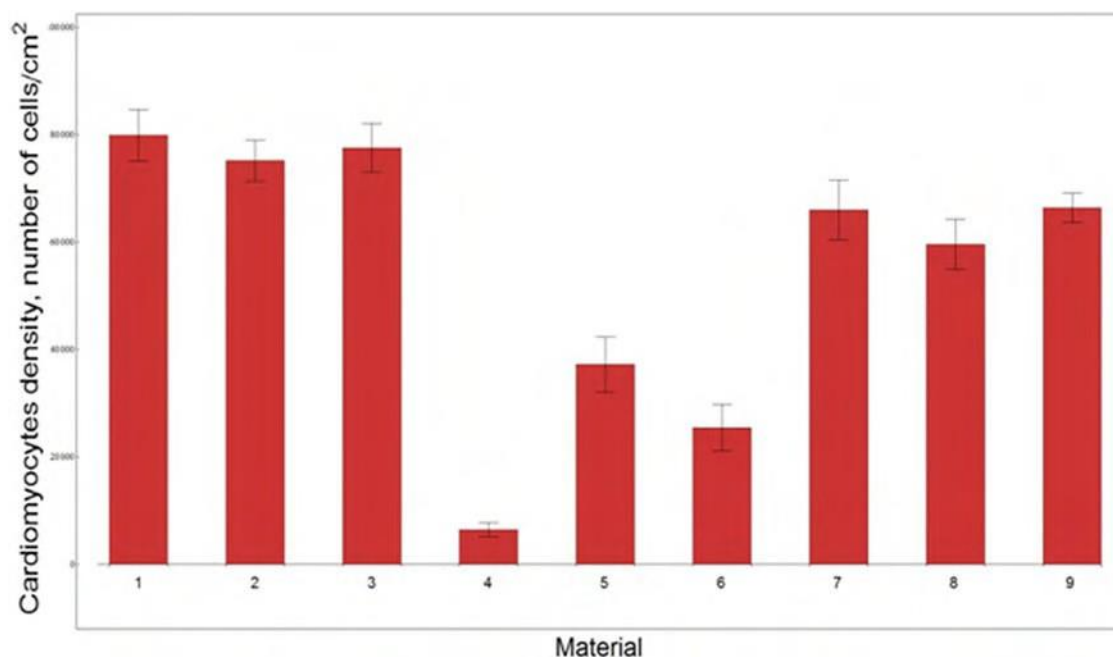


Рисунок 8. Количественный анализ адгезии обычных субстратов, покрытых фибронектином, и полимерных субстратов шелка. 1-фибронектин, 2-PCL, покрытый фибронектином (толщина 0,3 мкм), 3-фиброин Bombyx mori, покрытый фибронектином (толщина 0,25 мкм), 4-фиброин Bombyx mori (толщина 0,25 мкм), 5-rS1 / 9 (толщина 0,4 мкм), 6-rS2 / 12 (толщина 0,4 мкм), 7-rS2 / 12- линкер-RGDS (толщина 0,35 мкм), 8-rS2 / 12-линкер-RGDS (толщина 0,25 мкм), 9-rS1 / 9 + rS2 / 12- Linker-RGDS 1: 1 (толщина 0,6 мкм)

Основная функция сердечной ткани - перекачивание крови посредством согласованного сокращения мышечных волокон. Координация достигается распространяющимися

волнами возбуждения, вызывающими сокращение на уровне клеток. Таким образом, для сконструированной сердечной ткани оба процесса, сокращение и распространение возбуждения одинаково важны, и оба были проверены в наших экспериментах. Культуры в возрасте 3–5 дней наблюдали с помощью фазово-контрастного микроскопа и подтверждали как плотные сердечные монослои. На этой стадии развития они обычно проявляли спонтанную сократительную активность, которая служила первым показателем выращенной объединенной сердечной ткани. Записанные видео синхронного сокращения в монослой сердечной клетки, выращенной на фиброзной сетке rS2/12-Linker-RGDS, анализировались на рис. 9. В процессе сжатия интенсивность пикселей в видео изменяется со временем, а значения интенсивности строятся во времени для разных участков образца (рис. 9). Зарегистрированные пики интенсивности соответствуют моменту сокращения клеток.

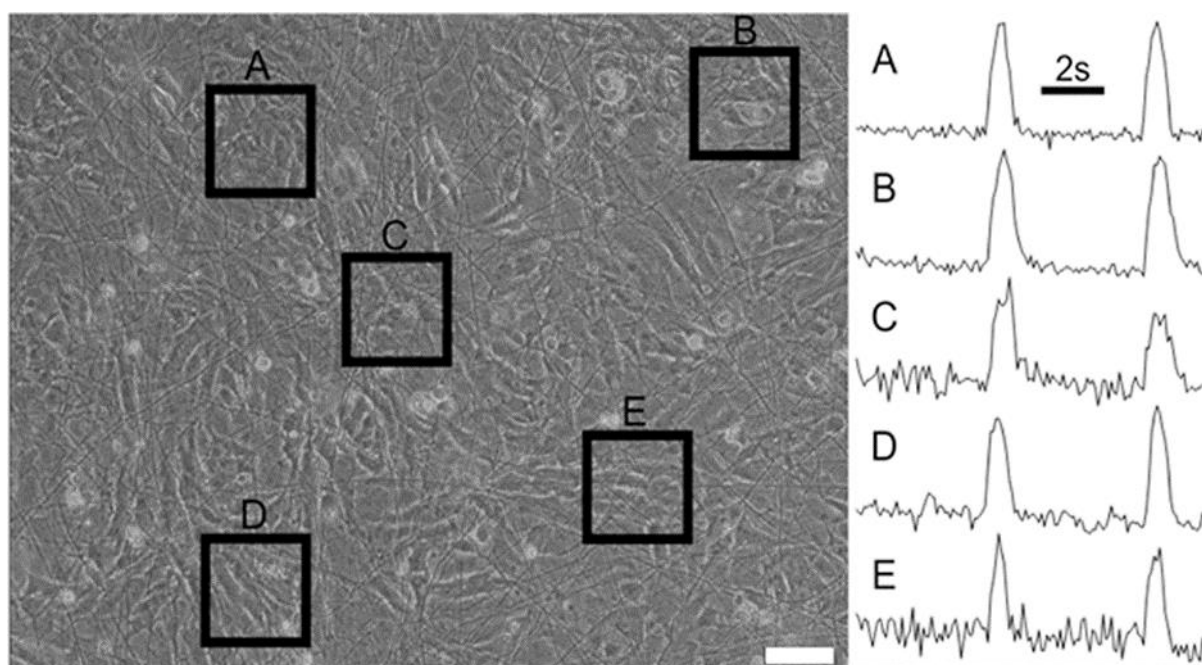


Рисунок 9. Иллюстрация скоординированной сократительной активности монослоя кардиомиоцитов, выращенного на волоконном субстрате спидроина rS2 / 12-Linker-RGDS. Стоп-кадр из видеозаписи сократительной активности, масштабная линейка 20 мкм. (А-Е): графики изменения интенсивности во времени для соответствующих обозначенных областей интереса.

Таким образом, было продемонстрировано, что рекомбинантные спидроины могут быть использованы для получения сетчатых субстратов из электроформованных волокон. Эти субстраты подходят непосредственно для прикрепления и роста кардиомиоцитов без дополнительного покрытия факторами прикрепления, такими как фибронектин.

В этой работе мы создали универсальную систему для инженерии сердечной ткани посредством манипуляций с плотностью позиционирования и ориентацией электроформованных нановолокон в качестве инструмента для контроля степенью структурной анизотропии и общей архитектуры культур сердечной ткани. Этот метод может быть применен к различным типам клеток, дающим возможность создавать макромасштабные тканевые конструкции с микромасштабным контролем выравнивания клеток и архитектуры ткани.

- Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. "Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue." *Biomaterials*. 2011 Aug ;32(24): 5615-24. Epub 2011 May 20.

- NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, LV Selina, K Agladze "Arrhythmogenic role of the border between two areas of cardiac cells alignment" *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2014) 76, pp. 227-234.

- A Teplenin, A Krashenninnikova, N Agladze, K Sidoruk, O Agapova, I Agapov, V Bogush, K Agladze "Functional Analysis of the Engineered Cardiac Tissue Grown on Recombinant Spidroin Fiber Meshes" *PLOS ONE* (2015), 10 (3).

Тканеинженерная сердечная ткань из человеческих кардиомиоцитов

Несмотря на ряд успехов в изучении механизмов возникновения и поведения реентри, достигнутых с помощью животных моделей, они не всегда полностью отражают специфику человеческой сердечной ткани. Для изучения механизмов заболевания и разработки точного лекарственного ответа, необходима модель реентрантной аритмии, построенная на клетках человека. Очевидно, для этой цели непригоден подход, базирующийся на выделении клеток из новорожденных животных. К счастью, недавние открытия в области клеточного репрограммирования вооружают нас приемлемым с этической точки зрения методом получения сердечных клеток человека.

Мы дифференцировали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ИПСК) в желудочковые кардиомиоциты, а затем создавали на их основе клеточные слои, рисунок 10, способные к электрическому проведению возбуждения. До и после создания клеточного слоя проточная цитометрия дифференцированных клеток показала, что приблизительно 90% клеток были положительными для сTnT. Соотношение сTnT-позитив не менялось в течение более 50 дней после посева (n = 3 каждый, рисунок 4.47H).

Таким образом, мы можем заключить, что слои состояли из относительно высокого процента клеток, подобных клеткам миокарда, но не были 100% чистыми кардиомиоцитами. Оптически, с помощью чувствительного к Ca^{2+} красителя Fluo-4, наблюдалась генерация характерных волн активности, скорость и характер распространения которых зависят от концентрации блокаторов натриевых каналов, лидокаина и тетродотоксина. Спиральные волны реентри удавалось прекращать, применяя антиаритмические препараты: нифекалант, E-4031, соталол и хинидин. Было обнаружено, что в культивированной ткани IK_T -блокатор нифекалант демонстрировал явное дозозависимое увеличение размера невозбудимых «ядер» спиральных волн. Таким образом, удалось создать тканево-инженерную модель волны реентри из ИПСК человека, в перспективе полезную для скрининга и тестирования фармпрепаратов с антиаритмическим потенциалом.

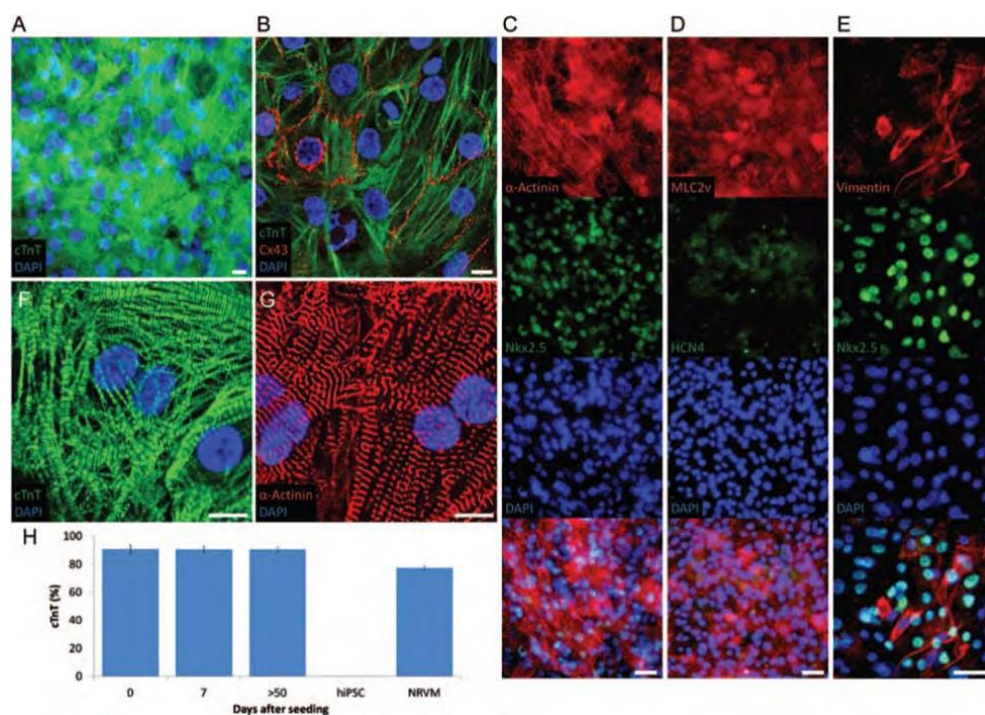


Рисунок 10. Характеристика слоев сердечных клеток. (A – G) Иммуноокрашивание проводили через 2–8 дней после посева. Сердечный тропонин Т (сTnT), альфа-актинин и Nkx2,5 были положительными примерно в 90% клеток в листе сердечной клетки, полученном из hiPSC (A – C). Вокруг сTnT-положительных клеток был обнаружен белок расщепления, коннексин-43 (Cx43) (B). Большинство клеток были положительными в отношении MLC-2v, желудочкового маркера, но менее 10% были положительными в отношении HCN4, узлового маркера (D). Маркер фибробласта, виментина, был положительным примерно в 10% клеток (E). Более высокие увеличения окрашивания сTnT (F) и альфа-актинина (G) показывают развитую структуру сердечных миофиламентов. Шкала: 20 мкм (A), 10 мкм (B, F, G), 50 мкм (C – E). (H) Средний процент сTnT-положительных клеток, проанализированных с помощью FACS ($n = 3$ каждый), составлял около 90% до и после посева (H). Недифференцированные hiPSCs (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека; 253G1) и NRVM (желудочковые миоциты новорожденных крыс) анализировали как отрицательный и положительный контроли, соответственно.

Мы использовали оптическое картирование, чтобы определить, создают ли слои сердечных клеток, полученные из hPSC, функциональный «синцитий». Распространение волны возбуждения инициировалось в клеточном слое либо самопроизвольно, либо путем применения электростимуляции (рис. 11 А, В).

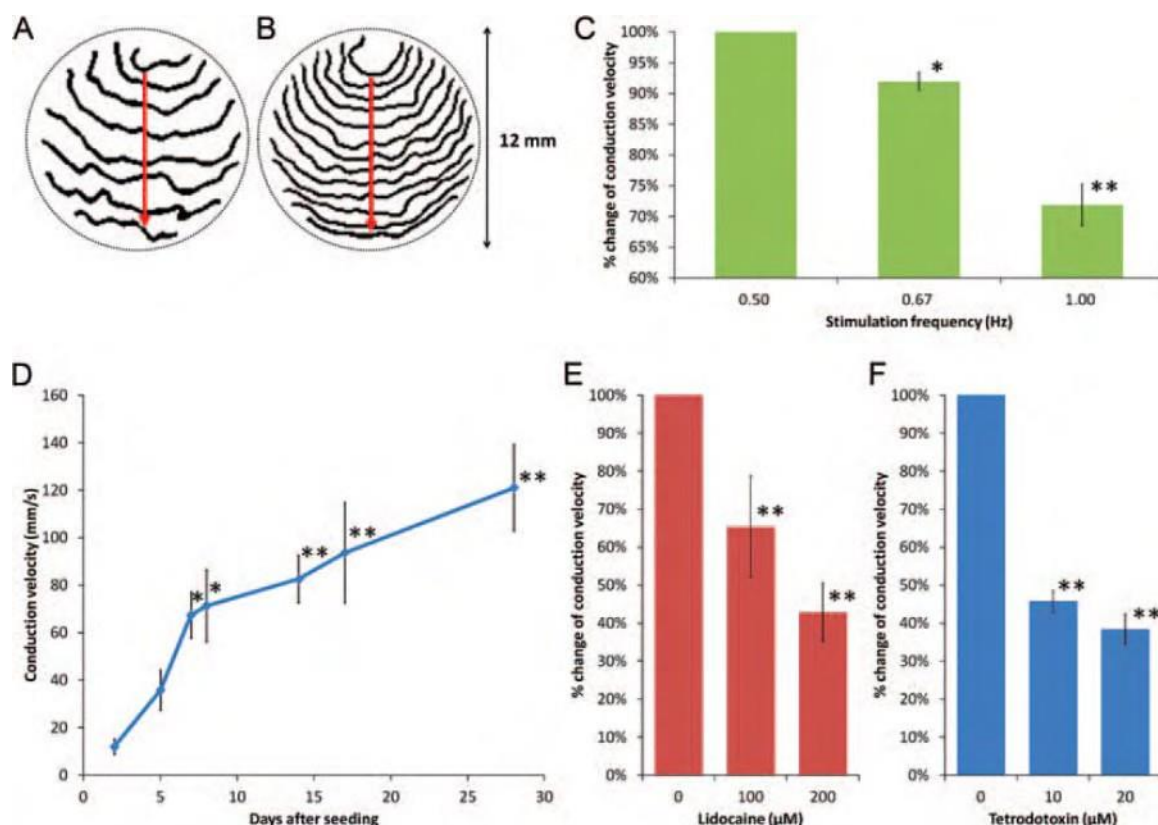


Рисунок 11. Оптическое картирование слоя клеток с помощью Fluo-4.

(А и В) Изохронная карта распространения волн в 12-мм слоях. Частота стимуляции составляла 0,5 Гц (А) и 1,0 Гц (В, Красные стрелки на изохронных картах показывают направления волн. Интервал между положениями волны 20 мс. (С) Соотношение между скоростью проведения (CV) и частотой стимуляции (n = 4). * P < 0,05, ** P < 0,01 против 0,5 Гц. (D) Соотношение между CV и днями после посева (n = 3 -7). Скорость измерялась на частоте 0,5 Гц. * P < 0,05, ** P < 0,01. (Е и F) Соотношение между CV и концентрацией блокаторов натриевых каналов. Лидокаин (Е, n = 7) и тетродотоксин (F, n = 3) замедляют скорость проводимости. ** P < 0,01.

Характеризация полученных слоев и оптическое картирование возбуждения в них позволили сделать вывод, что слои сердечных клеток, полученные из стволовых клеток человека, могут имитировать сердечную ткань с соответствующими электрофизиологическими и биофизическими свойствами.

Уже на 9-й день после начала дифференцировки в клетках наблюдалась экспрессия тяжелой цепи β -миозина и слабо сформированная поперечнополосатая исчерченность α -актинина. С 12-го дня развивались саркомеры. К 30-му дню кардиомиоциты можно было считать зрелыми в соответствии со сформированными структурами. В процессе дифференцировки клеточный слой формировал проводящую структуру сердечных клеток. Начиная с 12-го дня, в монослое отмечалась экспрессия connexin-43. Экспрессия основных маркеров кардиомиоцитов, полученных при дифференцировке iSMA6L и if31-5, приведена на рисунке 4.52.

Стоит также отметить, как происходило образование проводящей структуры из сердечных клеток. Начиная с 9-го дня клетки из слоя подвергались самосборке таким образом, что проводящие клетки были организованы в кластеры. Примерно с 15-го дня клетки в кластерах были способны генерировать и проводить возбуждение.

Окончательное формирование структур и их самоорганизация происходили примерно через 30-35 дней после начала дифференцировки. После этого наблюдался рост и созревание кардиомиоцитов, что было продемонстрировано оптическим картированием.

Потенциалы действия (ПД) кардиомиоцитов линий iSMA6L и if31-5 регистрировались с 10-го до 50-го дня после начала дифференцировки. Для регистрации потенциала действия к кардиомиоцитам iSMA6L был применен стимул в 1 нА длительность 2.5 мс частотой 1 Гц. Уже на 12-й день дифференцировки линии iSMA6L форма ПД соответствовала форме ПД желудочкового кардиомиоцита, но ПД имел укороченную длительность (200 мс) (Рис. 11).

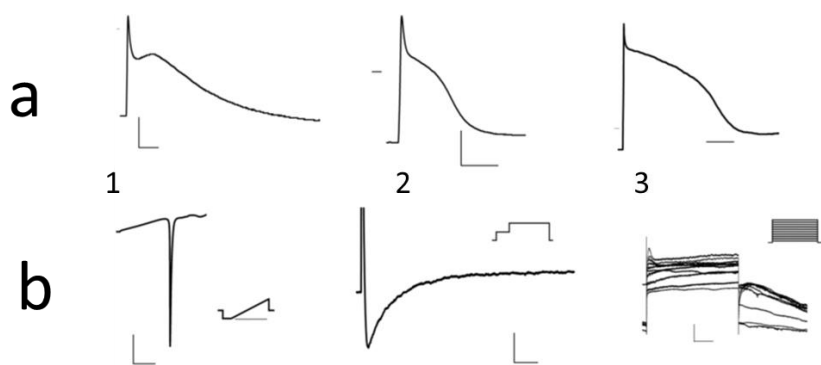


Рисунок 11. Электрофизиологический анализ изолированных кардиомиоцитов iSMA6L
 а – потенциалы действия на разных этапах дифференцировки, полученные методом patch-clamp; ПД кардиомиоцитов iSMA6L: 1 – на 12-й день дифференцировки; 2 – на 21-й день; 3 – на 28-й день; б – потенциал-зависимые ионные токи кардиомиоцитов iSMA6L, полученные методом patch-clamp в конфигурации «целая клетка» (whole cell patch-clamp): 1 – натриевый ток INa^+ , полученный при стимуляции протоколом «рампы» кардиомиоцитов iSMA6L; 2 – кальциевый ток в кардиомиоцитах iSMA6L; 3 – калиевые токи задержанного выпрямления в кардиомиоцитах iSMA6L.

Важнейшим моментом в регистрации активности является устойчивое проведение полученной человеческой ткани. Для определения периода, с которого свойства проведения культуры станут устойчивыми и независимыми от дальнейших процессов развития и формирования ткани, проводилось наблюдение за 5 основными параметрами проведения, полученными с помощью картирования и отражающими такие свойства культуры, как проведение, скорость при различных частотах и критическая частота. На рис. 12 приведена диаграмма, показывающая значения следующих параметров для монослоя клеток iSMA6L на различные дни дифференцировки (каждое приведенное значение усреднено по измерениям 3 образцов): скорость спонтанного проведения, измеренная с помощью программы ImageJ; частота спонтанной активности; критическая частота – максимальная частота электродной стимуляции, улавливаемая культурой без перебоев; скорость при критической частоте; производная – отношение скорости при спонтанном возбуждении к скорости при критической частоте. Было замечено, что все 5 величин возрастают с течением времени, заметный рост прекращается после 30-го дня: начиная с 30-го дня, впервые различие значений между соседними днями дифференцировки не превышает разницу значений между различными образцами одного и того же дня, что означает, что изменение свойств проведения в дальнейшем слабо зависит от дня дифференцировки.

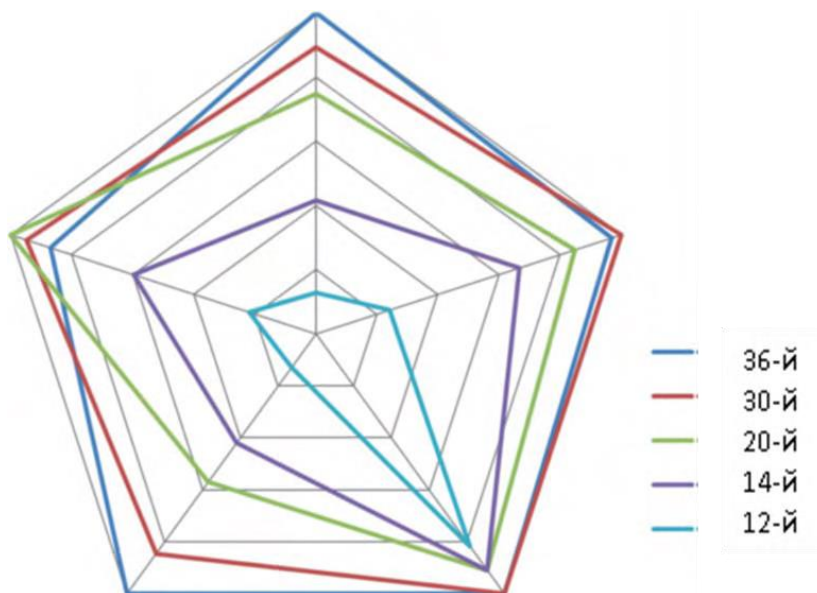


Рисунок 12. Лепестковая диаграмма свойств проведения монослоя клеток линии iSMA6L разных дней дифференцировки.

Значения на каждой оси приведены в относительных единицах: нормировка произведена на максимальное зафиксированное значение соответствующей величины.

Наше исследование с использованием метода оптического картирования показало, что для формирования проводящей и полностью функциональной сердечной ткани при направленной кардиальной дифференцировке линии ИПСК iSMA6L требуется около 30 дней. Именно с 30-го дня дифференцировки все ключевые свойства проведения возбуждения становятся устойчивыми и перестают зависеть от дальнейших процессов развития ткани.

- S Kadota, I Minami, N Morone, JE Heuser, K Agladze*, N Nakatsuji “Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets.” Eur Heart J. 2013 Apr;34(15):1147-56. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418. Epub 2012 Nov 30.

- М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, Ш.Р. Фролова, Е. Дементьева, К.И. Агладзе "Исследование функциональности кардиомиоцитов, полученных из индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток для моделирования сердечных аритмий из-за синдрома удлиненного QT интервала" Вавиловский журнал генетики и селекции 3018, 22(2), 187-195.

- SR Frolova, K Agladze "Study of the patch-clamp electrophysiological properties of cardiomyocytes derived from patient-specific iPSCs" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES 50 (6), 539-540, 2018.

Роль границы и геометрии участка среды в распространении волны возбуждения и образования реентри

Поскольку реальная возбудимая система всегда ограничена в своей протяженности, важно понимать, как ограниченность, или шире - геометрия среды может влиять на картину распространения волн возбуждения. Этот вопрос имеет непосредственное практическое значение, т.к. как показали наши исследования, возникновение и стабильность волн реентри могут определяться именно геометрическими свойствами среды.

Образование реентри на заостренных препятствиях

Появление и размножение спиральных волн нарушает пространственную организацию среды и может привести к турбулентному или хаотическому поведению. В течение почти 30 лет единственное разумное объяснение самопроизвольного инициирования спиральной волны, подтвержденное в различных возбудимых тканях, заключалось в том, что это происходит из-за неоднородности рефрактерности, то есть пространственные различия в

восстановительных свойствах ткани могут привести к локализованному нарушению распространения и последующему скручиванию в спиральные волны. Мы проверили возможность механизма генерации спиральных волн при высокочастотном воздействии, наблюдая его как в экспериментальном исследовании на реакции Белоусова-Жаботинского (БЖ), проведенном автором работы, так и проведенное А.В. Панфиловым на компьютерных моделях. Оказалось, что вращающиеся волны могут возникать в результате взаимодействия волн с непроницаемыми препятствиями или границей среды, в других отношениях, однородной среде. Механизм образования довольно общий: он является результатом общих свойств возбудимых сред, в том числе зависимости скорости волнового фронта от локальной частоты волн и кривизны волнового фронта. Простыми критериями появления спиралей являются: (i) частота периодической волновой последовательности должна быть выше некоторой критической частоты и (ii) доменная стенка или препятствие должны иметь острые углы. Хотя это явление визуально сходно с образованием вихрей в гидродинамической турбулентности, оно происходит здесь в отсутствие физического переноса массы и по другому механизму.

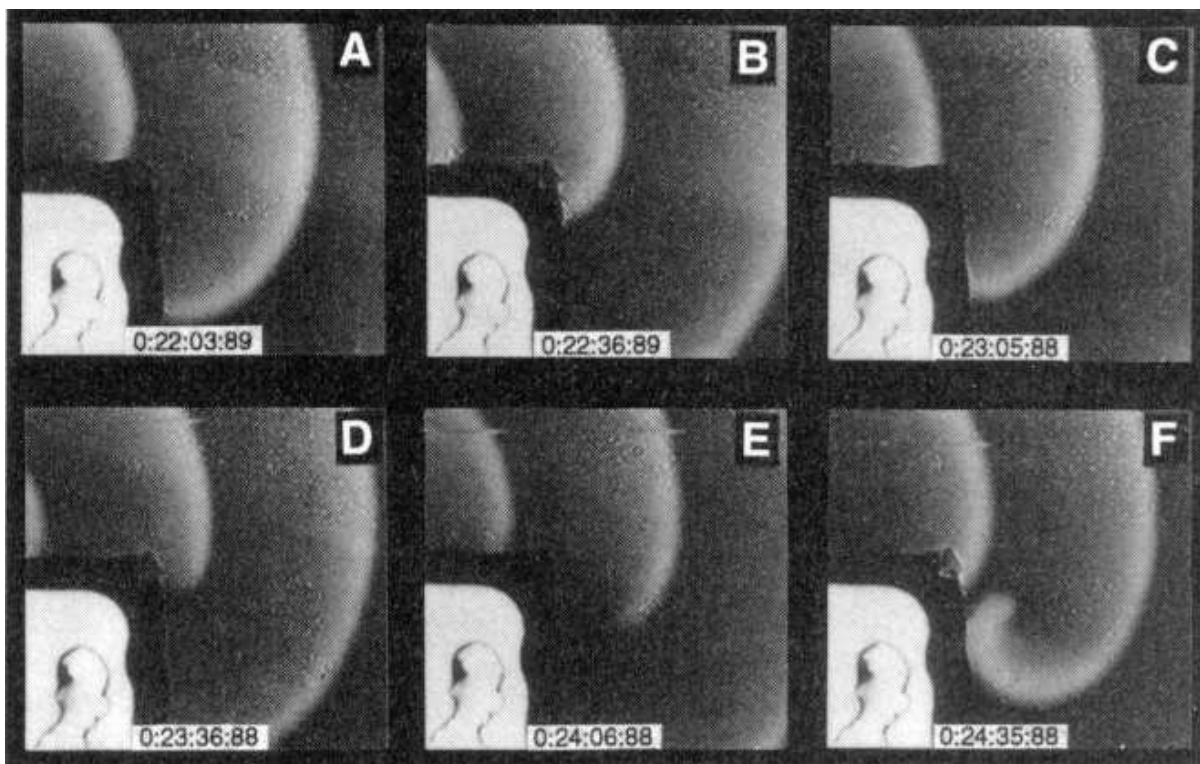


Рисунок 13. Образование спиральной волны в агарозном геле, пропитанном реагентом БЖ.
 Концентрации: NaBrO_3 - 0,16 М; H_2SO_4 - 0,33 М; $\text{CHBr}(\text{COOH})_2$ - 0,09 М; $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ - 0,05 М; ферроин - 3,4 ммоль. Препятствие представляет собой прямоугольный участок, с которого удален гель и который заполнен силиконовым маслом. Размер кадра 25мм × 28 мм, время между кадрами 30 сек.

Эксперимент по образованию спиральной волны проиллюстрирован на рис. 13. Слой 2% агарозного геля (толщиной 0,7 мм) был подготовлен в качестве матрицы для среды. Использование геля позволяет избежать гидродинамических нарушений и позволяет создавать граничную геометрию путем прорезания острого угла в слое геля. Чтобы создать источник волны с частотой, большей, чем у обычной спиральной волны, мы впрыскивали с помощью шприца микрокаплю (около 10 мкл) 0,15 М серной кислоты в ядро выбранной спиральной волны, тем самым увеличивая ее частоту вращения. Позже, чтобы уменьшить частоту или убить спиральный источник, мы использовали микрокапли 1М раствора бромида. Когда частота волн была меньше или равна равной скорости вращения спирали, волны перемещались за угол без заметных разрывов волн (рис. 13, A-D). Когда локальная частота была увеличена выше критического значения, спонтанно возникла волна (рис. 13D). Со временем разрыв волны превратился во вращающуюся спираль (рис. 3, E и F). Поскольку частота воздействия была выше, чем собственная частота спирали, спираль отошла от своей исходной точки (справа в этом эксперименте, не показано).

Выполненное далее А.В. Панфиловым компьютерное моделирование подтвердило, что эффект образования спиральной волны на остром угле препятствия носит общий характер, и не зависит от деталей локальной кинетики. В нашей совместной публикации (Science, 1994) были обозначены условия, приводящие к рождению спиральной волны:

- достаточная частота следования цуга волн;
- достаточно высокая локальная кривизна границы препятствия ("острый угол").

Заметим, что рассматривалась непроницаемая граница препятствия, т.е. граничные условия фон Неймана. В дальнейших исследованиях нам удалось обобщить условия возникновения спиральной волны на ситуацию проницаемой границы (см. следующий раздел), а также показать, что отрыв волны может происходить при любой кривизне границы, при условии достаточно высокой частоты цуга волн (см. раздел про вынужденный дрейф и дестабилизацию закрепленной вращающейся волны).

- K. Agladze, J.P. Keener, S.C. Muller, A. Panfilov "Rotating Spiral Waves Created by Geometry", Science, 1994, v. 264, pp 1746-1748.

Ранее А.М. Перцовым (Z. Nagy-Unvarai, А.М. Pertsov, 1992) было показано, что разрыв волны может возникать из-за латеральной неустойчивости волнового фронта в среде с очень низкой возбудимостью. Однако в этом случае, когда возбудимость уменьшается настолько, что возникают спонтанные разрывы волн, открытые концы не превращаются во вращающиеся спирали и, следовательно, этот процесс не может привести к турбулентному состоянию среды. Мы обнаружили, что эффекты латеральной неустойчивости фронта волны наблюдаются в возбудимых средах независимо от их возбудимости с единственным необходимым условием: достаточно высокой частотой распространяющейся волновой последовательности. Мы также обнаружили, что в определенной среде граничные эффекты могут значительно усилить процесс возникновения волновых разрывов, как описывалось выше для непроницаемой границы с острыми углами. В отличие от систем с низкой возбудимостью, волновые разрывы, возникающие в высокочастотных волновых последовательностях, могут легко эволюционировать в спирали и, наконец, создавать картину турбулентности.

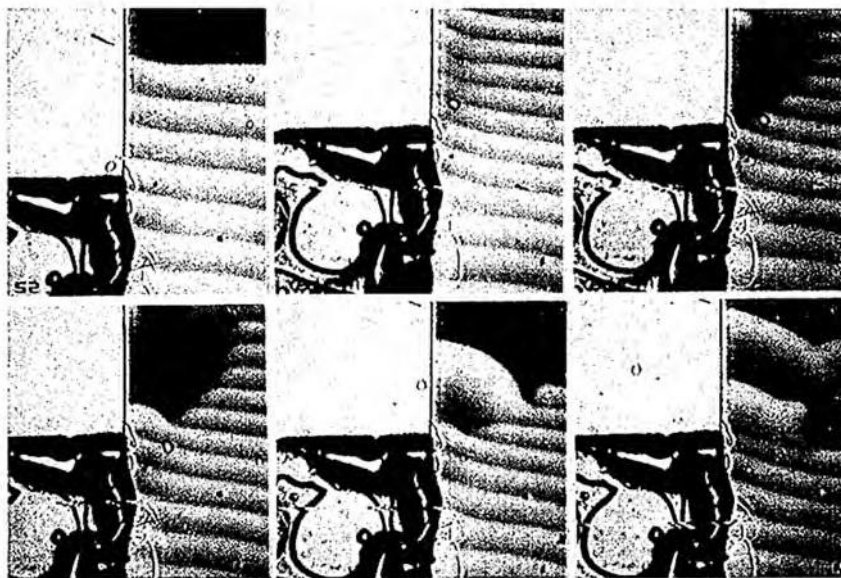


Рисунок. 14. Волновые разрывы, возникающие при распространении волнового цуга вдоль перехода, непроницаемая граница - сток.

Волны движутся вверх. Левая нижняя четверть оправы представляет собой кусок стекла, приклеенный к границе силикагеля. Временной интервал между кадрами 15 с, ширина кадра 4 мм. процесс замачивания геля в растворе БЖ, особенно если раствор, налитый в чашку Петри в верхней части геля, осторожно перемешивали механически. Чтобы получить источник волны с частотой, большей, чем у простой спиральной волны, шприцом впрыскивали микрокаплю серной кислоты в ядро выбранной спонтанно возникающей спиральной волны.

Распространение волн вдоль границы типа стока показано на рис. 14. Если частота распространяющейся волновой последовательности невелика, волны движутся вдоль границы и остаются прикрепленными к ней (кадры 1-3). Когда частота волнового цуга становится достаточно высокой, конец волны отсоединяется от границы (рис. 14, кадры 4-6). Волны, движущиеся вдоль непроницаемой части границы, не отделяются от нее (кадры 1-2). Но когда они достигают границы типа стока, они отрываются и сжимаются, (3—5). Появляются новые волновые разрывы и в конечном итоге закручивающиеся спиральные кончики (кадр 6). Если возбудимость среды достаточно низкая, может возникнуть латеральная неустойчивость фронта волны. Боковая нестабильность приводит к сокращению волновых фронтов. Из-за этого они распространяются отдельно от границы среды и появляются свободные концы. Эти свободные концы могут служить источником новых спиральных волн. Описанный процесс возникновения спонтанных волновых разрывов может служить механизмом перехода в турбулентные состояния во многих типах возбудимых сред.

- K.I. Agladze "High-frequency instability of wave fronts", Chaos, 1994, v. 4, pp 525-529.

"Химический диод"

Для создания «химического диода» использовалась химическая активная среда на основе реакции БЖ, представляющая собой композицию из двух мезопористых стекол с фиксированным катализатором, погруженную в реагент БЖ. Эта система, подобно полупроводниковому диоду, демонстрирует однонаправленное распространение химических импульсов и может быть использована для построения массивно параллельной вычислительной среды. С другой стороны, в более общем смысле, исследованная система демонстрирует механизм возникновения однонаправленного проведения, который может лежать в основе возникновения волн реентри. Система из двух мезопористых стеклянных пластин с ферроином, загруженным на поверхность, была покрыта раствором БЖ и поддерживала распространяющиеся волны возбуждения. Однонаправленное распространение наблюдалось, когда пластины были расположены так, что угол одной пластины был близок к плоской стороне другой пластины. Исследование показало, что важной особенностью системы является геометрическое расположение пластин и расстояние между ними. Компьютерное моделирование подтвердило экспериментальные результаты.

Проводимость диода «однонаправленная», сопротивление в одном направлении на несколько порядков выше, чем в противоположном. В среде БЖ химические волны распространяются из-за диффузионной связи элементарных объемов. В нормальном водном растворе диффузионный перенос частиц является изотропным процессом, и невозможно вызвать «однонаправленное распространение» путем изменения химического состава системы. В недавнем исследовании было обнаружено, что не только химическая кинетика, но также геометрическая форма и граничные условия очень важны для развития волновых моделей. Известно, что волны возбуждения могут отчетливо анизотропно распространяться в средах с особой геометрией, такой как разветвление, резкие расширения - сужения, включая кривизну и распространение фронта, зависящее от размера фронта. Мы наблюдали желаемую картину, используя асимметричное расположение двух мезопористых стекол со связанным катализатором, рис. 15.

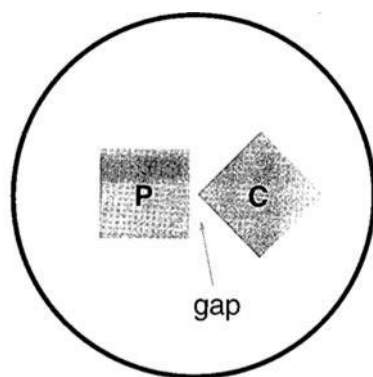


Рисунок 15. Схема эксперимента. Две стеклянные пластины Vycor Corning, расположенные на дне чаши Петри диаметром 6 см с зазором между ними 60 мкм и покрытые 17,5 мл раствора БЖ: NaBrO_3 0,17 М, H_2SO_4 0,11 М, $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ 0,11 М, NaBr 0,03 М, все концентрации приведены до бромирования, температуру поддерживали на уровне 25° С. Стекла выдерживали не менее 1 часа до начала экспериментов. Волновые картины записывались с помощью CCD-камеры SONY XC-77 и записывались на видеомэгнитофон Mitsubishi HV-S11.

Стеклянные пластины размером примерно 10 мм × 10 мм × 1 мм были тесно соединены с небольшим зазором между ними, так что одна пластина была ориентирована к области контакта по границе плоскости (сторона Р системы), а другая стеклянная пластина была ориентирована углом (сторона С системы). Стеклянные пластины покрывали раствором БЖ за исключением катализатора, ферроина, который был присутствовал только в виде тонкого слоя (приблизительно 0,1 мм) на поверхности стеклянной пластины. Таким образом, распространение волны было возможно только на поверхности пластины. Распространение волны от одной пластины к другой также было возможно при условии, что зазор между пластинами не превышал критического значения.

На рисунке 16 показано распространение волн с разных сторон системы. Волна, приближающаяся со стороны Р, успешно «перепрыгивает» через неактивную щель, а волна, распространяющаяся из стороны С не может преодолеть щель. Асимметричное распространение волны обусловлено несимметричной геометрией среды. Простое объяснение включает в себя зависимость распространения волны от геометрии и размера волнового фронта. Известно, что существует критический размер распространяющейся волны; волновые фронты с размером меньше критического не могут распространяться.

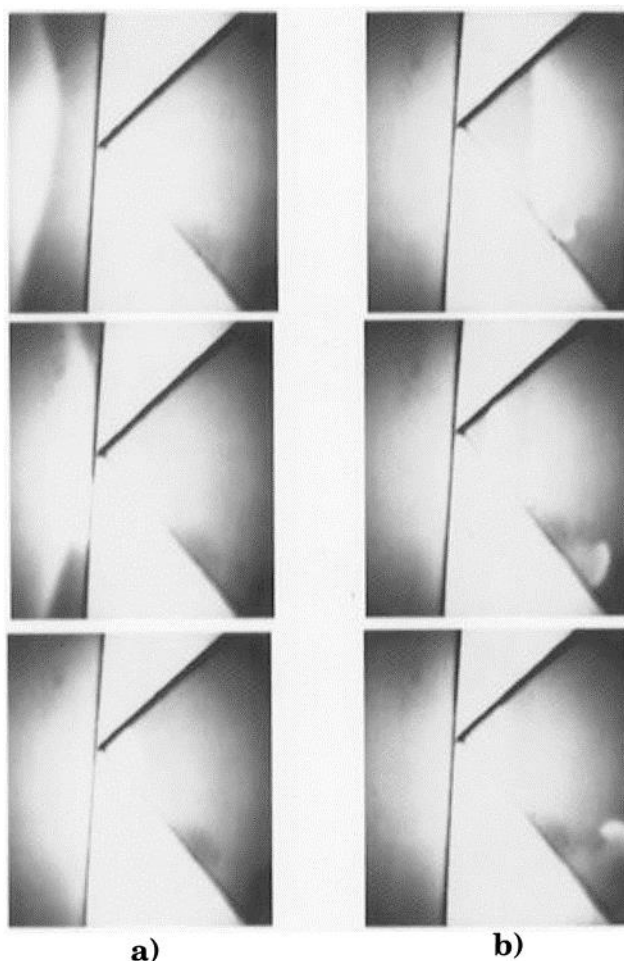


Рисунок 16. Однонаправленное распространение волны в стеклянной системе Р-С: (а) фотографии распространения волны со стороны Р (левая пластина), волна приближается к зазору между стеклянными пластинами и индуцирует волну на стороне С (правая пластина), «перепрыгивая» через промежуток. Интервал времени между кадрами - 60 с; (б) волна приближается к зазору со стороны С (правая пластина) и исчезает; нет распространения на стороне Р (левая пластина); временной интервал между кадрами составляет 90 с.

Легко видеть, что волна, распространяющаяся со стороны Р, не меняет свою геометрию или размер в ходе распространения, пока не достигнет границы пластины. Другая

ситуация возникает для волны, распространяющейся со стороны С. Приближаясь к углу С-пластины, фронт волны постепенно сжимается, приближаясь к критическому размеру, когда достигает расстояния, подходящего для индуцирования волны на Р-пластине. Положение стеклянных пластин, однако, является необходимым условием, но не достаточным. Наличие зазора между пластинами также важно; в отсутствие промежутка наблюдалось нормальное распространение волны в любом направлении: от Р к С, и от С к Р. Однонаправленное распространение возникало при увеличении ширины зазора. Как показано на диаграмме зависимости распространения от размера зазора, полученной в результате компьютерного моделирования (рис. 17), полный контакт между пластинами делает возможным распространение волны в обоих направлениях. Увеличивая ширину щели, мы можем получить желаемое однонаправленное распространение, и дальнейшее увеличение приводило к полной блокировке химических волн. Естественно, необходимая ширина зазора зависит от возбудимости среды, для менее возбудимой среды она должна быть, по-видимому, меньше.

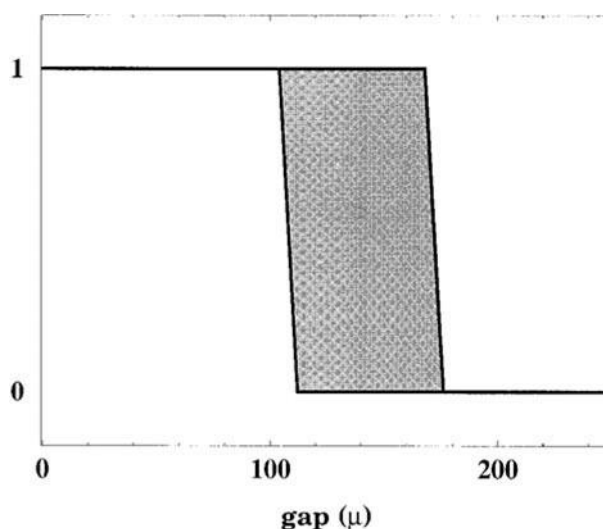


Рисунок 17. Диаграмма распространения волны в зависимости от размера щели.

Проводимость имеет значение 1, когда волна может распространяться от одной стеклянной пластины к другой, или 0, когда распространение не наблюдается. Заштрихованная площадь соответствует области размера зазора, где наблюдается однонаправленное распространение.

Важно отметить, что система Р-С также может быть применена к различным возбудимым средам, потому что общий эффект обеспечивается геометрией и граничными условиями и не включает специфическую химию волн БЖ.

K. Agladze, R. R. Aliev, T. Yamaguchi, K. Yoshikawa "Chemical Diode", J. Phys. Chem., 100 (33), pp 13895 - 13897, 1996.

Множество возбудимых систем не являются непрерывными: в биологических возбудимых тканях возбуждение распространяется в клетках, отделенных друг от друга, в гетерогенном катализе зерна активного катализатора отделяются реакционной средой и т. д. Разделительная среда пассивна в том смысле, что она не поддерживает динамику возбуждения, но она может обеспечить связь между отдельными элементами. В химических системах и в клеточных синапсах эта связь обычно основана на диффузии активных веществ. Геометрически самый простой случай — это разрыв между двумя возбудимыми элементами, и проблема в том, как волна возбуждения может преодолеть этот разрыв. Мы разработали новую модель для изучения туннелирования химических волн на основе полисульфоновых мембран с фиксированным катализатором, которые можно легко разрезать и поместить в выбранную геометрическую конфигурацию. Модель позволила изучить распространение волн при наличии однородного расщепления, расширяющегося расщепления, а также плоско - угловой конфигурации, приводящей к так называемому химическому диоду. Ниже приведены иллюстрации нескольких обнаруженных эффектов.

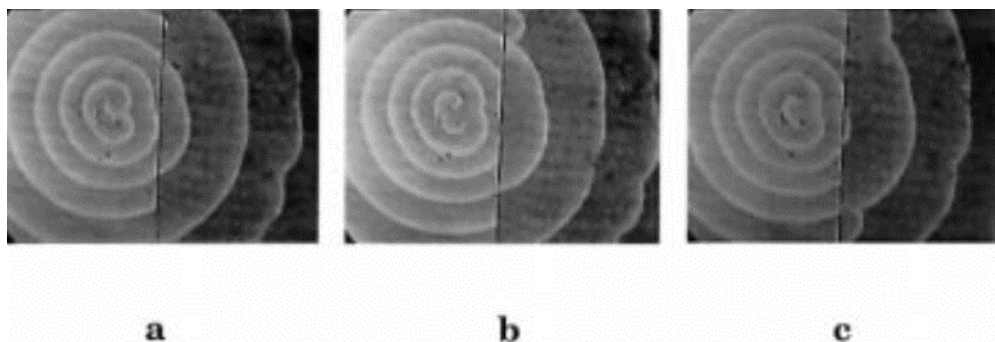


Рисунок 18. Удвоение периода на щели. Временной интервал между кадрами составляет 30 с.

На рисунке 18 показана волновая картина, возникающая в среде, где вблизи расщепления существует постоянный источник волны (пара спиральных волн на левой стороне рисунка). Ширина щели составляла 0,3 мм. В этом эксперименте расщепление служило частотным фильтром. Каждая вторая волна не могла туннелировать через щель, поэтому волны возбуждения распространялись на правую сторону среды с удвоенным периодом. Волны возбуждения, не прошедшие через щель, рис. 18а) -b), создали разрывы волн,

прикрепились к расщеплению и распространились вдоль него. Рисунок 19 иллюстрирует сразу два эффекта: дрейф спиральной волны и гибель ее на расширяющейся щели.

Из экспериментальных данных видно два основных влияния неактивного расщепления на распространение волны: для одиночной волны это задержка или замедление на расщеплении, а для последовательности волн - увеличение времени рефрактерности среды. Мы проанализировали эти эффекты, используя численное моделирование модели FHN:

$$U_t = U(U - b)(1 - U) - V + \Delta U, \quad V_t = (U + \alpha - \beta V)/\tau$$

Здесь U - переменная активатора, описывающая возбуждение, V - переменная ингибитора (с медленной шкалой времени). Обычно мы использовали $b = 0.022$, $\tau = 200$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 1.53$. Числовые параметры были: $dt = 0.1$, $dx = 0.5$, и мы использовали 200×200 точек для 2D моделирования. В области промежутка мы отменили динамическую часть уравнения и оставили диффузию.

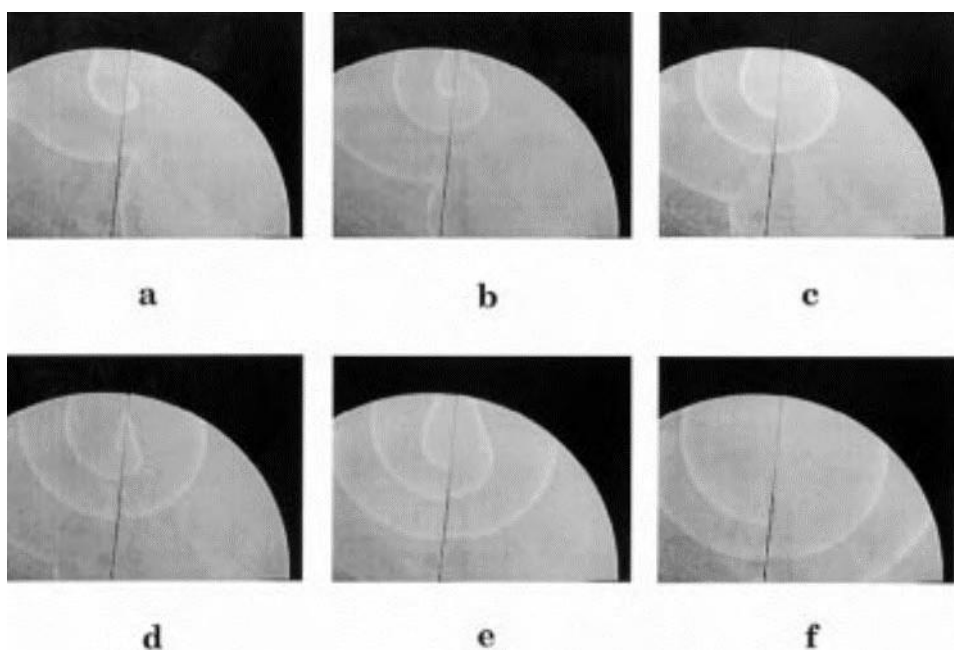


Рисунок 19. Гибель дрейфующей спиральной волны на расширяющейся щели.

Временной интервал между кадрами (а) и (б) составляет 65 с; между кадрами (б) и (в) - 40 с; между кадрами (с) и (d) - 125 с; между кадрами (d) и (е) - 25 с; между кадрами (е) и (f) составляет 215 с.

Наш анализ показывает, что существует два основных эффекта распространения волны через неактивное расщепление: задержка времени для туннельной волны и увеличение периода восстановления для туннельной волновой последовательности. Это приводит к тому, что «пассивная» связь между активными элементами возбудимой среды может

играть очень важную роль в формировании паттерна возбуждения. Спиральные волны, возникающие на щелях, не полностью соответствуют спиральным волнам в однородной среде. Во-первых, они не свободны, они прикреплены к щели и могут перемещаться по ней. Во-вторых, период присоединенной к расщеплению спиральной волны больше, чем период свободной спиральной волны (в наших экспериментах эта разница составляла от 5 с до 10 с, по сравнению с периодом свободной спиральной волны около 87 с; по-видимому, разница больше для более широких расщеплений). Расширение расщепления может вызвать дрейф прикрепленных спиральных волн и гибель их, если спираль достигнет области, где расщепление имеет сверхкритический размер.

- K. Agladze, V. Krinsky "Tunneling Chemical Waves" Il Nuovo Cimento, vol. 20D (January), p.103, 1998.

Взаимодействие с границей среды волны возбуждения в культуре сердечных клеток

Как было показано выше, геометрия фронта волны возбуждения играет важную роль в блокировании распространении волны и формировании волны реентри. Фронт волны, изгибающийся выше критического значения из-за взаимодействия с препятствиями, может частично перестать распространяться, и возникающие разрывы волн превращаются во вращающиеся волны или реентри. Этот сценарий может объяснить механизм спонтанного образования реентри волн в сердце. Мы изучили сильно искривленные фронты возбуждения в культуре ткани сердца и обнаружили, что в условиях нормальной, неингибируемой возбудимости эффекты кривизны не играют существенной роли в распространении. Ни узкие перешейки, ни острые углы препятствий, являющиеся классическими объектами для получения чрезвычайно искривленного волнового фронта, не влияли на неингибированное распространение волн. Связанные с искривлением явления распространения блока и отрыва волн от границы препятствия наблюдались только после частичного подавления натриевых каналов с помощью лидокаина. Компьютерное моделирование подтвердило экспериментальные наблюдения. Объяснение наблюдаемого явления состоит в том, что ткань сердца состоит из клеток конечного размера, так что радиусы кривизны, меньшие, чем размер кардиомиоцитов, теряют смысл, и в неингибированной ткани отдельная клетка способна передавать возбуждение своим соседям.

Препятствия в слоях сердечных клеток были сделаны точными разрезами в центральной области культивированного монослоя с помощью иглы шприца 27G, контролируемой микроманипулятором и под фазово-контрастным микроскопом (IX-71; Olympus), непосредственно перед наблюдением (рис. 20). Чтобы создать узкий перешеек, линия разреза была кратковременно прервана путем подъема иглы, оставив небольшую область без разреза в центре (рис. 20А). Для моделирования формирования спиральной волны на остром элементе была вырезана односторонняя линия (рис. 20В). Чтобы контролировать возбудимость и восстановление, в инкубационный раствор добавляли либо лидокаин, либо нифекалант, либо их смесь. Лидокаин добавляли до конечных концентраций в диапазоне от 0,2 до 1,0 мМ. Нифекалант добавляли в интервале концентраций от 1,0 до 10 мкМ.

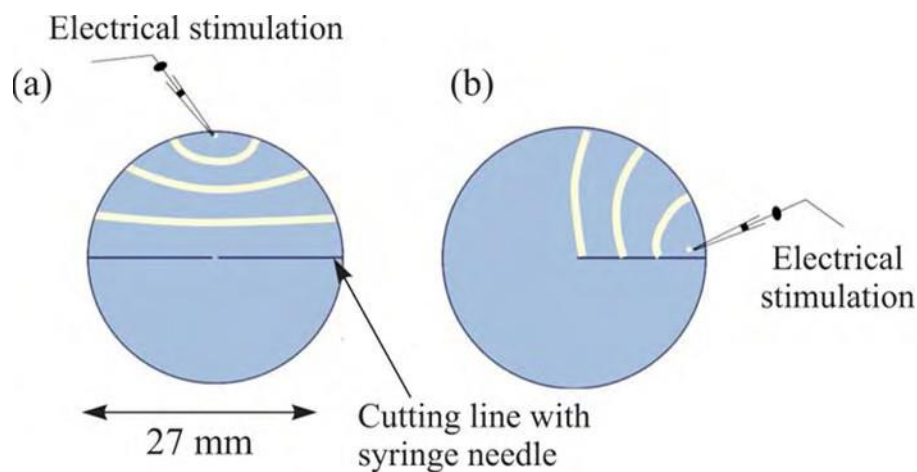


Рисунок 20. А - модель узкого перешейка, В - модель возникновения спиральной волны.

Распространение волнового фронта через перешеек на компьютере моделировалось с использованием непрерывной изотропной модели слоя сердечной ткани, дискретизированной на прямоугольной сетке с граничными условиями без потока. Типичный размер ячейки составлял 1,5x1,5 мм с $dx = 5$ мкм. Уравнение, управляющее трансмембранным потенциалом (V_m , мВ) в каждом узле, было

$$\frac{dV_m}{dt} = D\nabla^2 V_m - \frac{I_{ion}}{C_m}$$

где C_m - емкость мембраны (1,0 мкФсм⁻²), D - коэффициент диффузии (0,9 см²с⁻¹), I_{ion} - суммарный ток, протекающий через мембрану (μА · см⁻²), и ∇^2 - пространственный лапласиан 2D (см⁻²).

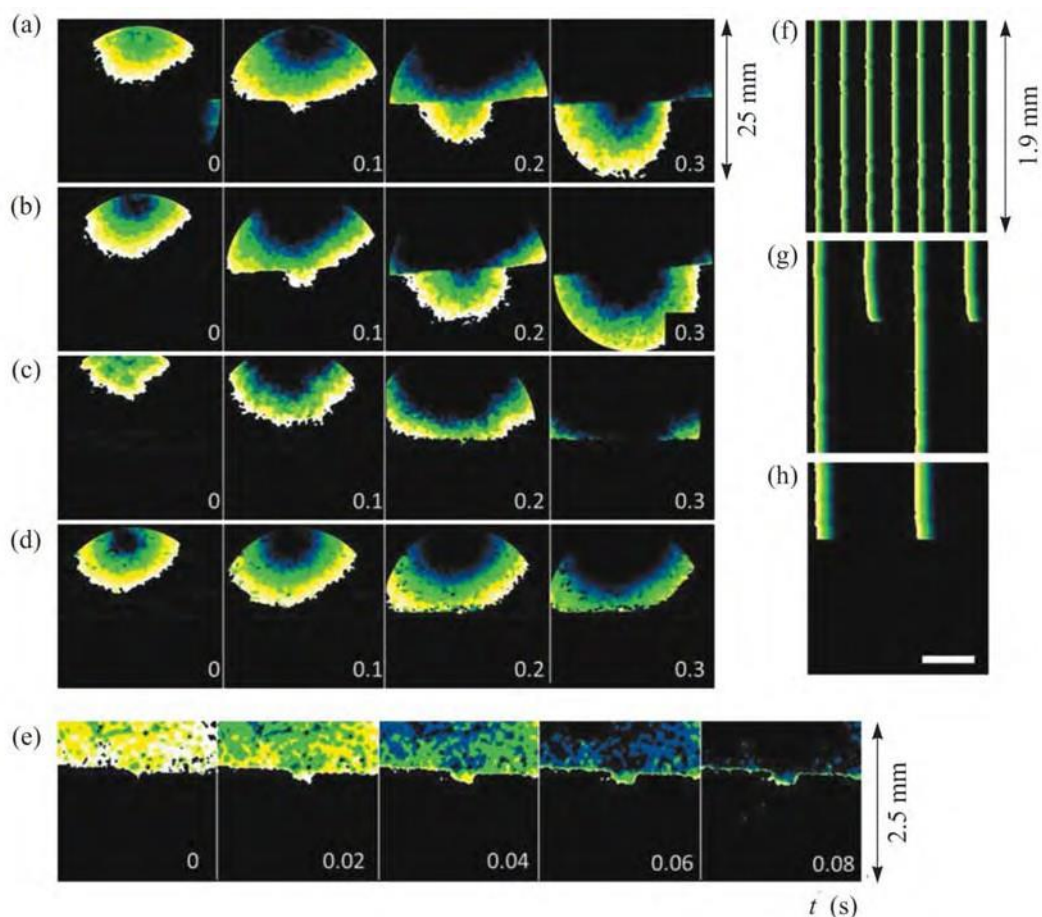


Рисунок 21. Распространение волны через узкий перешеек между двумя областями культивированных кардиомиоцитов.

(f) - (h) - временная развертка распространения волны через перешеек. Экспериментальные параметры: ширина 97 мкм, лидокаин - 0,2 ммоль, цикл стимуляции - 0, 6 с. Интервал между кадрами 0,1 с.

Как и ожидалось, распространение возбуждения замедлилось за перешейком, рис. 21. Три основных фактора определили характер распространения за перешейком: 1) ширина перешейка, 2) концентрация лидокаина, 3) продолжительность цикла стимуляции. Замедление на перешейке было более выраженным для более узких перешейков и для более высоких концентраций лидокаина, вплоть до полного блока проводимости. Вблизи блока проводимости можно было наблюдать преобразование ритма, когда только каждая вторая или каждая третья волна могла проходить через перешеек. На рисунке 21 показаны три различных наблюдаемых сценария: а) прохождение перешейка, б) преобразование ритма, в) блок проводимости. Показаны временные и пространственные графики, построенные вдоль линии сканирования, перпендикулярно проходящей через перешеек. Угол наклона белой линии, представляющий положения фронта волны на пространственно-временном графике, отражает скорость распространения, замедление рассматривается как менее крутой угол наклона. В отсутствие лидокаина волны успешно

прошли ~ 100 мкм перешейка без видимого замедления. Применение лидокаина позволило наблюдать трансформацию ритма, а для больших концентраций - полный блок проводимости, рис. 21 с. Графики, иллюстрирующие соотношение между длиной цикла стимуляции (CL) и шириной прохода, были построены при концентрациях лидокаина при 0, 0,2, 0,5 и 1,0 mM, соответственно, рис. 22.

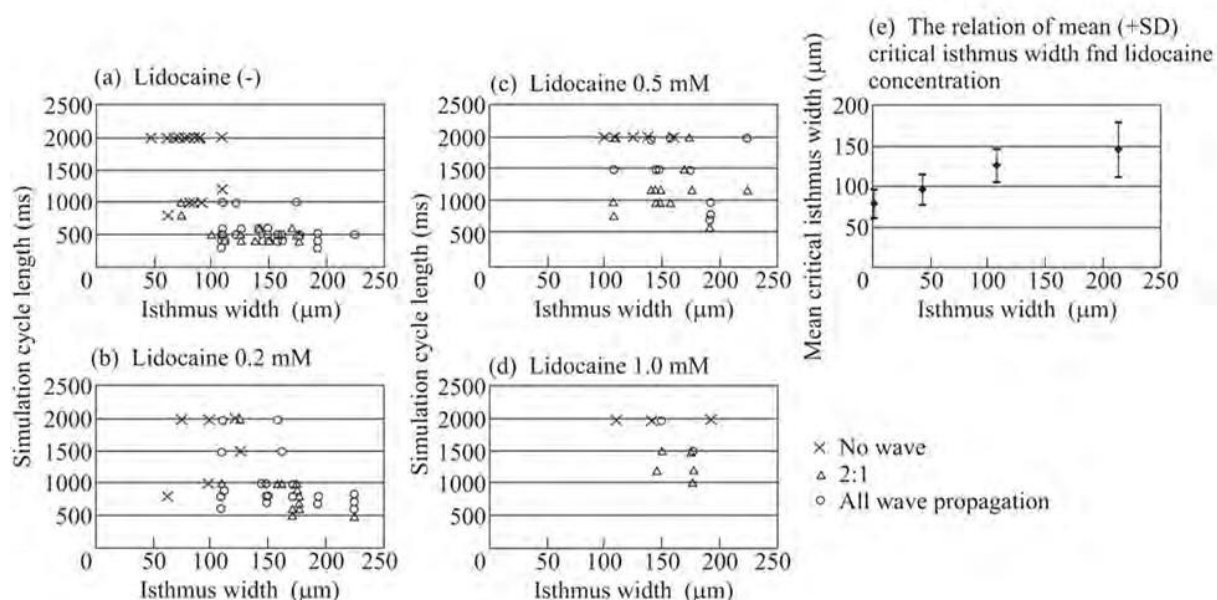


Рисунок 22. Соотношение между шириной перешейка и периодом стимуляции в экспериментальной модели.

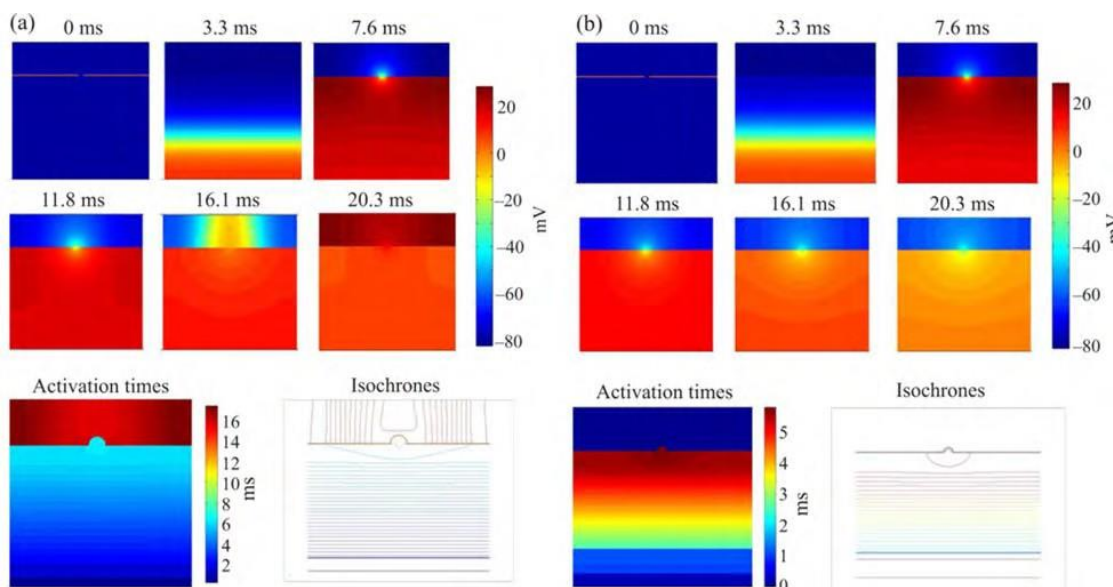


Рисунок 23. Компьютерное моделирование распространения волны через узкий перешеек. а) - прохождение волны, б) - блок проведения.

Компьютерное моделирование показало, что в зависимости от размера перешейка схема распространения изменялась от полного блока, случайного блока к непрерывному распространению. Рисунок 23a иллюстрирует успешное распространение волны через перешеек, в то время как рисунок 23b демонстрирует индуцированный перешейком блок распространения. Важно отметить, что при уменьшении размера перешейка до 20-25 мкм дальнейшее уменьшение не имеет смысла, так как размер одного кардиомиоцита составляет примерно эту величину. Это означает, что даже одна возбуждаемая клетка способна передавать возбуждение своим соседям, и блок размножения может фактически наблюдаться в ткани с существенно сниженной возбудимостью. Эти данные соответствуют нашим экспериментальным наблюдениям, где мы не могли наблюдать блок распространения на перешейке без применения лидокаина. Компьютерное моделирование также выявило интересный факт, что перешеек может влиять на характер распространения таким образом, что он может проявляться ранняя пост деполяризация, которая считается частым предшественником волны реентри.

Эксперименты на культуре ткани показали, что связанный с искривлением волны блок проводимости и возникновение спиральных волн наблюдаются в ткани с существенно подавленной возбудимостью (то есть сниженной активностью быстрого натриевого канала). В противном случае в неингибированной сердечной ткани масштаб, при котором кривизна волнового фронта может влиять на распространение, становится порядка размера клетки, что делает неприемлемым подход к «классической» непрерывной среде и свидетельствует о том, что даже одна клетка способна передавать возбуждение к своим соседям.

Спонтанный распад спиральной волны, вызванный прикреплением ее к дефекту ткани

В этом разделе рассматривается роль локальных дефектов в поведении волн реентри. До нашей работы считалось, что локальные дефекты сердечной ткани исключительно стабилизируют волны реентри, прикрепляющиеся к ним и вращающиеся вокруг этих дефектов. Однако оказалось, что важную роль в процессе "стабилизации" играют граничные условия дефекта и сценарий может оказаться прямо противоположным. В данной работе мы представляем механизм инициирования спиральной волны из-за особенностей дефекта сердечной ткани, связанных с его граничными условиями.

В работе использовалась модифицированная модель Алиева-Панфилова со степенями $h = 1.0$ $t = 0.01$.

$$\frac{\partial u}{\partial t} = Du + k(1-u)(u-a)u - uv$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \varepsilon(ku(u-1-b) - v)$$

$$\varepsilon = \varepsilon_0$$

где коэффициент диффузии $D=4$ возбудимость $k=8$, $\varepsilon_0=0.012$, порог $a=0.05$, $b=0.1$. Для моделирования дефекта мы используем круглую не возбудимую область с различными граничными условиями. Выяснилось, что спиральная волна, прикрепленная к препятствию с граничными условиями полного потока (полностью проникаемая граница), спонтанно распадается (рис. 24).

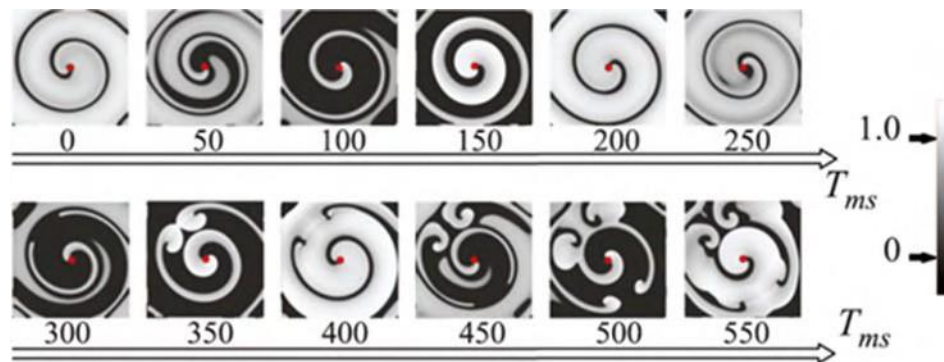


Рисунок. 24. Спиральная волна, прикрепленная к дефекту с радиусом $R = 15$. Поток через границу вызывает разрыв спиральной волны. Красным кружком показана аблированная зона с граничными условиями Дирихле. Оттенки серого показывают мембранное напряжение (u), светло-серый цвет указывает на деполяризацию ткани. Размер образца 512×512

Следующее моделирование было выполнено с теми же начальными условиями и размером дефекта, что и раньше, с той лишь разницей, что у невозбудимого дефекта в центре были граничные условия непроницаемости (фон Неймана) на его границе. В условиях отсутствия потока в течение 20 секунд (или 200 полных оборотов) разрыва вращающейся волны не произошло. Таким образом, можно сделать вывод, что поток через границу провоцирует разрыв. Мы измеряли период вращения спиральной волны в обоих случаях. Обычно период вращения определяется пройденным путем (периметром дефекта) и скоростью волнового фронта вблизи границы дефекта. Удивительно, но период вращения в случае полностью проникаемой границы оказался меньше, чем для непроницаемой, что означает, что скорость волны вблизи дефекта была выше.

Чтобы объяснить сокращение периода рефрактерности вблизи границы, мы использовали локальную модель Фитцхью-Нагумо для одной ячейки и описали поток как ток утечки ($I_{flux} = -d * u$).

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -d u + k(1-u)(u-a)u - uv \quad (4.13)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \varepsilon(ku(u-1-b) - v)$$

Как видно из формы изоклин вблизи границы (рис. 4.85), утечка вызовет повышение

порога (первое решение $\frac{\partial u}{\partial t} = 0$) или минимальные стимулы, другими словами, и уменьшение рефрактерного периода. Это замедлит первую волну, которая распространяется в этой зоне. Однако, когда вторая волна распространяется в не полностью восстановленной среде (близко к рефрактерной хвостовой части первой волны) проявляется воздействие остаточного ингибитора. Таким образом, мы рассматриваем этот остаточный ингибитор как константу в уравнении и делаем замену $u' = u - u_{residual}$. В этом случае порог будет уменьшаться в случае потока. В результате скорость второй волны будет увеличиваться. Возвращаясь к волне, вращающейся вокруг дефекта, если дефект достаточно мал для спиральной волны (периметр дефекта меньше длины волны), распространяющийся спиральный фронт будет взаимодействовать с рефрактерным хвостом спиральной волны, вызывая множественные разрывы волны. Таким образом, показано, что травматические дефекты могут быть аритмогенными из-за потока через их границу. Потoki могут генерировать сильную рефрактерную неоднородность, которая, в свою очередь, может создавать спиральную волну.

- V.N. Kachalov, N.N. Kudryashova, K.I. Agladze “Spontaneous spiral wave breakup caused by pinning” JETP Letters, 2016 DOI: 10.1134/S0021364016210025

Тест на аритмогенность на основе слоя кардиомиоцитов человека, полученных из ИПСК

Как было показано выше, взаимодействие распространяющихся волн с препятствием, в принципе, аритмогенно. Исходя из этого положения было решено разработать стандартный тест на аритмогенность, применимый для культуры сердечной ткани и пригодный для тестирования широкого ряда фармпрепаратов. Тест был предложен для сердечной ткани с измененным калиевым током, сходным с наследственной или

полученной каналопатией, проявляющейся у пациентов как синдром удлиненного интервала QT (LQTS).

Индукированные плюрипотентные стволовые (ИПСК) клетки от здорового индивидуума были дифференцированы в монослой кардиомиоцитов, который был идентифицирован с помощью иммуоцитохимии и техники пэтч-клампа. Чтобы изучить возникновение реентри в качестве предшественника аритмий, в клеточном слое было создано стандартное препятствие. С помощью оптического картирования определялась мера аритмогенности, определяемая вероятностью возникновения реентри для конкретной частоты стимуляции.

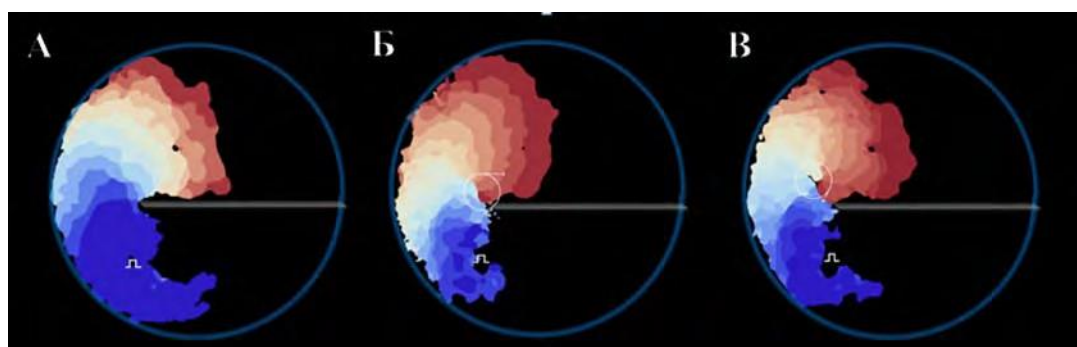


Рисунок 25. Фазовые карты распространения волны возбуждения по образцу с вызванным LQT2. Место стимуляции указано белой ступенькой: а) нормальное проведение; б) незначительный отрыв волны возбуждения от препятствия; в) образование реентри на препятствии. Прохождение волны возбуждения показано градиентом от синего к красному. Степень импульса обозначает место точечной стимуляции образца.

На рисунке 25 показаны фазовые карты части описанных режимов проведения на ткани и пограничных случаев между ними на модели с полностью заблокированным ИКг (моделирование LQT2 с помощью блокатора E4031 на сердечных клетках, дифференцированных из линии от донора без врожденных сердечно-сосудистых заболеваний iSMA6L). Синим цветом выделены края образца (диаметр – 15 мм), серым – стандартное препятствие, фазовые карты на образце показывают передний фронт волны в различные моменты времени. На рисунке 25а представлен случай распространения волны при частоте стимуляции 1 Гц, разрывы волн не наблюдаются. Это первый режим, режим нормального проведения. На рисунке 25б представлено проведение при частоте стимуляции 1,05 Гц. Из рисунка видно, что траектория фронта волны в окрестности препятствия меняется, наблюдается временный отрыв волны на конце острого препятствия. Это пограничный случай между первым и вторым режимом проведения, где происходит так называемый «подскок» волны на препятствии, при котором волна реентри

не возникает. На рисунке 25в показана стимуляция с частотой 1,1 Гц, которая является критической для данного образца, происходит отрыв волны от препятствия с образованием устойчивой спиральной волны (реентри).

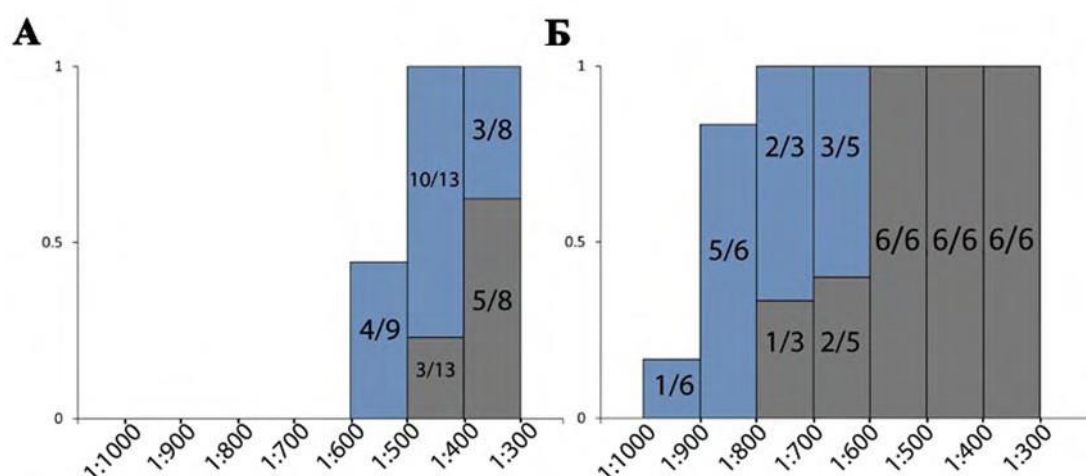


Рисунок 26. Мера аритмогенности для линии iSMA6L. Соответствующие частоты стимуляции указаны по горизонтальной оси в единицах импульс/м: а) контрольный случай (без добавления блокаторов); б) индуцированный LQT2 (1600 нМ E4031)

Мера аритмогенности, получаемая с помощью такого теста представлена на рисунке 4.85 в виде столбиковой диаграммы. Приведены меры аритмогенности для контрольного образца (линия iSMA6L, рисунок 4.85а), и для культуры человеческих кардиомиоцитов с индуцированным LQT2, который был вызван путем добавления 1600 нМ специфического блокатора IKr – E4031 (рисунок 4.85б). Столбцы представляют собой меры аритмогенности: синими столбцами обозначены случаи возникновения реентри, серым – неусвоение ритма, на столбиках дробью отображена доля таких случаев во всех проведенных экспериментах. В случаях нормального проведения и когда в эксперименте на заданной частоте не наблюдалось ни разрывы волн, ни неусвоения частоты стимуляции столбики на диаграмму не наносились.

С помощью меры аритмогенности стало возможно получать однозначно интерпретируемые и хорошо воспроизводимые данные о риске возникновении аритмии при различных частотах стимуляции. Такие данные могут быть перенесены в качестве рекомендательной информации при терапии пациентов. Нами были исследованы таким образом и опубликованы данные об аритмогенности ряда фармпрепаратов: эритромицин, циклофосфамид, ботулотоксин и др.

- M Slotvitsky, V Tsvelaya, S Frolova, E Dementyeva, K Agladze "Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer" Toxicological Sciences 168 (1), 70-77, 3, 2019.

Влияние параметров (возбудимости) среды на динамику реентри

Влияние изменяющихся во времени параметров на волны реентри исследовалось на фоточувствительной химической реакции БЖ. Изменение освещенности реактора позволяет менять кинетику протекающих химических процессов, влияя на возбудимость среды.

Резонанс спиральных волн в возбудимой распределенной среде

Михайловым и Давыдовым было теоретически предсказано, что периодическое изменение параметра, отвечающего за возбудимость среды вызовет циркуляцию ядра спиральной волны. Варьируя параметры активной среды, можно менять ее возбудимость. Пусть эта величина периодически меняется со временем по закону

$$g = g_0 + g_1 \cos(\omega t + \varphi)$$

причем $g_1 \ll g_0$, а частота модуляции ω близка к собственной частоте ω_0 спиральной волны. Оказывается, что при наличии модуляции g центр вращения спиральной волны уже не покоится, а начинает двигаться с течением времени по окружности. Радиус этой окружности R тем больше, чем ближе ω к собственной частоте ω_0 : $R \sim 1/(\omega - \omega_0)$, а скорость смещения центра пропорциональна амплитуде модуляции g_1 . При точном совпадении частот (т.е. при полном резонансе, когда $\omega = \omega_0$) центр спиральной волны должен смещаться с постоянной скоростью вдоль прямой. Направление смещения данной спиральной волны определяется начальной фазой модуляции φ и направлением вращения волны (по или против часовой стрелки). Этот эффект был полностью подтвержден в экспериментах на фоточувствительной (рутениевой) версии БЖ реакции.

- К.И. Агладзе, В.А. Давыдов, А.С. Михайлов "Наблюдение резонанса спиральных волн в возбудимой распределенной среде", - Письма в ЖЭТФ 1987, т. 45, стр 601-603.

Быстрое селективное устранение спиральных волн

Устранение спиральных волн предотвращает переход в хаотическое состояние в возбудимых средах различной физико-химической природы. В сердечной мышце, чтобы предотвратить сердечную смерть, спиральные волны обычно удаляются вместе со всеми распространяющимися волнами сильным электрическим током: 5 кВ, 20 А («дефибрилляция»). Мы нашли подход к гашению спиральных волн без разрушения нормально распространяющихся волн. В качестве экспериментальной модели

использовались волны химического возбуждения в пространственном открытом реакторе с управляемой светом реакцией Белоусова-Жаботинского. Мы нашли три разных сценария, в зависимости от скорости изменения света. (i) Когда интенсивность света быстро возрастала, спиральная волна потухала. (ii) Когда интенсивность света увеличивалась достаточно медленно, спиральная волна выживала, увеличивая свое ядро и уменьшая скорость вращения. (iii) Когда интенсивность света увеличивалась постепенно, с промежуточной скоростью, спиральная волна выживала, но на периферии появлялись многочисленные разрывы волн. Компьютерное моделирование показало, что полученные результаты являются общими и актуальными для возбудимых сред различной природы.

В качестве экспериментальной модели мы использовали пространственный открытый реактор со светочувствительной реакцией БЖ. Для контроля возбудимости среды использовалась интенсивность освещения. Была изучена простая регулярная волновая картина, состоящая из одной вращающейся спиральной волны, рис. 27.

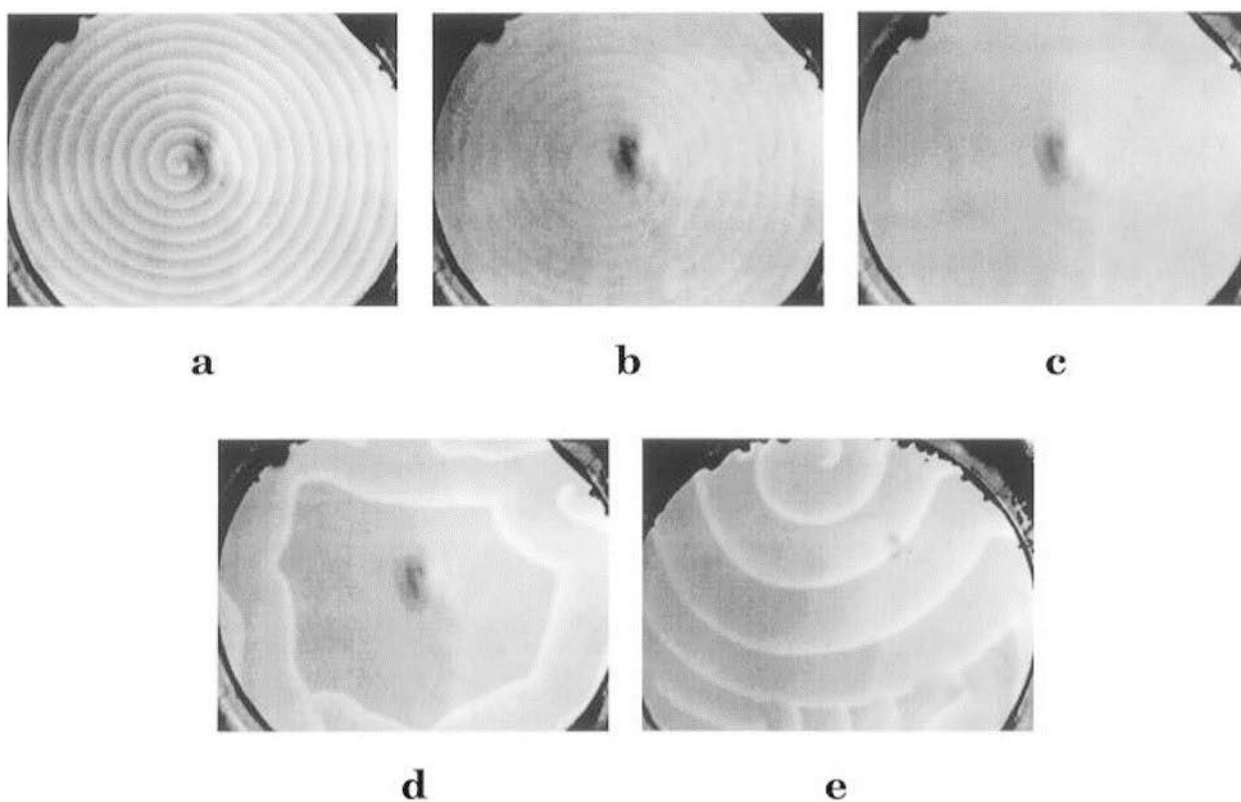


Рисунок 27. Гибель спиральной волны в реакции БЖ при мгновенном увеличении освещенности (от $0,8 \text{ мВт/см}^2$ до 12 мВт/см^2): (а) начальная спиральная волна (в почти темных условиях); (б) после включения освещения волны прекращают распространение и постепенно исчезают ($t = 30 \text{ с}$); (в) полное исчезновение волновой картины ($t = 2 \text{ мин}$); (д) волны спонтанно начинают распространяться от границ реактора при том же освещении, что и в частях б и д; (д) спиральная волна была получена при той же сильной интенсивности освещения.

Мы нашли три различных сценария развития волновой картины в зависимости от скорости изменения света. Во-первых, это «шок», когда переход из одного возбудимого состояния в другое происходил мгновенно (намного быстрее, чем скорость вращения спиральной волны), первоначальная спиральная волна полностью исчезла; волновая картина была устранена и, поскольку система оставалась возбудимой, через короткий промежуток времени развивалась заново, рис. 27. Второе — это «адаптация»: когда переход осуществлялся очень медленно (в характерном временном масштабе, около 100 периодов вращения спиральной волны между начальным и конечным состояниями), спиральная волна выжила, изменив свое ядро и изменив скорость вращения; в среде новых волн не наблюдалось, рис. 28. Третий - «прерывистая серия волн»: когда переход осуществлялся с умеренной скоростью, но недостаточно медленно, возникали многочисленные волновые разрывы на периферии спиральной волны; переход вызвал новые турбулентные элементы в схеме, рис. 29. Это означает, что при одинаковой амплитуде изменения возбудимости можно выбрать: (1) удалить «турбулентные» элементы волновой картины (спиральные волны); (2) не изменять волновую картину в общих чертах (все уже существующие спиральные волны выживают, новых вихрей не появилось); или (3) вызвать «турбулентность» (появляются многочисленные новые спиральные волны).

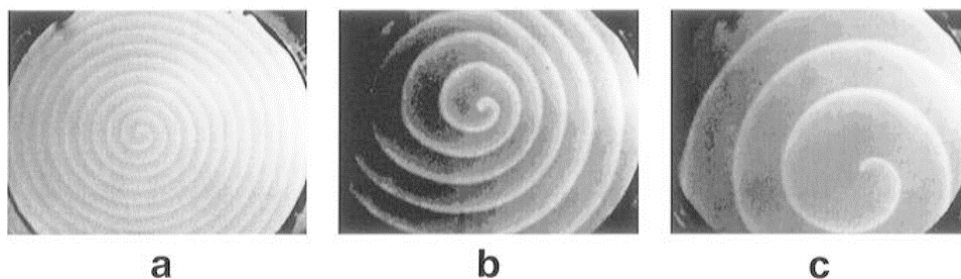


Рисунок 28. Адаптация спиральной волны к медленному увеличению освещенности. Освещенность I увеличивалась медленно, $0,8 \text{ мВт} / \text{см}^2$ за 3 мин: (а) спиральная волна в начале эксперимента, $I = 0,8 \text{ мВт} / \text{см}^2$; (б) $I = 9,6 \text{ мВт} / \text{см}^2$; (в) $I = 12,8 \text{ мВт} / \text{см}^2$.

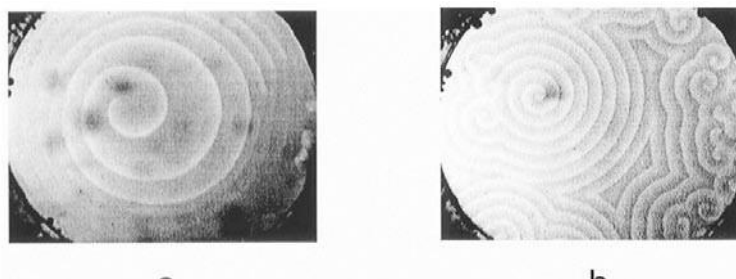


Рисунок 29. Волновые разрывы, появляющиеся при быстро - постепенном увеличении освещенности. Освещенность I увеличивалась со скоростью $0,8 \text{ мВт} / \text{см}^2$ в минуту: (а) волны, разорванные при $I = 11,2 \text{ мВт} / \text{см}^2$; (б) новые спиральные волны возникли из волн, когда интенсивность освещения I снизилась до $1,6 \text{ мВт} / \text{см}^2$.

Свет влияет на многие характеристики химической возбудимой среды. В численном моделировании легко изменить только выбранные параметры среды. Использовалась модифицированная модель Barkley:

$$U_t = U(1 - U)[U - U_{th}(V)] + \Delta U + \zeta$$

$$V_t = (U - V)/\tau(U, V)$$

Здесь U - переменная активатора, описывающая возбуждение, а V - переменная ингибитора; его медленная динамика отвечает за возвращение системы обратно в точку покоя. $U_{th}(V) = (V + a) / b$; a и b - параметры. a - амплитуда переменной V , b - порог возбуждения. $\tau(U, V) = \tau_1$ для $U > U_{th}$ или $\tau(U, V) = \tau_2$ для $U < U_{th}$. τ - характерная шкала времени: τ_1 - длительность импульса, а τ_2 - время восстановления (рефрактерность). ζ - небольшой аддитивный шум, который добавлялся на каждом временном шаге интегрирования как $U_{ij} = U_{ij} + 0,01\eta$, где η - случайное равномерно распределенное число, $-1 < \eta < 1$.

Компьютерное моделирование и теоретический анализ полностью подтвердили экспериментальные выводы. Интересно, что спиральная волна может быть устранена путем перехода в пространство параметров внутри области, где нормальное распространение волны не разрушается. Механизм элиминации весьма отличается от того, что уже известно из экспериментов и численного моделирования: аннигиляция двух встречно вращающихся спиралей, столкновение спирали с границей, глобальное подавление распространения волн. Единственный известный быстрый метод одновременного разрушения множества вращающихся спиралей — это дефибрилляция сердечной мышцы очень сильным электрическим током (5 кВ, 20 А), который разрушает все распространяющиеся волны вместе с вращающимися спиралями. Вполне естественно, что он также повреждает возбудимые клетки. Наш метод является другим подходом, который позволяет исключать только спиральные волны, без подавления нормально распространяющихся волн, и требует меньшего (и, надеюсь, менее разрушительного) вмешательства.

- K. Agladze, V. Voignier, E. Hamm, F. Plaza, V. Krinsky "Fast Selective Elimination of Spiral Waves", J. Phys. Chem., 100 (48), pp 18764-18769, 1996.

Светоиндуцированный коллапс пары спиральных волн

Один из гипотетических механизмов уничтожения спиральных волн — это вынужденное столкновение близко расположенной пары волн вращающихся навстречу

друг другу. При этом считалось, что достаточно заставить ядра спиральных волн двигаться навстречу друг другу, так, чтобы они наложились одно на другое. Однако, оказалось, что ситуация не столь проста. Для двух вращающихся в противоположных направлениях спиралей расстояние между их кончиками периодически изменяется. И результат: аннигиляция или выживание пары зависит от фазы вращения спиралей. Мгновенное уменьшение возбудимости среды с помощью изменения интенсивности освещения производилось в двух разных случаях: один - когда кончики были на максимальном расстоянии, а второй - на минимальном.

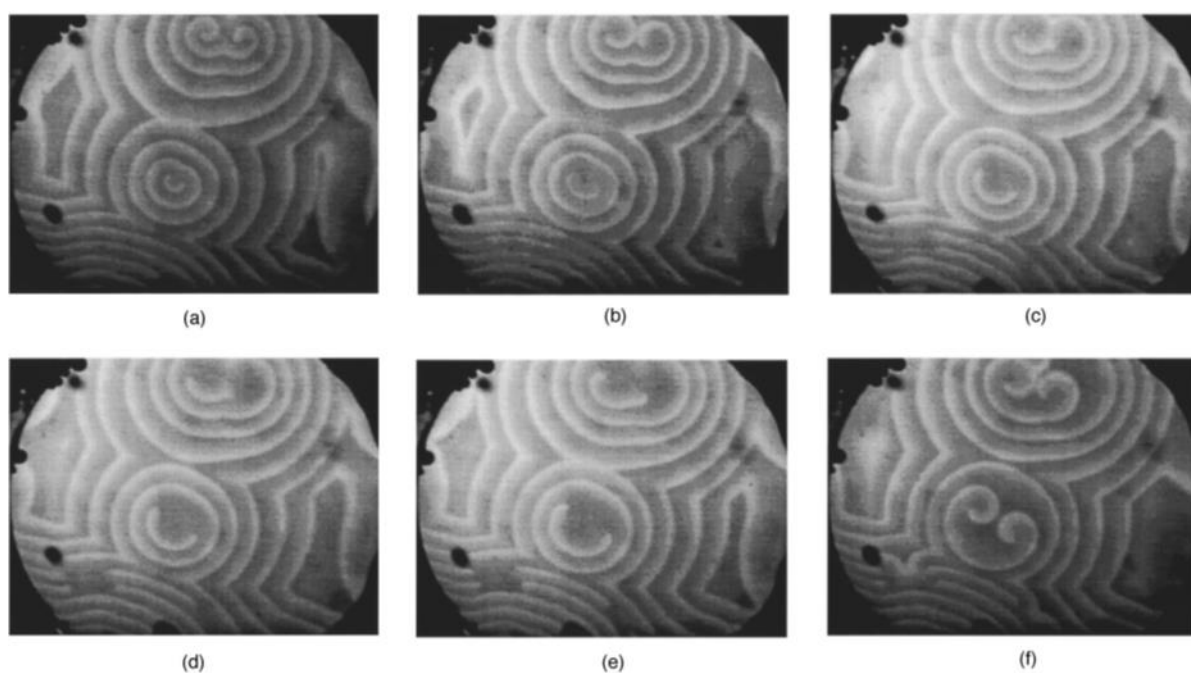


Рисунок. 30. Пространственное разделение пары спиральных волн в центре кадра при мгновенном увеличении освещенности. а) Интенсивность света увеличивалась с 1 до 7,0 мВт/см² в тот момент, когда кончики двух спиралей находились на наибольшем расстоянии; б-д) вершины спиральных волн распространяются без вращения; е-ф) вращение спиральной волны возобновляется. Видимый диаметр диска реактора составляет 21,7 мм.

На рис. 30 показано разделение двух спиральных волн в центре кадра при освещении светом. Начальное расстояние между их кончиками составляло 1,5 мм. Интенсивность света мгновенно увеличивалась с 1 до 7 мВт/см². На рисунке 4.99а показан момент, когда вершины двух близко расположенных спиральных волн находились на максимальном расстоянии и интенсивность света была увеличена. При сильном световом освещении волны продолжают распространяться, но вершины спиральных волн дрейфуют с распространяющейся несущей волной без вращения, 30б-30д. Когда вращение кончиков

было восстановлено, расстояние между ядрами спиральных волн увеличилось до 6,1 мм, рис. 30е - 30f.

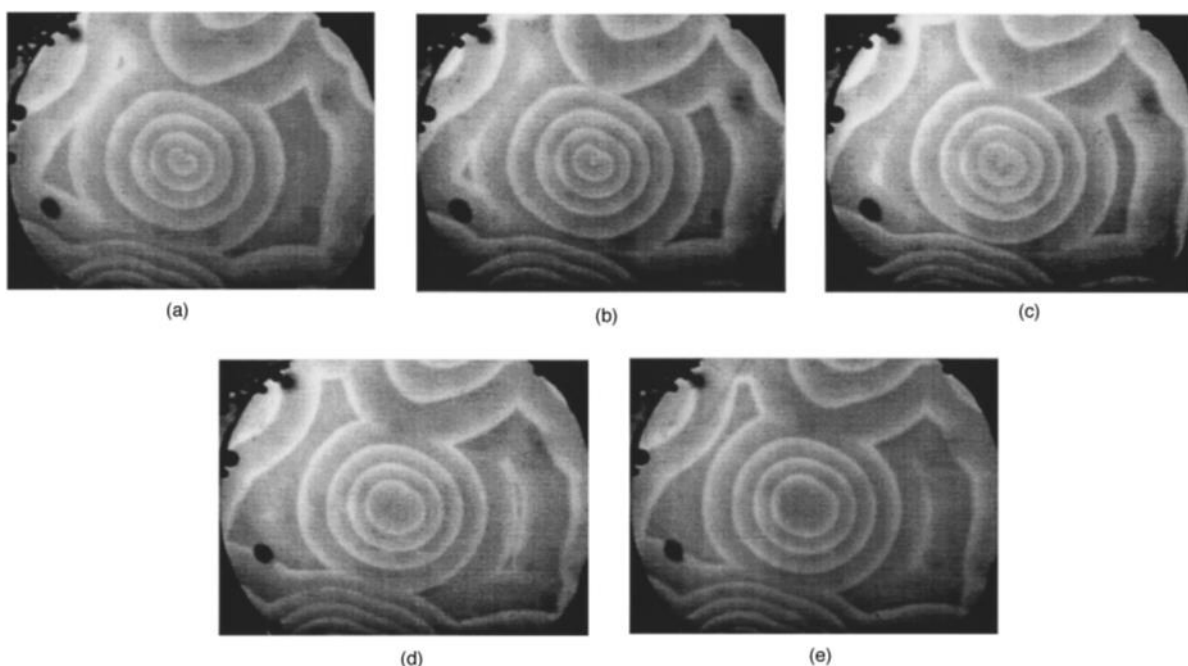


Рисунок 31. Аннигиляция пары спиральных волн при мгновенном увеличении освещенности. а) интенсивность света увеличивалась с 1 до 7,0 мВт/см² в тот момент, когда кончики двух спиралей находились на минимальном расстоянии; б) и в) прорастание вершин прекратилась, там остался крошечный фрагмент фронта волны; г) пара спиральных волн разрушилась. Видимый диаметр диска реактора составляет 21,7 мм.

На рис. 31 показано гашение двух спиральных волн при тех же условиях, что и на рис. 30, за исключением фазы вращения спиральных волн. Дальнейший экспериментальный и вычислительный анализ показал, что основой механизма светоиндуцированного коллапса является сдвиг ядра спиральной волны в ответ на быстрое изменение освещенности (или возбудимости в компьютерных экспериментах). Величина этого сдвига тем больше, чем больше перепад освещенности, рис. 32. А направление сдвига определяется фазой вращения спиральной волны.

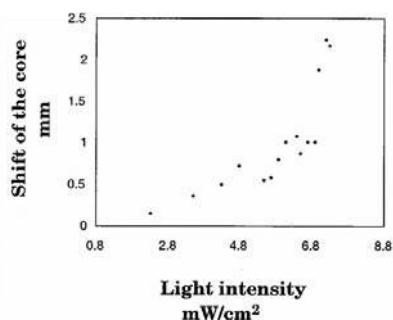


Рисунок 32. Зависимость величины сдвига спиральной волны от амплитуды изменения света

Реальные физические и биологические возбудимые системы часто анизотропны. Например, сердце имеет волоконную структуру с выраженной анизотропией. В химической активной среде типа Белоусова-Жаботинского анизотропия означала бы различие коэффициентов диффузии в разных направлениях. Экспериментально реализовать подобный сценарий, в принципе, возможно двумя путями: либо использовать для наблюдения волн жидкокристаллическую структуру (неактивную химически для реакции БЖ), либо задать переменный коэффициент связи между отдельными микрообъемами реагирующего раствора. Мы пошли по второму пути и использовали технику печати катализатора БЖ реакции батоферроина на полисульфонном фильтре. Печатаемая картина представляла собой сетку из крошечных "химических диодов", размером 1мм × 1мм. Полученная дискретная система обладала как свойством анизотропии, так и асимметрии, более или менее выраженной в зависимости от размера "щели" отдельного "химического диода". Распространение волны в такой среде было не круговым, а квазиэллиптическим, а спиральная волна спонтанно дрейфовала. Подробное описание метода и полученных результатов сделано в С. Dupont, К. Agladze, V.Krinsky "Excitable medium with left - right symmetry breaking", Physica A, 249, n.1-4, pp. 47-52, 1998. Разумеется, подобные системы могут иметь главным образом иллюстративное значение, демонстрирующее поведение автоволн при наличии анизотропии и асимметрии в системе. Культура сердечной ткани в этом аспекте гораздо ближе к реальному сердцу.

Данный раздел посвящен экспериментальному моделированию анизотропного распространения возбуждения в культурах сердечных клеток.

Нановолоконные подложки для создания анизотропной культивированной сердечной ткани

Мы разработали систему *in vitro* для конструирования сердечной ткани с контролируемой анизотропией путем выращивания клеток на сетке, состоящей из полимерных нановолокон. Сетка представляет собой слой нановолокон, полученных с помощью электроспиннинга (электроформования), либо отпечатанный на покровном стекле, либо подвешенный в пространстве на держателе из полидиметилсилоксана (PDMS). Электроспиннинг позволяет манипулировать рядом параметров, чтобы определить конфигурацию сетки, в частности ориентацию волокна (например, случайное

или выровненное), плотность позиционирования волокна (то есть количество собранных волокон на мм) и длину волокна. Взвешенные нановолокна без субстрата обеспечивают достаточную поддержку прикрепляющимся и растущим клеткам, которые образуют возбудимую сеть со структурой, напоминающей ажурную ткань, рис. 7.

Распространение волн возбуждения в анизотропной культуре тканей сердца

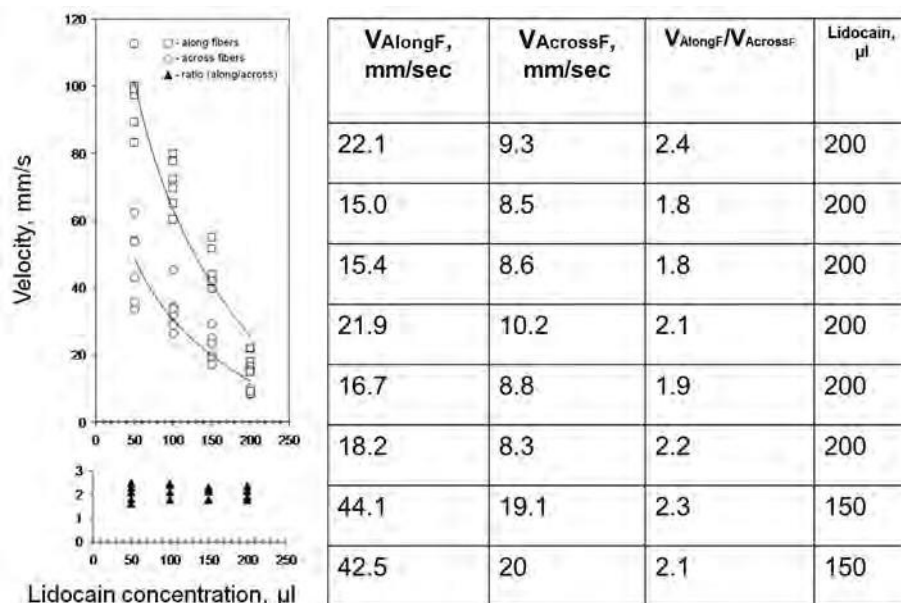


Рисунок 33. Зависимость соотношения скоростей распространения возбуждения в анизотропной культуре ткани от концентрации лидокаина.

Использование полимерных волокон позволило получить культуры с кардиомиоцитами, ориентированными вдоль них. Скорость распространения волны возбуждения оказалась существенно выше вдоль волокон. Соотношение скоростей вдоль и поперек волокон приведено на рис. 33. Сочетание областей с различным направлением волокон позволило создавать слои кардиомиоцитов с однородной возбудимостью по слою, но с различной анизотропией проведения возбуждения. При этом исследовалась аритмогенность подобных границ.

- Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. "Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue." *Biomaterials*. 2011 Aug ;32(24): 5615-24. Epub 2011 May 20

- NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, LV Selina, K Agladze “Arrhythmogenic role of the border between two areas of cardiac cells alignment” Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2014) 76, pp. 227-234.

Распространение волн возбуждения в культивированной многодоменной ткани сердца

Электроспиннинговые маты широко используются в современной инженерии сердечной ткани в качестве субстрата для выращивания клеток. Субстрат с хаотически ориентированными нановолокнами приводит к росту сердечной ткани со случайно ориентированными, но внутренне морфологически анизотропными кластерами или доменами. Доменная структура влияет на стабильность распространения возбуждения, и мы исследовали устойчивость распространяющихся волн возбуждения в зависимости от среднего размера доменов и прикладываемой извне частоты стимуляции. В экспериментальной модели, основанной на монослоях сердечной ткани новорожденных крыс, а также в компьютерном моделировании, мы обнаружили, что увеличение размеров доменов приводит к уменьшению критических частот стимуляции, тем самым подтверждая, что более крупные домены имеют более высокий аритмогенный эффект.

Варьируя плотность позиционирования нановолокон, мы получили морфологически структурированные сердечные монослои с различным средним размером доменов. Затем мы применили внешнюю электростимуляцию с разными частотами к слоям ткани с различными масштабами кластеров и наблюдали за их функционированием с помощью оптического картирования.

Для компьютерного моделирования использовалась двухвариабельная модель Алиева-Панфилова распространения волн в сердечной ткани:

$$\frac{du}{dt} = \nabla[D(x)\nabla u] + cu(1-u)(u-a) - u$$

$$\frac{dv}{dt} = (\epsilon_0 + \mu_1 v / (\mu_2 + u)) [cu(1+a-u) - v]$$

где u - потенциал мембраны, v - переменная восстановления, $D(x)$ матрица коэффициентов связи, c - является возбудимостью, a - является порогом возбуждения, и, наконец, параметры μ_1 , μ_2 и ϵ являются специфичными для этой модели и оптимизированы для подгонки потенциала действия.

Одной из наиболее важных задач компьютерного моделирования было создание карты анизотропных кластеров, которая воспроизводящей основные особенности реального кластеризованного сердечного монослоя, таких как: размер кластера, коэффициент анизотропии в кластерах и средний коэффициент связи в образце. Во-первых, была сделана триангуляция двумерного образца с периодическими граничными условиями. Таким образом, характерный размер треугольника определяет характерный размер домена. Затем было назначено случайное предпочтительное направление φ каждому узлу сети. Поэтому мы определяем матрицу коэффициентов связи во всех вершинах треугольника следующим образом:

$$D = \begin{pmatrix} \lambda_1 \cos^2 \varphi + \lambda_2 \sin^2 \varphi & (\lambda_1 - \lambda_2) \sin \varphi \cos \varphi \\ (\lambda_1 - \lambda_2) \sin \varphi \cos \varphi & \lambda_1 \sin^2 \varphi + \lambda_2 \cos^2 \varphi \end{pmatrix}$$

где λ_1 и λ_2 - коэффициенты связи вдоль и поперек предпочтительного направления.

Наконец, мы интерполируем D внутри треугольника. Так как два коэффициента в D равны, мы можем переписать предыдущее уравнение как

$$D = \begin{pmatrix} P & R \\ R & Q \end{pmatrix}$$

и интерполировать (P, Q, R) . В результате этой операции центры треугольников становятся менее анизотропными, чем узлы и ребра (рис. 34.). После корректировки параметров (распределения λ_1 и λ_2 на рисунке 35), получаем модель возбудимой среды, относящейся к клеткам, кластеризованным на нановолоконной сети. После установления различных карт $D(x)$ с различными размерами доменов, контролируемых триангуляцией, можно найти зависимость поведения волн возбуждения от частоты стимуляции. Было обнаружено, что волновые серии демонстрируют три различных способа распространения для фиксированного размера области A) Частота является высокой: не все стимулы могут вызывать волну в соответствии с рефрактерной зоной предыдущего. Б) Волны взаимодействуют, пересекая рефрактерную зону. Волны могут распадаться или образовывать спирали. В) частота низкая. Волны распространяются практически независимо, без каких-либо возмущений (рис. 36).

Применяя различные частоты стимуляции, мы определили максимальную частоту в покрытых волокнами и не содержащих волокон частях образца. Был протестирован диапазон доменов 5–200 мкм и установлено, что большие размеры доменов приводят к уменьшению критических частот, рис. 37А,В. Таким образом, эти результаты показывают, что сердечные импланты-заплатки различной морфологии могут вести себя по-разному в

миокарде реципиента в ответ на различные ритмы стимуляции и при превышении критической частоты могут являться источниками аритмий.

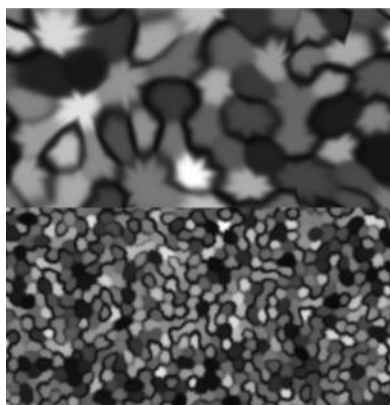


Рисунок 34. Карта отношения анизотропии (λ_1/λ_2) с периодической границей для разных размеров доменов. Поскольку интерполяция выполнена в пространстве (P, Q, R), некоторые кластеры разделены областями с низкой анизотропией (черные), а в некоторых соседних кластерах предпочтительное направление было просто повернуто, без значительного изменения анизотропии.

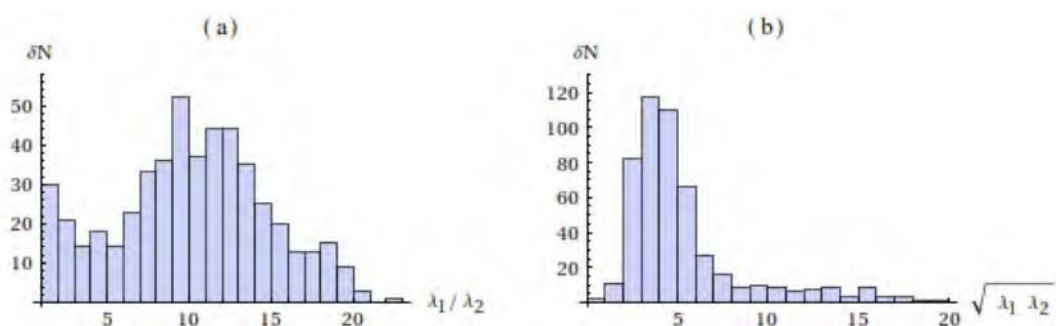


Рисунок 35. Распределение коэффициента анизотропии (λ_1/λ_2) (а) и средней связи $\sqrt{\lambda_1 \lambda_2}$ (б)

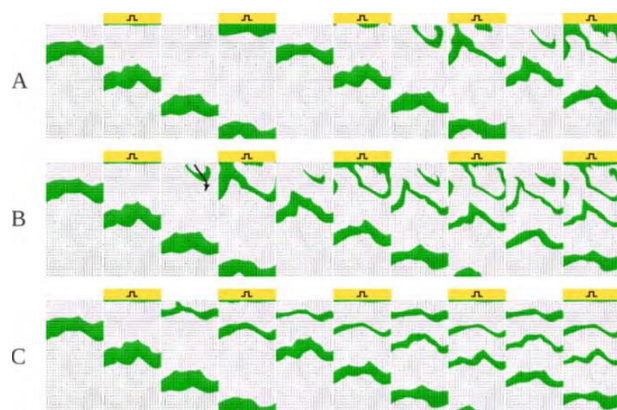


Рисунок 36. Режимы распространения волн возбуждения при различной частоте стимуляции. Деполяризованные области, где $u \neq 0$, показаны серым цветом. Стимуляция проводилась на верхней границе образцов в моменты времени отмеченные квадратным импульсным знаком.

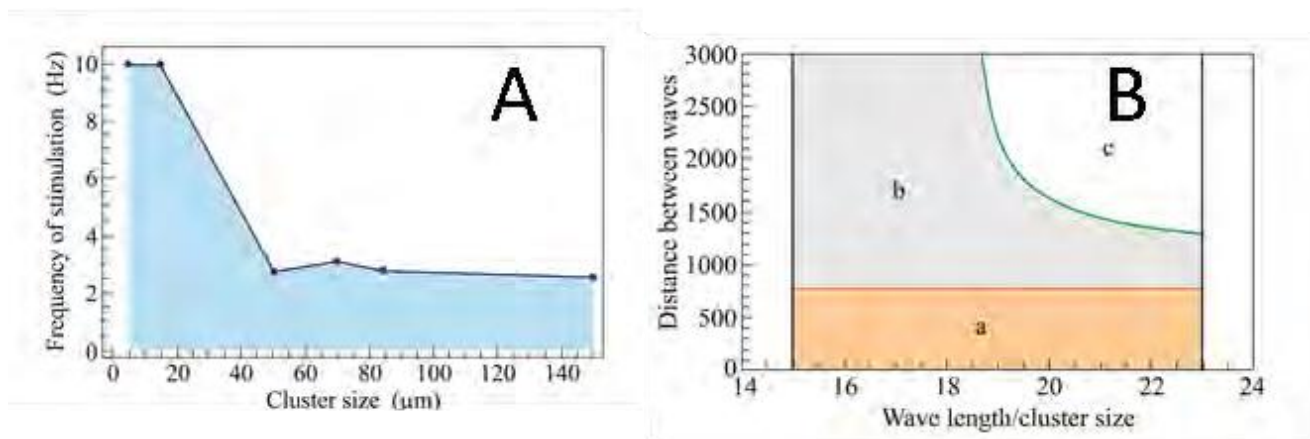


Рисунок 37. Критическая частота стимуляции для доменов различных размеров.

А) измеренная в эксперименте. В) полученная в результате моделирования.

Наши результаты показывают, что при изготовлении каркасов для инженерии сердечной ткани очень важно контролировать архитектуру электроформованных нановолокнистых матов для достижения менее аритмогенных сердечных имплантатов. Плотность волокон может быть рассчитана из особенностей распространяющихся волн возбуждения, таким образом, чтобы результирующие ячейки доменов были размером меньше, чем характерная длина волны в системе.

- NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, LV Selina, K Agladze "Arrhythmogenic role of the border between two areas of cardiac cells alignment" Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2014) 76, pp. 227-234.

- NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, KI Agladze "Excitation wave propagation in a patterned multi-domain cardiac tissue" JETP Letters (2015) 101, pp. 869-872.

Способы терминции волны реентри

Поскольку часто волны реентри играют нежелательную роль, как, например, в сердце, важно уметь их подавлять. В принципе, возможны 4 способа терминции вращающихся волн:

1. Перевод всей среды в невозбудимое состояние, когда распространение волн становится невозможным. Этот простейший механизм терминции мы дальше рассматривать не будем: с его действием все ясно. Заметим, что этот универсальный способ работает как в ограниченных пространственно, так и в неограниченных средах.
2. В среде ограниченных размеров, изменение параметров среды таким образом, что при сохранении способности распространения возбуждения в среде, размер ядра

вращающейся волны становится больше размеров среды. Таким образом, среда не в состоянии поддерживать вращение волны, и она исчезает.

3. Вызывая дрейф реентри, заставить ядро волны столкнуться с невозбудимой границей среды.

4. Вызвать столкновение двух разнонаправленных волн реентри. В результате столкновения возникает топологически круговая волна, а циркуляция прекращается. Заметим, что строго говоря, случай (3) является частным случаем сценария (4), т.к. столкновение ядра волны с границей приводит к "прилипанию" кончика волны к невозбудимой границе, и движению его по направлению к другому кончику (палка имеет два конца) до их исчезновения. С точки зрения практического применения в современной кардиологии, главным образом, используются способы (2) и (3). На них мы остановимся в этой главе наиболее подробно.

Изменение параметров среды к состоянию, не позволяющему вращение волны

В настоящее время считается, что основной механизм действия сердечных антиаритмиков — это увеличение размеров ядра реентри до такой степени, когда циркуляция становится невозможной. Однако, несмотря на отдельные попытки визуализировать процесс подавления реентри в сердце, основные первичные данные о перспективности препарата, как антиаритмика, получают из записей электрической активности отдельной клетки. Нами была поставлена задача создания тканево-инженерной экспериментальной модели, позволяющей четкую визуализацию реентри и его ядра под действием фармпрепаратов. При этом модель кардиомиоцитов родентов не годится, т.к. у родента и человека мембранные токи (главным образом, калиевые) различаются.

На рисунке 38 показана динамика распространения спиральной волны до и после применения нифекаланта. Объединенные изображения на правой панели рисунка 38А-С показывают дозозависимое увеличение размера невозбуждаемой области. Изменение не возбудимой области (спиральное ядро) было статистически значимым ($n = 4$, рис. 38D). На рисунке 39 показано дозозависимое увеличение невозбудимых областей с помощью соталола, хинидина и E-4031. Средние эффективные дозы лекарств, подавляющих спиральные волны, приведены на рисунке 38D. В модели препятствий, полученной из NRVM, E-4031 не изменил размер спиральной сердцевины и не прекратил спиральные волны. Таким образом, было показано, что (1) слои сердечных клеток, полученные из стволовых клеток человека, могут имитировать сердечную ткань с соответствующими

электрофизиологическими и биофизическими свойствами, (2) что слои сердечных клеток, полученных из стволовых клеток человека, могут служить моделью для исследования аритмогенеза (3) что изменения плотности и распределения клеток могут влиять на индукцию спиральных волн, и (4) что такие слои сердечных клеток, полученные из hPSC, могут реагировать на несколько антиаритмических препаратов и, таким образом, служить в качестве платформы для тестирования антиаритмических препаратов.

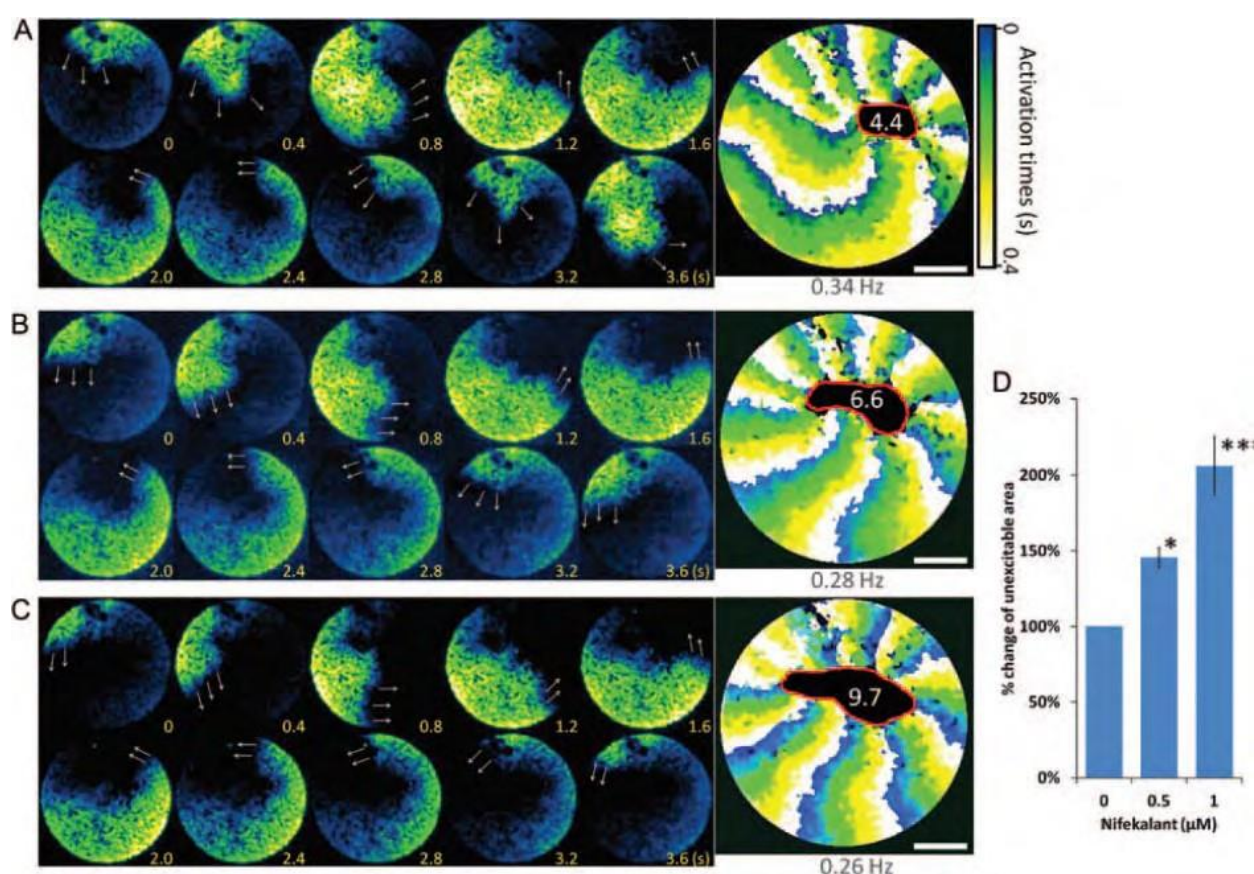


Рисунок 38. Распространение спиральной волны и эффекты нифекаланта. (A – C) Динамика распространения спиральной волны с Fluo-4 до (A) и после введения 0,5 мМ (B) или 1,0 мМ (C) нифекаланта. Цифры в правом нижнем углу панели показывают время на второй шкале времени. Объединенные карты времени активации показаны на правой панели. Площадь возбудимого спирального сердечника (мм²) увеличивалась в зависимости от дозы. Красные линии - траектории кончиков спиральных волн. Числа внизу каждого объединенного изображения показывают частоты вращения (Гц). Цвета в объединенных изображениях обозначают разные фазы возбуждения, белым цветом показан фронт волны возбуждения. Интервал белой линии: 400 мс. Шкала: 2,5 мм. (D) Смена участка до и после нифекаланта. * P, 0,05, ** P, 0,01 против 0 μM

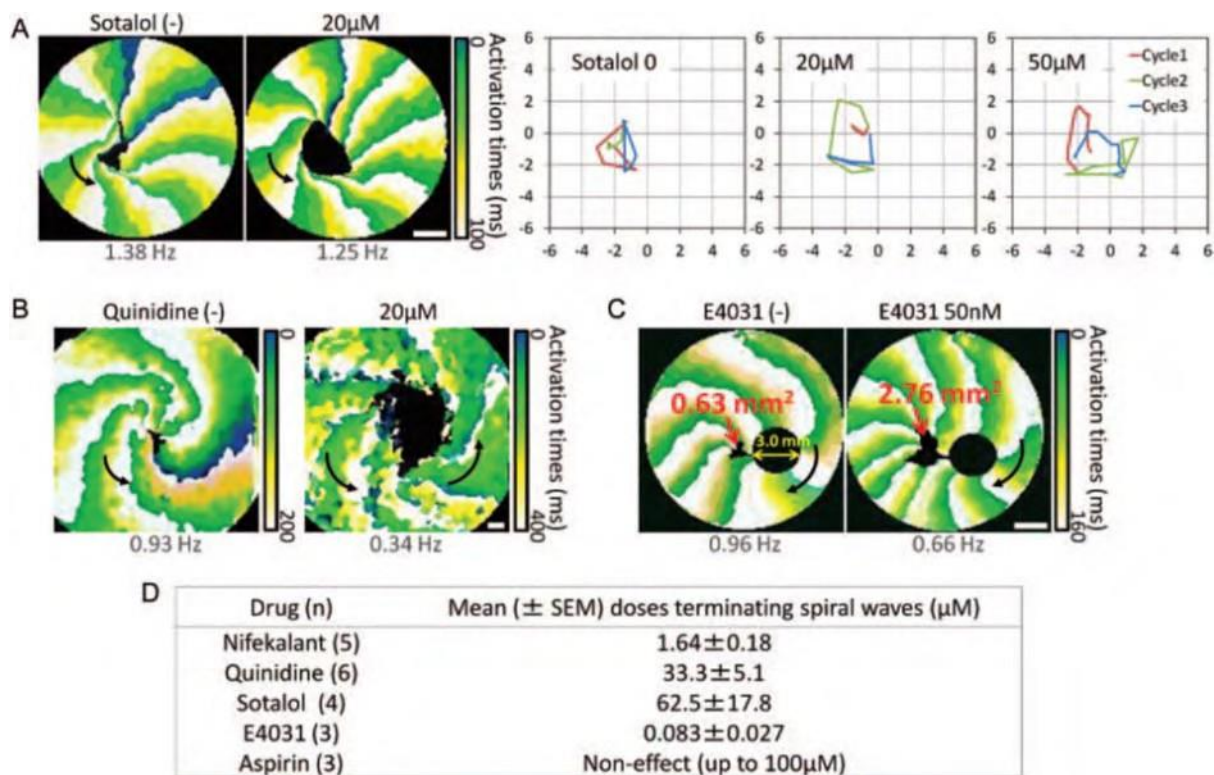


Рисунок 39. Эффект антиаритмических препаратов. (А) Объединенные изображения распространения спиральной волны с Fluo-4 до и после обработки соталолом в 12 мм листе.

Траектории кончиков спиральных волн показаны на правых панелях в течение трех последовательных циклов (красный, зеленый и синий). Оси X и Y расположены на слое клеток, начало координат - центр слоя клеток. (В) Объединенные изображения с Fluo-4 до и после обработки хинидином на 35 мм слое. (С) Объединенные изображения с Fluo-4 до и после обработки E4031 в модели препятствий. Диаметр препятствия составлял 3,0 мм. Числа внизу каждого изображения показывают скорости вращения (Гц; А – С). Интервал белой линии: 100 мс (А), 200 мс (В слева), 400 мс (В справа), 160 мс (С). Шкала: 2 мм (А – С). (D) Средние дозы лекарств, эффективные для прекращения спиральных волн.

- S Kadota, I Minami, N Morone, JE Heuser, K Agladze*, N Nakatsuji “Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets.” Eur Heart J. 2013 Apr;34(15):1147-56. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418. Epub 2012 Nov 30

Терминация спиральной волны с помощью ее пре-дестабилизации

В настоящее время существует согласие между биофизиками и кардиологами, что терминация реентри основана на фармакологическом увеличении минимального пути циркуляции реентри или, другими словами, увеличении ядра вращающейся волны. Затем

предполагается, что это увеличение характерного размера реентри должно привести к одному из двух сценариев прекращения. Первый и самый простой, одношаговый сценарий, предполагает, что вращающаяся волна просто наталкивается на собственный рефрактерный хвост и не может распространяться в не восстановленной ткани. Этот эффект легко описать в квазиодномерном случае как вращение волны возбуждения в виртуальном кольце. В настоящем сердце это будет означать, что для реентри недостаточно размера всего сердца. Другой, более сложный, двухэтапный сценарий основан на том факте, что свободно вращающаяся спиральная волна имеет тенденцию мигрировать в неоднородной возбудимой среде, и единственно стабильно вращающиеся волны — это те, которые привязаны к некоторым локальным неоднородностям. Мигрируя (или дрейфуя), вращающаяся волна практически неизбежно попадает на границу возбудимой ткани и перестает существовать.

Уменьшая интенсивность ультрафиолетового излучения, мы могли эффективно снизить возбудимость образца ткани, имитируя добавление антиаритмического препарата. Эксперимент по прекращению вращающейся волны проводился следующим образом. Сначала в слое кардиомиоцитов создавали область, свободную от клеток, путем осторожного удаления клеток острым концом иглы шприца, контролируемого микроманипулятором. Эта область, как правило, около 2 - 3 мм в диаметре, служила препятствием, закрепляющим вращающуюся волну. Затем начальная интенсивность УФ-излучения была установлена равной 7 мВт/см², и с помощью ускоряющей стимуляции была получена вращающаяся волна. Примерно в 50% случаев образовавшаяся волна реентри самопроизвольно прикреплялась к препятствию, если нет - она сдвигалась [до тех пор, пока не происходило прикрепление. Результирующая спиральная волна показана на рис. 40. Полученную вращающуюся волну наблюдали в течение примерно 10 минут, чтобы убедиться в ее стабильности. После этого интенсивность УФ-излучения снизилась до 2,5 мВт/см², и динамика вращательной волны регистрировалась до тех пор, пока она не исчезла. В конце, после прекращения спиральной волны, возбудимость культуры клеток проверяли электрическим иницированием возбуждения, чтобы удостовериться, что прекращение было результатом динамики спиральной волны при уменьшении возбудимости, а не полного подавления возбудимости.

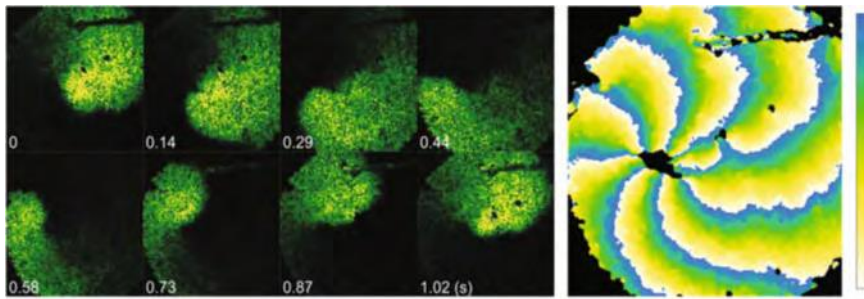


Рисунок 40. Спиральная волна, прикрепленная к препятствию. Слева: временная последовательность вращения спиральной волны. Справа: карта активации. Тень на верхней части изображения обусловлена возбуждением электрода.

После уменьшения интенсивности ультрафиолетового излучения мы наблюдали рост ядра спиральной волны - области, вокруг которой движется острие спиральной волны. На рис. 41 показана траектория кончика спиральной волны, а также график роста площади ядра в зависимости от времени.

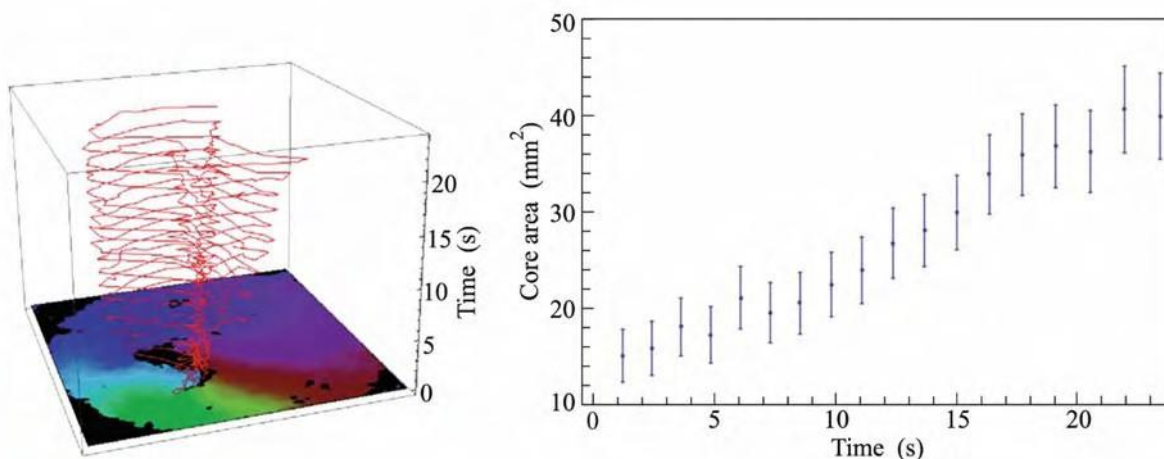


Рисунок 41. Рост ядра спирали после уменьшения УФ-облучения. Слева: траектория вершины спиральной волны. Справа: график площади ядра от времени.

Рост ядра спиральной волны обычно был асимметричным, скорее всего, из-за естественных неоднородностей клеточной культуры. Как правило, растущее ядро приближается с одной стороны к периферической неоднородности или краю образца, образуя отчетливое сужение на пути распространения возбуждения. Через некоторое время волна реентри погибала либо при столкновении с границей, либо в узком перешейке в результате так называемого несоответствия сток-исток.

- Erofeev IS, Agladze KI. Formation of virtual isthmus: new scenario of spiral wave death after decrease of excitability. JETP Lett. 2015; 102(10): 780-784.

Терминация волн реентри с помощью синхронизации и вынужденного дрейфа

Возможность дрейфа спиральной волны под действием синхронизирующих волн была впервые показана на химической активной среде. Этот процесс проиллюстрирован на рис. 42. Под действием синхронизирующих волн спиральная волна медленно (со скоростью на порядок меньше, чем скорость распространения волн) дрейфует в сторону от источника. Скорость дрейфа тем больше, чем больше соотношение частот синхронизации и частоты спиральной волны. Если на ее пути оказывается невозбуждаемая граница - спиральная волна погибает, столкнувшись с ней.

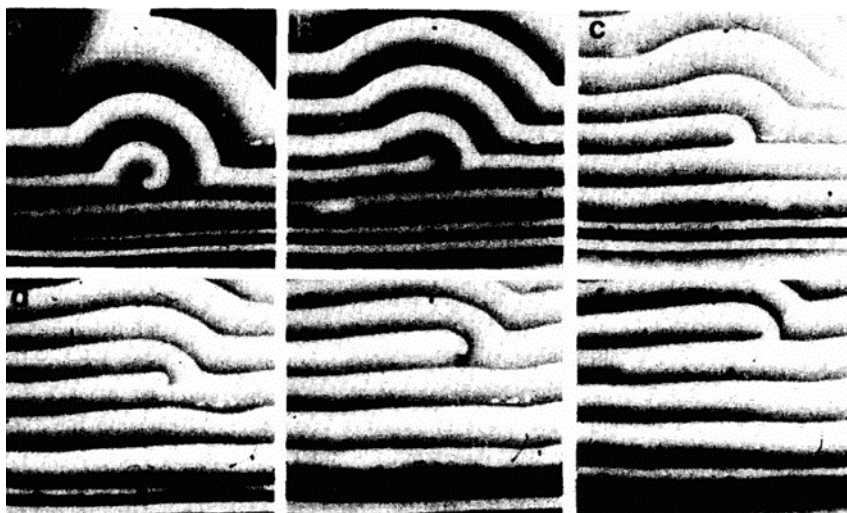


Рисунок 42. Дрейф спиральной волны S_1 , индуцированный высокочастотными волнами. Плоские волны распространяются от электрода, который виден как черная полоса в нижней части рисунка. Плоские волны с более высокой частотой превращают спиральную волну а) в волновой разрыв б). Этот разрыв волны закрывается на следующей волне с), что приводит к разрыву этой последней г). Этот процесс периодически повторяется (сравните с и f, b и e), вызывая медленный дрейф отрыва от электрода. Период спиральной волны $S \sim$ равен 50 с, а период плоских волн - 40 с. Интервал времени между кадрами составляет 4 минуты.

Дрейф волны схематично показан на рис. 43. Медленный дрейф является результатом двух быстрых противоположных движений. Во-первых, волновой разрыв развивается в спираль (кадры а и б), перемещаясь вниз, противоположно другим волнам. Круговая часть волны 1 и волны 2 аннигилируют при столкновении, и, таким образом, разрыв волны переносится на следующую волну (кадр с). Во-вторых, волновой разрыв движется вверх с той же скоростью, что и все другие волны в среде, покрывая расстояние $\delta_{\uparrow}$, которое определяется временем процесса восстановления, после чего инволюция происходит снова (кадр d). Таким образом, весь процесс повторяется. Результирующий сдвиг волнового разрыва за один цикл равен $\delta = \delta_{\uparrow} - \delta_{\downarrow}$, где $\delta_{\downarrow}$ - нисходящий сдвиг волны. На

рис. 43 показано, что $\delta_{\downarrow} = x_{1a} - x_{2c}$ и $\delta_{\uparrow} = x_{2d} - x_{2c}$, где x_{1a} - координата волны 1 в кадре а, x_{2c} - координата волны 2 в кадре с и т. д. Предполагая, что скорость волны в среде не зависит от направления, и что инволюция обрыва волны (кадр d) начинается после завершения процессов восстановления, мы получаем

$$\delta_{\downarrow} = \lambda_p/2, \delta_{\uparrow} = \lambda_s - \lambda_p/2 \text{ и, наконец, } \delta = \lambda_s - \lambda_p$$

$$v_{dr} = v(1 - T_p/T_s)$$

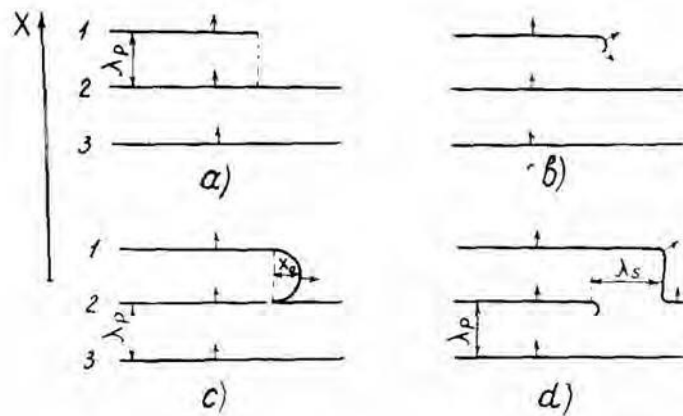


Рисунок 43. Схема вынужденного дрейфа спиральной волны.

Обнаружение эффекта вынужденного дрейфа на реакции БЖ, а затем несколькими исследователями - на компьютерных моделях поставили вопрос о существовании этого эффекта в реальной сердечной ткани. В наших экспериментах было показано, что волна реентри, вызванная в слое культивированных кардиомиоцитов под действием высокочастотной стимуляции дрейфует и может быть уничтожена. Мы решили эту проблему, наблюдая волны возбуждения в реальном времени с помощью конфокальной микроскопии. Пространственно-временное разрешение записей было достаточным для отслеживания траектории кончика спиральной волны в интерактивном режиме. Используя этот метод, мы визуализировали взаимодействие кончика спиральной волны с волновым фронтом цуга волн.

Инициация и терминация вращающейся волны были изучены в общей сложности ~ в 100 клеточных культурах. Индивидуальный образец на покровном стекле использовался несколько раз; то есть после прекращения реентри оно снова вызывалось и снова подвергалось высокочастотной стимуляции. Стабильность вращающейся волны и успех или неудача протокола кардиостимуляции были определены из флуоресценции Ca^{2+} ,

полученных из интересующей области в поле зрения. Чтобы наблюдать взаимодействие спиральной волны с синхронизирующими волнами, мы запустили стабильно вращающуюся спираль и отрегулировали поле зрения так, чтобы ее кончик был в центре. Движение кончика контролировали в течение ~ 1 минуты, чтобы подтвердить стабильность. Затем с

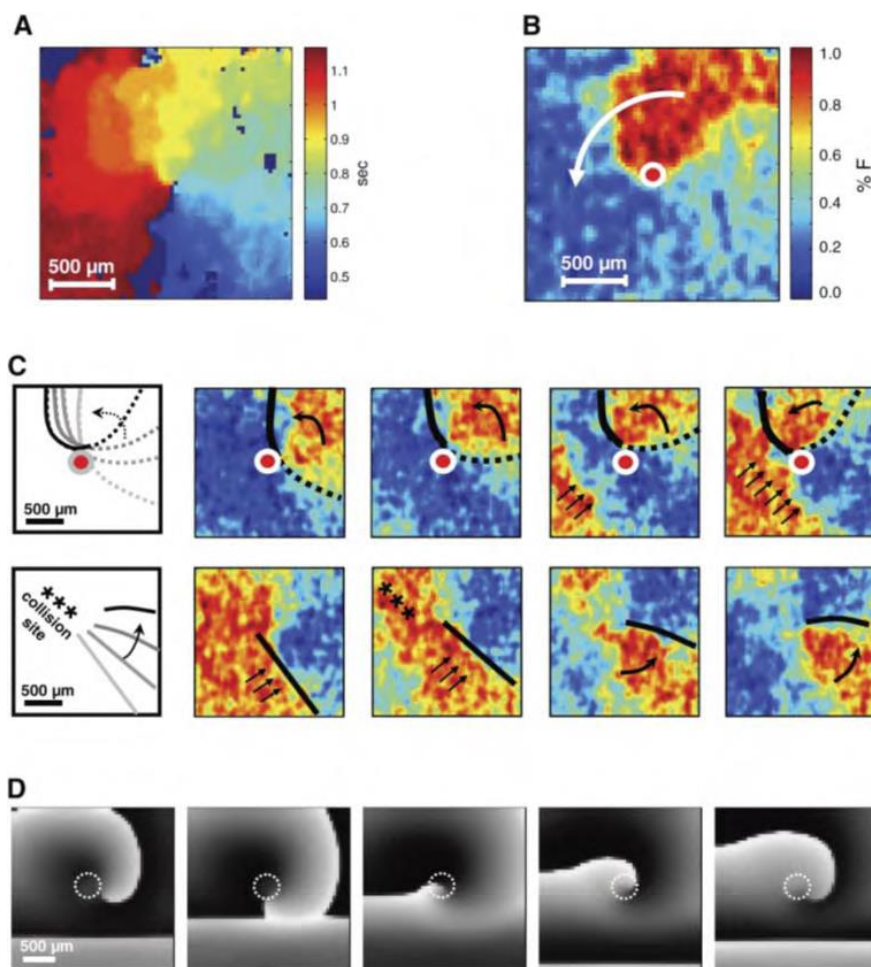


Рисунок 44. Волна реентри подавляемая синхронизацией. А: 1 полное вращение реентри, представленной в виде карты активации, где цвет указывает время активации в каждом пикселе. В: флуоресцентный снимок волны. Стрелка обозначает направление вращения. Нормализованная флуоресценция флуо 4 показана в псевдоцвете. Красная точка указывает положение кончика спирали. С: последовательность кадров, иллюстрирующая взаимодействие фронта 1 шага волны с вершиной спиральной волны до (верхний ряд) и после (нижний ряд) столкновения.

отдаленного места была применена стимуляция. Стимуляция продолжалась до 30 с после того, как волны приблизились к вершине спирали. Типичная картина взаимодействия стимулирующих волн кончиком спирали показана на рис. 44 и 45. Карта активации на рис. 44А показывает одно полное вращение спирали, а снимок кончика спирали показан на рис. 44В. Эта спиральная волна была стабильной с периодом 0,72 с. Она сохранялась в течение ~ 60 с, пока не была подавлена стимуляцией. Покадровая последовательность, иллюстрирующая столкновение спирального кончика с волной стимуляции, показана на рис. 44С. Планарный фронт бегущей волны можно увидеть по мере приближения к спиральной вершине. Последний кадр в верхнем ряду на рис. 44С показывает, что две волны столкнулись и объединились. Распространение объединенной волны продолжалось в направлении распространения синхронизирующих волн, но распространение в область за пределами места столкновения было заблокировано из-за рефрактерности, что привело к разрыву волны (рис. 44С, нижний ряд). Как только разрыв волны натолкнулся на область, которая восстановила возбудимость, он свернулся в новую спираль.

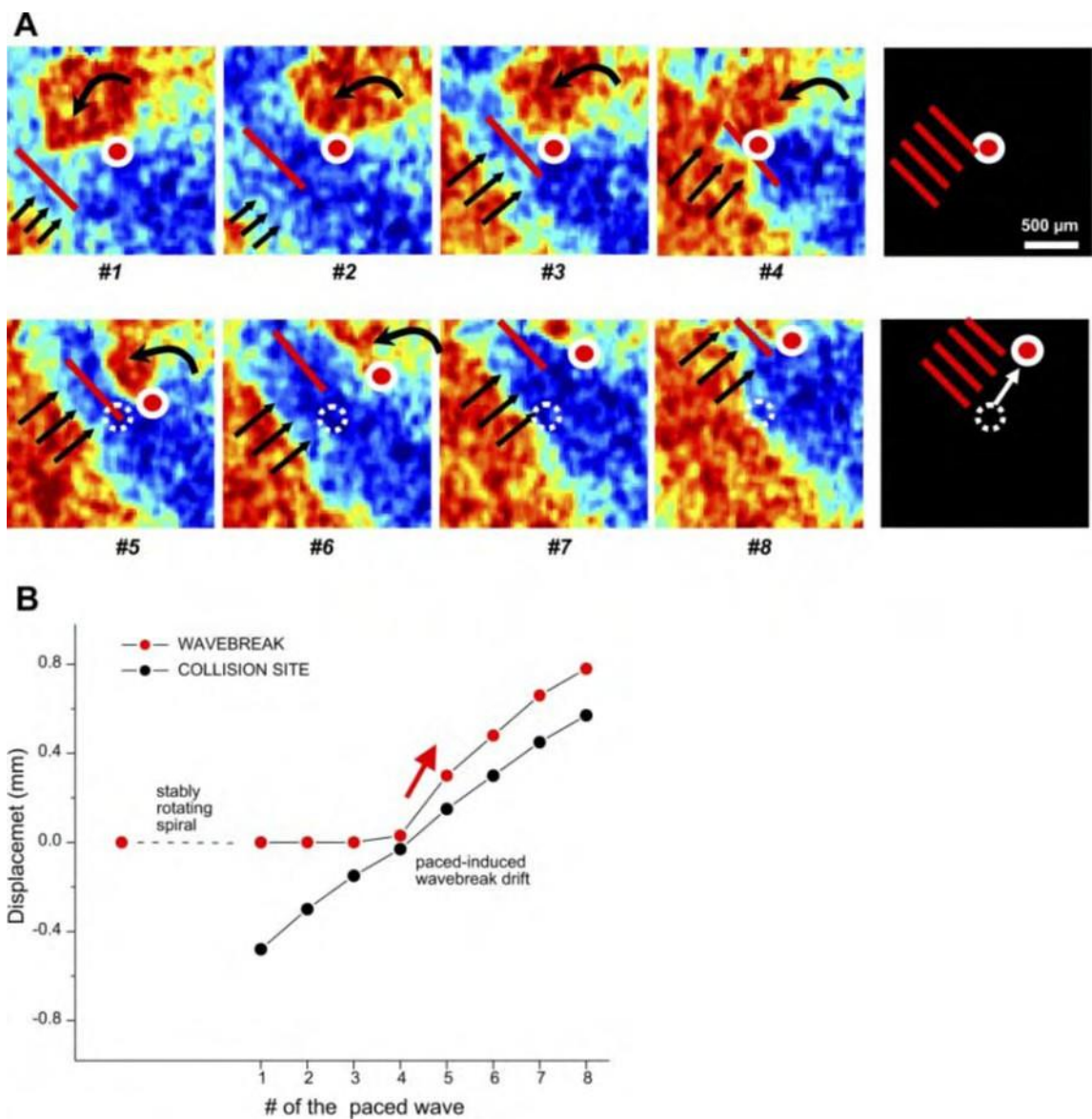


Рисунок 45. Вынужденный дрейф спиральных волн. А: 4 последовательных столкновения спиральной волны и синхронизирующих волн до того, как они достигнут вершины (верхний ряд) 4 столкновения спиральной волны и синхронизирующих волн во время вынужденного дрейфа (нижний ряд). Стрелки показывают направление распространения волны. Справа: относительные положения места столкновения (красные линии) и разрыва волны (красный круг). Пунктирная окружность указывает на место начального прорыва волны; стрелка показывает направление шага вызванного дрейфа. В: графическая иллюстрация процесса, показанного в А. Красные точки, положение обрыва волны; черные точки, координаты места столкновения. Смещение измерялось по направлению дрейфа.

Когда серия синхронизирующих волн сдвигает спиральную волну от своего первоначального местоположения, возможно, что 1) волновой разрыв скручивается в

новую спиральную волну, которая снова прикрепляется к неоднородности или становится неустойчивой и самоуничтожается, и 2) волновой разрыв сталкивается с невозбудимой границей. Чтобы визуализировать такие столкновения, мы использовали систему обработки изображений на основе ПЗС-камеры, чтобы расширить поле обзора и захватить весь слой клеток на покровном стекле (рис. 46). Спиральная волна располагалась в 5 мм от границы покровного стекла и была прикреплена к области с 46А. При столкновении синхронизирующих волн со спиралью две волны слились (рис. 46, С и D). Волновой разрыв затем свернулся в новую спираль, которая оставалась привязанной к локальной неоднородности (рис. 46Е).

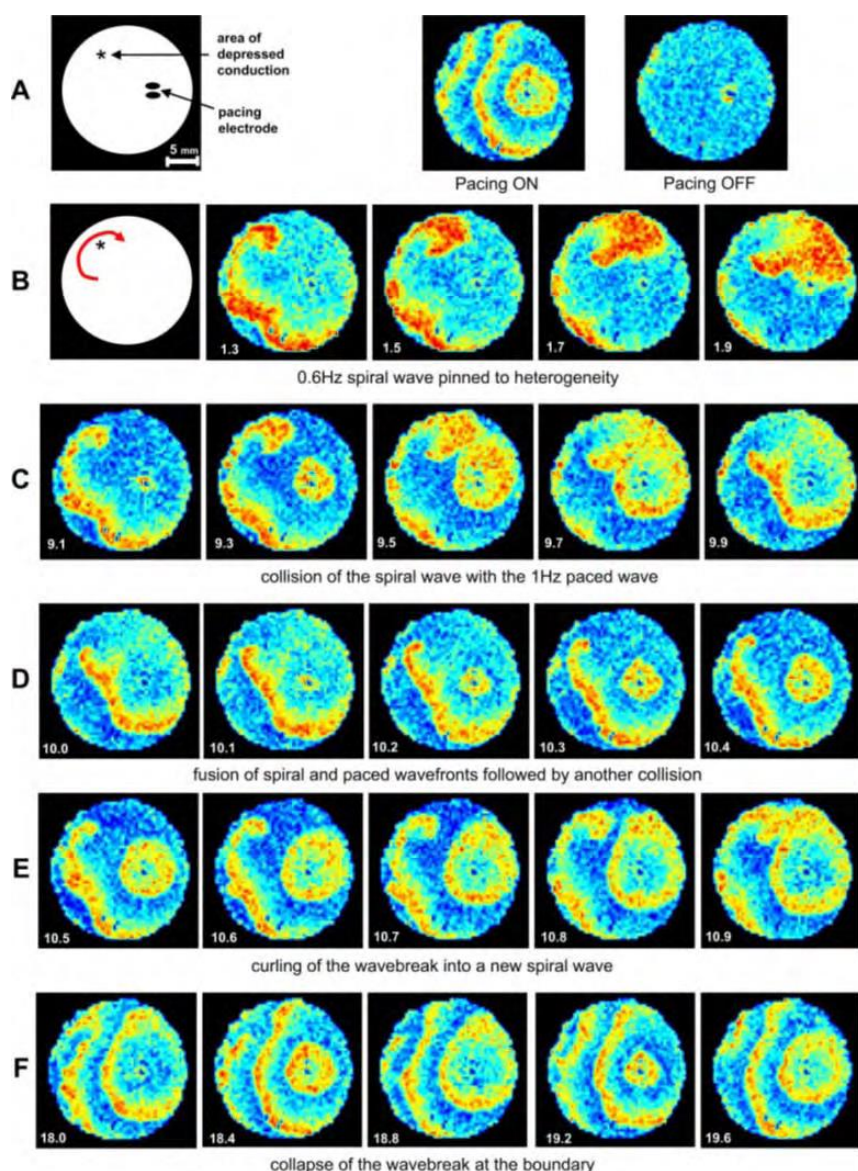


Рисунок 46. Терминация спиральной волны, вызванная синхронизацией и столкновением разрыва волны с границей. А: расположение электродов и локальные неоднородности (слева) и круговые волновые фронты кардиостимуляторов (обратите внимание на изменения кривизны волн вблизи локальной неоднородности) и появление клеточного слоя после быстрой стимуляции (справа). В: 4 последовательных кадра, показывающих спиральную волну, прикрепленную к неоднородности. С: 5 последовательных кадров, показывающих столкновение спиральной волны с шаговой волной. D: 5 последовательных кадров, показывающих две волны, объединяющиеся в единый фронт волны. E: 5 последовательных кадров, показывающих скручивание волны, переходящей в новую спиральную волну. F: 5 последовательных кадров, показывающих коллапс волны на границе. Время (в секундах) отображается в каждом кадре.

Основанные на механизме предложения по увеличению успешности антитахикардийной стимуляции (АТР) пользуются большим спросом, поскольку эта важная задача остается в значительной степени эмпирической. Два альтернативных механизма АТР, т.е. на основе уязвимого окна (VW - vulnerable window) и на основе дрейфа, вызванного стимуляцией, предлагают противоположные рекомендации относительно частоты стимуляции. В механизме на основе VW ретроградный фронт волны генерируется, когда стимул помещается в частично восстановленный хвост вращающейся волны. В этом сценарии требуется несколько импульсов, чтобы найти узкий VW. Если T_s - период вращения спиральной волны, а T_p - период синхронизирующих волн, то $T_s - T_p = \Delta T$ не должно превышать VW. Если это так, то даже при произвольном размещении первого стимула время последующих стимулов будет систематически сдвигаться относительно хвоста вращающейся волны, так что при достаточном количестве стимулов один из них в конечном итоге будет помещен в VW. Если условие не выполнено, например, если T_p существенно ниже, чем T_s , то успех помещения стимула в VW является вероятностным, и возможно, что количество стимулов, необходимых для успешного АТР, резко возрастет. Поэтому частота стимуляции не должна значительно превышать частоту реентри. С другой стороны, скорость вызванного дрейфа может быть увеличена путем увеличения частоты стимуляции, аналогично химической активной среде. Таким образом, вращающаяся волна отталкивается быстрее с увеличением $T_s - T_p = \Delta T$ (единственным ограничением является рефрактерность). Таким образом, механизм терминации реентри, основанный на вынужденном дрейфе, приводит к рекомендации, противоположной той, которая вытекает из концепции VW.

- V.I. Krinsky, K.I. Agladze "Interaction of Rotation Chemical Waves", Physica D, 8, pp 50-56, 1983.

- Agladze K, Kay MW, Krinsky V, Sarvazyan N. "Interaction between Spiral and Paced Waves in Cardiac Tissue" Am J Physiol Heart Circ Physiol. **293**(1), H503-H513, 2007

Подавление спиральных волн, прикрепленных к анатомическому препятствию высокочастотными стимулами в слоях кардиомиоцитов

Эксперименты с культивируемыми миоцитами сердца показали, что одним из вероятных механизмов прекращения спиральной волны с помощью АТР является вынужденный дрейф вращающейся волны и столкновение с не возбудимой границей ткани. Основное утверждение против этого механизма прекращения спиральной волны может заключаться в том, что патологическая вращающаяся волна — это не «свободная спираль», а скорее «закрепленная спираль» в ткани сердца. Из-за высокой гетерогенной природы ткани сердца спиральные волны имеют тенденцию прикрепляться к локальным неоднородностям и стабилизируются как закрепленные вращающиеся волны. L. Tung и его коллеги убедительно продемонстрировали самопроизвольное закрепление вращающихся спиралей к относительно небольшим препятствиям в миоцитах сердца. Таким образом, открепление вращающихся волн от анатомических препятствий является важной предпосылкой для успешного применения АТР. В настоящем исследовании мы исследовали динамику спиральных волн, прикрепленных к анатомическим препятствиям в культивируемых миоцитах сердца, а также их открепление высокочастотной кардиостимуляцией.

На рисунке 47а показан схематический вид временного ряда интенсивности флуоресценции, полученной для пикселя CCD. Мы рассчитали время активации и интервалы активации, которые определены, как показано на рис. 47а. Участок красного цвета показывает положение волновых фронтов, а фронты распространяющихся волн были четко визуализированы с помощью карт времени активации. На рисунке 47б показан пример свободно вращающейся спиральной волны на карте времени активации. Мы можем найти фазовую особенность, где почти все цвета, обозначающие времена активации, сливаются в центре спирали на рис. 47б. На рисунке 47с показана закрепленная спиральная волна, прикрепленная к искусственному анатомическому препятствию миллиметрового размера, где клетки в ядре свободно вращающейся спиральной волны были удалены хирургическим путем.

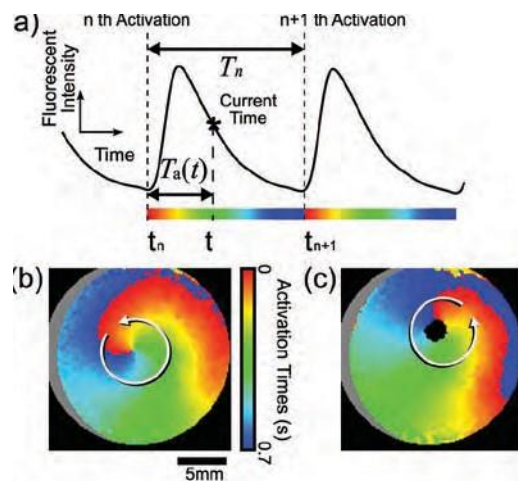


Рисунок 47. Карты времени активации вращающихся спиральных волн в экспериментах по культивированным миоцитам сердца. (а) Схематическое изображение, определяющее местное время активации $T_a(t)$ и локальный интервал активации T^n . Черный круг в (с) указывает на анатомическое препятствие, в котором нет клеток.

Получив стабильно вращающуюся закрепленную спираль, применяли периодические стимулы с частотой, превышающей частоту вращения закрепленной спиральной волны. На рис. 48 показан эффект стимуляции при частоте 1,3 Гц и на частоте 1,5 Гц. При этом меньшая частота не вызвала открепления спиральной волны от невозбудимого препятствия.

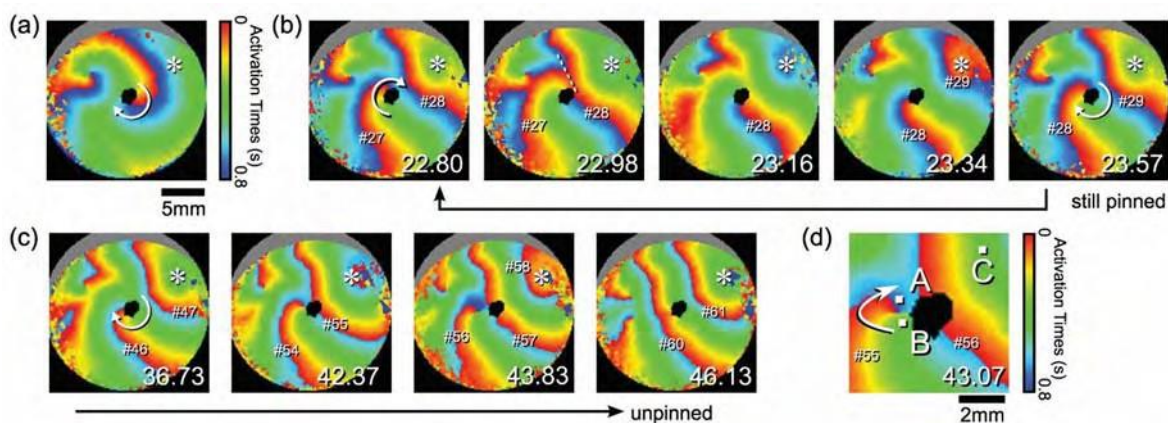


Рисунок 48. Успешное и неудачное открепление в опытах с культивируемыми миоцитами сердца в ответ на высокочастотный стимул. (а) Перед началом периодической стимуляции. Положение электрода кардиостимуляции показано звездочкой. Стрелка указывает направление вращения закрепленной спиральной волны. (б) Снимки неудачного открепления с шагом 1,3 Гц. (с) Снимки успешного открепления при частоте 1,5 Гц. (д) Крупный план фазовой сингулярности после успешного открепления с помощью стимуляции при 1,5 Гц. Индексы, такие как "27" указывают волновое число волны стимуляции, а другие индексы, такие как "22.80" в правом нижнем углу панелей, указывают время на второй шкале времени.

Такое влияние частоты было подтверждено более чем десятью независимыми

экспериментальными измерениями. Приведенные выше экспериментальные результаты продемонстрировали важность синхронизации волн как основы механизма открепления. В частности, было показано, что невозможность полной синхронизации приводит к образованию блока проводимости для части фронта волны, что приводит к отрыву волны от препятствия. Чтобы глубже понять механизм открепления, мы провели численное моделирование открепления спиральных волн высокочастотной стимуляцией. Было изучено устранение закрепленных спиральных волн путем применения высокочастотной периодической стимуляции как в эксперименте, так и при численном моделировании. Для свободных спиралей было установлено, что периодические волны смещают спиральное ядро в направлении распространения волн. Главная предпосылка для такого дрейфа, вызванного стимуляцией, заключается в том, что частота стимуляции должна превышать частоту вращающейся спиральной волны. Это условие явно недостаточно для терминции закрепленной спиральной волны. В случае закрепленной спиральной волны успешное устранение спиральных волн должно основываться на двух последовательных процессах: открепление спиральной волны от препятствия и последующий дрейф, вызванный стимуляцией. Следовательно, успешное АТР с помощью высокочастотной стимуляции может быть описано как (1) приближение распространяющихся волн к препятствию, (2) локальный блок проведения, т.е. сбой распространения около препятствия, (3) отрыв волны от препятствия, (4) дрейф, вызванный стимуляцией, и (5) терминция на границе.

- Isomura A, Horning M, Agladze K, Yoshikawa, K. "Eliminating spiral waves pinned to an anatomical obstacle in cardiac myocytes by high-frequency stimuli" PHYS REV E **78**(6) Article Number: 066216 Part: Part 2, 2008.

- Horning M, Isomura A, Agladze K, Yoshikawa, K. "Liberation of a pinned spiral wave by a single stimulus in excitable media" PHYS REV E **79**(2) Article Number: 026218 Part: Part 2 2009.

Заключение и выводы

Представленная работа состоит из шести основных частей, охватывающих цикл исследований волн реентри на модельной системе на основе реакции БЖ и на культуре сердечной ткани. На основе полученных данных были достигнуты основные цели исследования: определены фундаментальные механизмы образования волн реентри в возбудимых средах и предложены способы их подавления. Результаты приложимы к процессам развития сердечных тахиаритмий и методам их лечения.

Помимо химической активной среды экспериментальными объектами служили несколько типов клеточных культур: неонатальные кардиомиоциты крысы, иммортализованная культура HL-1, в том числе и с трансфецированным канальным родопсином, а также пациент-специфичные линии человеческих ИПСК. В процессе работы был совершен ряд принципиальных методических продвижений, касающихся тканевой инженерии сердца. так, например, было предложено использование вещества азоТАБ для фотоконтроля возбудимости сердечных клеток, упорядоченные полимерные нановолокна использовались для контроля архитектуры сердечной ткани.

Основные результаты и выводы:

1. На химической активной среде был обнаружен эффект вынужденного дрейфа спиральных волн (волн реентри) под воздействием высокочастотной стимуляции, позволяющий сдвигать вращающуюся волну в направлении от синхронизирующего источника. Эффект был подтвержден на выращенных лоскутах сердечной ткани и показана его пригодность для уничтожения волн реентри. Было показано, что терминация волн реентри с помощью синхронизирующего источника пригодна и для волн, вращающихся вокруг неоднородности, т.к. высокочастотная синхронизация способна открепить волну от препятствия и далее заставить дрейфовать. - Образование реентри на углах - тест на аритмогенность.
2. На химической активной среде был обнаружен эффект образования волн реентри при взаимодействии цуга волн возбуждения с невозбудимым препятствием, имеющим острые углы (локальные участки границы с высокой кривизной). Этот эффект был подтвержден на культивируемой сердечной ткани и на его основе разработан стандартный тест

проверки фармпрепаратов на аритмогенность.

3. На химической активной среде было показано, что при соответствующем расположении возбудимых элементов среды возникает однонаправленное проведение возбуждения ("химический диод"). На модели сердечной ткани было показано, что по механизму "химического диода" может возникать "микро-реентри", давая начало спонтанной активности в сердечной ткани, связанной с образованием вращающихся волн.

4. При исследовании поведения волн возбуждения в среде с меняющейся возбудимостью было обнаружено, что существует критическая скорость понижения возбудимости, при превышении которой наблюдается массовое образование волн реентри и хаотизация распространения возбуждения. Адаптация vs Хаотизация.

5. Показана возможность использования полимерных нановолокон для контроля архитектуры культивируемой ткани.

6. Впервые показана возможность использования кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека для исследования волн реентри.

Список публикаций автора по теме диссертации

1. K.I. Agladze, V.I. Krinsky "Multi-armed Vortices in an Active Chemical Medium", *Nature*, 1982, v. 296, 424-426.
2. Кринский В.И., Агладзе К.И. "Вихри с топологическим зарядом 2, 3 и 4 в химической активной среде", *Докл. АН СССР*, 1982, т. 263, стр. 335-337.
3. V.I. Krinsky, K.I. Agladze "Interaction of Rotation Chemical Waves", *Physica D*, 8, pp 50-56, 1983.
4. K.I. Agladze, V.I. Krinsky, A.M. Pertsov "Chaos in the Non- Stirred Belousov-Zhabotinskii Reaction is Induced by Interaction of Waves and Stationary Dissipative Structures", *Nature*, 1984, v. 308, pp 834- 835.
5. K.I. Agladze, V.A. Davydov, A.S. Mikhailov "Observation of spiral waves resonance in an excitable distributed medium", - *Letters to JETP*, 1987, v. 45, pp 601-603.
6. K.I. Agladze, A.V. Panfilov, A.N. Rudenko "Nonstationary Rotation of Spiral Waves: Three-Dimensional Effect" *Physica D*, v. 29, pp 409-415, 1988.
7. K.I. Agladze, V.I. Krinsky, A.V. Panfilov, H. Linde, L. Kuhnert "Three-Dimensional Vortex with a Spiral Filament in a Chemically Active Medium" *Physica D*, v. 39, pp 38-42, 1989.
8. L. Kuhnert, K.I. Agladze, V.I. Krinsky "Image Processing Using Light-Sensitive Chemical Waves" *Nature*, 1989, v. 337, pp 244-247.
9. K.I. Agladze, R.A. Kocharyan, V.I. Krinsky "Direct observation of vortex ring collapse in a chemically active medium", *Physica D*, v. 49, pp. 1-4, 1991.
10. R.R. Aliev, K.I. Agladze "Critical conditions of chemical waves propagation in gel layers with immobilized catalyst", *Physica D*, v. 50, pp. 65-70, 1991.
11. K.I. Agladze, P. De Kepper "Influence of Electric Field on Rotating Spiral Waves in the BZ-Reaction", *J. Phys. Chem.*, 1992, v. 96, pp. 5239-5242.
12. K. Agladze, J.P. Keener, S.C. Muller, A. Panfilov "Rotating Spiral Waves Created by Geometry", *Science*, 1994, v. 264, pp 1746-1748.
13. K.I. Agladze "High-frequency instability of wave fronts", *Chaos*, 1994, v. 4, pp 525-529.
14. K. Agladze, R. R. Aliev, T. Yamaguchi, K. Yoshikawa "Chemical Diode", *J. Phys. Chem.*, 100 (33), pp 13895 - 13897, 1996.
15. K. Agladze "Light induced annihilation and shift of spiral waves", *CHAOS*, 6 (n3, September), pp 328-333, 1996.

16. K. Agladze, V. Voignier, E. Hamm, F. Plaza, V. Krinsky "Fast Selective Elimination of Spiral Waves", *J. Phys. Chem.*, 100 (48), pp 18764-18769, 1996.
17. K. Agladze, V. Krinsky "Tunneling Chemical Waves" *Il Nuovo Cimento*, vol. 20D (January), p.103, 1998.
18. C. Dupont, K. Agladze, V. Krinsky "Excitable medium with left - right symmetry breaking", *Physica A*, 249,n.1-4, pp. 47-52, 1998.
19. Агладзе К.И., Цыганов М.А., Иваницкий Г.Р. "Парадоксальное ускорение волны на границе стока в возбудимой среде" *Докл. РАН*, т. 371: (1), стр. 121-124, Март 2000.
20. Konstantin Agladze, Agota Toth, Takatoshi Ichino, and Kenichi Yoshikawa, "Propagation of Chemical Waves at the Boundary of Excitable and Inhibitory Fields", *J. Phys. Chem. A* 104(29); 6677-6680, 2000.
21. Agladze K, Kay MW, Krinsky V, Sarvazyan N. "Interaction between Spiral and Paced Waves in Cardiac Tissue" *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **293**(1), H503-H513, 2007.
22. Tanaka, M., Nagahara, H., Kitahata, H., Krinsky, V., Konstantin Agladze, K. and Yoshikawa, K. "Survival versus collapse: Abrupt drop of excitability kills the traveling pulse, while gradual change results in adaptation." *Physical Review E* 76(1), 2007.
23. Pumir A., Nikolski V., Horning M., Isomura A., Agladze K., Yoshikawa, K., Gilmour, R., Bodenschatz, E., Krisky, V. "Wave emission from heterogeneities opens a way to controlling chaos in the heart" *PHYSICAL REVIEW LETTERS* **99** (20) Article Number: 208101, 2007.
24. Isomura A, Horning M, Agladze K, Yoshikawa, K. "Eliminating spiral waves pinned to an anatomical obstacle in cardiac myocytes by high-frequency stimuli" *PHYS REV E* **78**(6) Article Number: 066216 Part: Part 2, 2008.
25. Horning M, Isomura A, Agladze K, Yoshikawa, K. "Liberation of a pinned spiral wave by a single stimulus in excitable media" *PHYS REV E* **79**(2) Article Number: 026218 Part: Part 2 2009.
26. Magome N., Agladze K. "Patterning and excitability control in cardiomyocyte tissue culture" *PHYSICA D*, 2010, 239(16) 1560-1566.
27. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. "Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue." *Biomaterials*. 2011 Aug ;32(24): 5615-24. Epub 2011 May 20.
28. Magome N, Kanaporis G, Moisan N, Tanaka K, Agladze K. "Photo-Control of Excitation Waves in Cardiomyocyte Tissue Culture." *Tissue Eng Part A*. Volume: 17 Issue: 21-22 Pages: 2703-2711 DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0745 Published: NOV 2011.
29. Erofeev, IS, Magome, N, Agladze, KI "Digital photo-control of the network of live

- excitable cells." JETP Letters, vol. 94, issue 6, p. 477-480, 2011.
30. Kadota, S, Kay, MW, Magome, N, Agladze, K "Curvature-Dependent Excitation Propagation in Cultured Cardiac Tissue." JETP Letters, vol. 94, issue 11, p. 824-830, 2012.
31. S Kadota, I Minami, N Morone, JE Heuser, K Agladze*, N Nakatsuji "Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets." Eur Heart J. 2013 Apr;34(15):1147-56. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418. Epub 2012 Nov 30.
32. NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, LV Selina, K Agladze "Arrhythmogenic role of the border between two areas of cardiac cells alignment" Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2014) 76, pp. 227-234.
33. IS Erofeev, KI Agladze "Two models of anisotropic propagation of cardiac excitation wave" JETP Letters (2014) 100, n 5, pp 390-393.
34. A Teplenin, A Krashenninnikova, N Agladze, K Sidoruk, O Agapova, I Agapov, V Bogush, K Agladze "Functional Analysis of the Engineered Cardiac Tissue Grown on Recombinant Spidroin Fiber Meshes" PLOS ONE (2015), 10 (3).
35. NN Kudryashova, AS Teplenin, YV Orlova, KI Agladze "Excitation wave propagation in a patterned multi-domain cardiac tissue" JETP Letters (2015) 101, pp. 869-872.
36. NN Kudryashova, IV Kazbanov, AV Panfilov, KI Agladze "Conditions for Waveblock Due to Anisotropy in a Model of Human Ventricular Tissue" PloS one (2015) 10 (11) DOI: 10.1371/journal.pone.0141832.
37. Erofeev IS, Agladze KI. Formation of virtual isthmus: new scenario of spiral wave death after decrease of excitability. JETP Lett. 2015; 102(10): 780-784.
38. SR Frolova, O Gaiko, VA Tsvelaya, OY Pimenov, KI Agladze "Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes" PLOS ONE (2016) 11 (3), e0152018.
39. V.N. Kachalov, N.N. Kudryashova, K.I. Agladze "Spontaneous spiral wave breakup caused by pinning" JETP Letters, 2016 DOI: 10.1134/S0021364016210025
40. N. Agladze, O. Halaidych, V. Tsvelaya, T. Bruegmann, C. Kilgus, P. Sasse, K. Agladze "Synchronization of Excitable Cardiac Cultures of Different Origin" Biomaterials Science, 2017, 5, 1777-1785. DOI: 10.1039/C7BM00171A
41. N. Kudryashova, V. Tsvelaya, K. Agladze, A. Panfilov "Virtual cardiac monolayers for electrical wave propagation" Scientific Reports 2017, 7, 7887. doi:10.1038/s41598-017-07653-3
42. V.N. Kachalov, V.A. Tsvelaya, N.N. Kudryashova, K.I. Agladze "Success of spiral wave

unpinning from the heterogeneity in a cardiac tissue depends on its boundary conditions” JETP Letters 2017, doi:10.1134/S0021364017210019

43. М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, Ш.Р. Фролова, Е. Дементьева, К.И. Агладзе "Исследование функциональности кардиомиоцитов, полученных из индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток для моделирования сердечных аритмий из-за синдрома удлиненного QT интервала" Вавиловский журнал генетики и селекции 3018, 22(2), 187-195.

44. VA Tsvelaya, IYu Kalita, AV Krashenninnikova, RA Doronin, NN Kudryashova, KI Agladze “Cardiac excitation waves under strong hyperkalemia condition” JETP Letters 2018, vol. 108, iss. 8, pp. 580 – 581.

45. SR Frolova, K Agladze "Study of the patch-clamp electrophysiological properties of cardiomyocytes derived from patient-specific iPSCs” JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES 50 (6), 539-540, 2018.

46. SR Frolova, SG Romanova, K Agladze "Stilbene derivative as a photosensitive compound to control the excitability of neonatal rat cardiomyocytes" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES 50 (6), 575-576, 2018.

47. SR Frolova, VS Gorbunov, NS Shubina, AM Perepukhov, SG Romanova, KI Agladze "Stilbene derivative as a photosensitive compound to control the excitability of neonatal rat cardiomyocytes" Bioscience reports 39 (1), 2, 2019.

48. КИ Агладзе "Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития" Альманах клинической медицины 47, 2019

49. N Kudryashova, A Nizamieva, V Tsvelaya, AV Panfilov, KI Agladze "Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells" PLoS computational biology 15 (3), e1006597, 1, 2019.

50. M Slotvitsky, V Tsvelaya, S Frolova, E Dementyeva, K Agladze "Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer" Toxicological Sciences 168 (1), 70-77, 3, 2019.

Google Scholar citations:

<http://scholar.google.com/citations?user=r4Zk4ikAAAAJ&hl=en>) ResearcherID: J-6142-2012