ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» (НИУ «БелГУ»)

На правах рукописи

КОМИСОВ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

МЕТОДИКА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО КАРТИРОВАНИЯ МАКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Специальность 03.01.02 — «Биофизика»

Специальность 03.01.08 — «Биоинженерия»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

<u>Научный руководитель:</u> Осипова Ольга Александровна, доктор медицинских наук, доцент

Малай Николай Владимирович, доктор физико-математических наук, профессор

Оглавление

Введение
Глава 1. Обзор литературы 11
1.1.Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия 11
1.2. Рентгеновское элементное картирование15
1.3.Кардиомиоциты, их строение и функция 18
1.4. Хроническая сердечная недостаточность
Заключение к главе 1
Глава 2. Методика качественного и количественного картирования
макроэлементного состава биологической ткани
2.1 Протокол методики
2.2. Анализ результатов картирования методом сингулярного разложения
матриц
2.3 Анализ результатов картирования методом нормированной взаимная
корреляция 46
Заключение к главе 2
Глава 3. Экспериментальное исследование изменения содержания
макроэлементов в ткани миокарда крысы в постморбидный период 51
3.1. Материалы и методы исследования
3.2. Результаты картирования методом ИСП-ОЭС/ЭДС 54
3.3.Анализ результатов картирования методом сингулярное разложения
матриц
3.4.Анализ результатов картирования методом нормированной взаимной
корреляции
Заключение к главе 3 64

Глава 4. Сравнительный анализ содержания и распределения макроэлементов
$(Ca^{2+}, K^+, Mg^{2+}, Na^+)$ в ткани миокарда по данным аутопсии больных
хронической сердечной недостаточностью с низкой и сохранной фракциями
выброса левого желудочка сердца 65
4.1.Материалы и методы исследования65
4.2. Результаты исследования структуры ткани миокарда ЛЖ 68
4.3. Результаты исследования содержания методом ИСП-ОЭС 70
4.4. Результаты картирования неоднородностей содержания
макроэлементов методом ИСП-ОЭС/ЭДС 76
Заключение к главе 4
Глава 5. Влияние локальной кальциевой перегрузки и как следствие
снижение инотропной способности миокарда на патогенетический механизм
развития ХСН у пациентов с СНнФВ 87
5.1. Анализ влияния степени неоднородности и площади неоднородности
содержания Ca ²⁺ на фракцию выброса миокарда ЛЖ пациентов группы У1
5.2. Биофизические основы локальной кальциевой перегрузки в ткани
миокарда ЛЖ пациентов группы У191
Заключение к главе 5
Основные результаты и выводы диссертационной работы
Список опубликованных работ96
Список литературы

Введение

Актуальность темы и степень ее проработанности. На протяжении многих десятилетий и по сегодняшний день проводятся исследования, направленные на выявление взаимосвязи между патологическими процессами и метаболизмом макро и микроэлементов в живом организме. Круг заболеваний, при которых исследуются изменения элементного состава ограничен онкологическими заболеваниями, сахарным диабетом, ожирением [1]. Особый интерес представляют исследования, направленные изучение взаимосвязи патогенетических механизмов заболеваний на сердечно-сосудистой системы и изменениями содержания и распределения макроэлементов, однако подобные работы единичны.

Существует несколько основных аналитических методов изучения элементного состава. Среди них стоит отметить методы масс-спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-ОЭС) [2], рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) [1], а также различные методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (STED, PALM, SOFI и др.). Одним из самых чувствительных методов является метод ИСП-ОЭС [3]. На сегодняшний день он считается наиболее перспективным методом для определения микро- и ультра-микроэлементов в биосубстратах, широко используется В научно-исследовательских И клинических лабораториях. Основные преимущества данного метода - это чрезвычайно низкие пределы обнаружения (по большинству элементов ниже 0,01 мкг/л) и высокая производительность [4]. Основная трудность этого метода – влияние матричных эффектов и спектральные наложения в образцах Метод РФА-СИ многоэлементного состава. обладает такими преимуществами, как многоэлементность, относительная быстрота анализа, недеструктивность, не требует переведения анализируемой пробы в раствор [5]. В отличие от традиционного РФА, метод РФА-СИ позволяет анализировать образцы малой массы (до 0,5 мг) и подбирать оптимальные

условия для анализа интересующих элементов [6]. Однако пробоподготовка тканей при данном методе исследования подразумевает помещение образцов между двумя фторопластовыми пленками с последующим высушиванием под грузом, для придания образцам плоскопараллельной геометрии и, как следствие, потерей информации о локализации элементов в исследуемой ткани [7]. Существующие различные методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (наноскопии) позволяют получить информацию о морфологии исследуемой ткани и локализации элементов в ней, однако требуют использования различных флуоресцентных красителей и/или индикаторов, а так же световых потоков очень высокой интенсивности (до 107–108 Вт/см2 для STED), длительного (минуты-часы) получения серий из 103–105 изображений (SMLM), и/или облучения коротковолновым светом для фотоконверсии меток (SMLM) и не позволяют определять несколько элементов одновременно [8,9,10].

Отсутствие информации об изменении распределения макроэлементов элементов в ткани миокарда левого желудочка при различных временах ишемии не позволяет в полной мере судить о биофизических и патофизиологических процессах в миокарде при очаговых изменениях двигательной активности сердечной стенки.

Кальциевая перегрузка является одним из важных факторов понижения механической активности кардиомиоцита [11]. Известно, что снижение скорости работы Na⁺-K⁺ - насоса может являться причиной возникновения кальциевой перегрузки, т.к. оно способствует накоплению ионов натрия в кардиомиоцитах и как следствие увеличению обмена Na⁺-Ca²⁺, что, в свою очередь ведет к накоплению ионов кальция [12,13].Однако исследований, определяющих связь данных изменений в содержании и распределении макроэлементов в ткани миокарда у больных в зависимости от типа сердечной недостаточности, не проводилось. Так же в исследованиях, посвященных математическому моделированию нарушений ритма (диссинхрония), важную роль играют режимы функционирования Na⁺- K⁺,

Na⁺- Ca²⁺ и Ca²⁺- Mg²⁺ насосов [14]. Задача сравнительного анализа данных экспериментального определения содержанию и распределения макроэлементов в ткани миокарда у больных ХСН в зависимости от состояния сократительной функции ЛЖ является важной для определения новых дополнительных механизмов в формировании прогрессирования ХСН.

Данное исследование посвящено поиску новых патофизиологических механизмов ХСН у пациентов с СНнФВ и СНсФВ. Предполагается, что патогенетический механизм прогрессирования ХСН у пациентов с СНнФВ возможно связан с локальной макроэлементной перегрузкой и как следствие формирует субстрат для асинхронного проведения, снижение инотропной способности миокарда ЛЖ, что проявляется в сильно выраженной неоднородности распределения макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ. Проверка данной гипотезы требует решения прикладной задачи, и именно создание неразрушающего метода пространственного измерения содержания макроэлементов в ткани миокарда.

Цель диссертационной работы: поиск связи между патогенетическими механизмами прогрессирования хронической сердечной недостаточности у больных с сохранной и нарушенной фракцией выброса и изменениями содержания и распределения макроэлементов (Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺) в ткани миокарда.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать эффективную методику качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и оптической атомно–эмиссионной спектрометрии параллельного действия с индуктивно-связанной плазмой.

2. Доказать постоянство распределения содержания макроэлементов в ткани миокарда в первые 12 часов после смерти.

3. Провести сравнительный анализ распределения макроэлементов в тканях миокарда человека без патологий (аутопсия) и с хронической сердечной недостаточностью (СНнФВ и СНсФВ).

4. Оценить молекулярные и клеточные биофизические механизмы влияния локальной перегрузки Ca²⁺ на механизмы прогрессирования XCH.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является распределение содержания макроэлементов в биологических тканях. Предметом исследования являются изменения распределения макроэлементов в тканях миокарда левого желудочка модельного животного (крыса линии Вистар) и в тканях миокарда левого желудочка больных с сохранной и нарушенной фракцией выброса.

Научная новизна. Разработана методика качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и оптической плазма – эмиссионной спектрометрии параллельного действия с индуктивно-связанной плазмой позволяющая одновременно исследовать распределение макроэлементов Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в тканях в биологических тканях.

Показано отсутствие достоверных ($p \le 0.05$) различий в распределении содержания макроэлементов Ca^{2+,} K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в тканях миокарда крыс в первые 12 часов после смерти.

Обнаружены различия макроэлементного состава тканей миокарда пациентов при различных фракциях выброса. В группе с низкой ФВ показана неоднородность распределения макроэлементов.

Патогенетический механизм развития хронической сердечной недостаточности у пациентов с сердечной недостаточностью с низкой фракцией выброса связан с локальной кальциевой перегрузкой и как следствие снижение инотропной способности миокарда ЛЖ, что проявляется в сильно выраженной неоднородности распределения макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанная методика качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным методом энергодисперсионной спектроскопии и оптической плазма – рентгеновской эмиссионной спектрометрии параллельного действия с индуктивно-связанной плазмой распределение макроэлементов позволяет исследовать В различных биологических объектах. Полученные с помощью данной методики результаты верифицированы по отношению к большому количеству экспериментальных и теоретических данных. Впервые экспериментально показано отсутствие достоверных (p≤0.05) различий в распределении содержания макроэлементов Ca^{2+,} K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в ткани миокарда крыс в первые 12 часов после смерти. Обнаружена локальная перегрузка Ca²⁺, K⁺ в тканях больных с низкой фракцией выброса ЛЖ. Показано, что локальная Ca^{2+} перегрузка является биофизической основой одного ИЗ патогенетических механизмов прогрессирования хронической сердечной недостаточности.

В Методология диссертационного исследования. работе использованы методы сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), (ПЭМ), просвечивающей электронной микроскопии сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии (CT $\overline{}$ M), ИСП-ОЭС спектрометрии, ЭДС картирования. Для обработки и анализа результатов использовались современные математические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная автором методика качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным энергодисперсионной рентгеновской методом спектроскопии И оптической атомно – эмиссионной спектрометрии действия с индуктивно-связанной параллельного плазмой позволяет исследовать распределение макроэлементов Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ в тканях миокарда.

2. Достоверность сохранения явления ионного состава В постморбидный период: картирование макроэлементного состава ткани крыс демонстрирует отсутствие достоверных миокарда различий В распределении Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ в ткани миокарда на модельном животном (крыса) спустя 30 минут, 1 час, 3 часа, 6 часов и 12 часов постморбидного периода.

3. Интегральный показатель содержания макроэлементов Ca²⁺, K⁺, Mg^{2+} , Na⁺ находится в пределах стандартного отклонения измерения и не зависит от сократительной функции миокарда (фракции выброса) (p≤0.05), при этом наблюдается локальная перегрузка Ca²⁺, K⁺ в тканях больных XCH с низкой фракцией выброса ЛЖ.

4. Локальная перегрузка Ca²⁺ является биофизической основой одного из патогенетических механизмов прогрессирования хронической сердечной недостаточности.

Степень достоверности. Достоверность экспериментально полученных результатов подтверждается малой величиной статистической ошибки, повторяемостью результатов и использованием откалиброванного сертифицированного оборудования. Примененные математические методы хорошо изучены и широко используются при решении задач распознавания образов и компьютерного зрения. Программный пакет MATLAB широко используется при решении прикладных задач в различных областях знаний.

Личный вклад автора. Автор лично провел анализ литературных данных, участвовал в постановке целей и задач исследования, разработал методику пробоподготовки, обеспечивающей резистентность биологических тканей к деструктивному воздействию электронного луча с энергией 20-30 кЭв, определил оптимальные режимы работы сканирующего электронного микроскопа при картировании макроэлементов, разработал методику корреляции метода ЭДС картированния и ИСП-ОЭС спектрометрии, а так же метод математической обработки карт распределения макроэлементов и их последующей интерпретации. Автор лично провел все экспериментальные

исследования, получил и обработал результаты и сформулировал основные выводы. Участвовал в подготовке и редактировании материалов для публикаций и докладов на научных конференциях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 11 статей в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI.

Апробация результатов. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на 5 международных и всероссийских конференциях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы и приложения. Объём диссертации составляет 111 страниц, включая 43 рисунка и 17 таблиц. Список литературы содержит 125 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1.Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDS, ЭДС или XEDS) это качественный и количественный микроаналитический метод, позволяющий получить информацию о химическом составе образца для атомным номером Z> 3 [15,16,17]. Электронный элементов с луч фокусируется образце помощи сканирующего (CЭM) на при или просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа (ТЭМ или ПЭМ). В результате воздействия электронного пучка, характерная энергия электронов в котором составляет 1 ÷ 30 КэВ, на образец происходит множество различных физических явлений в соответствии с рисунком 1.1. Для нас представляет интерес такие взаимодействия электронов с образцом, в результате которых образуется рентгеновское излучение, которое бывает тормозное (непрерывное) рентгеновское излучение двух видов: И характеристическое рентгеновское излучение (ХРИ).



Рисунок 1.1. Взаимодействие ускоренных электронов с тонким образцом.

Регистрация рентгеновского излучения осуществляется при помощи энергодисперсионного детектора, который отображает сигнал в виде спектра или гистограммы интенсивности рентгеновского излучения против его энергии, что позволяет однозначно определить элементный состав образца используя закон Мозли [18] - зависимость частоты v испускаемого ионизированным атомом рентгеновского излучения от его атомного номера Z:

$$v = 2.48 \cdot 10^{15} \left(Z - 1 \right)^2 \tag{1.1}$$

Приведенный закон справедлив для K_a серии спектра испускания атомов, аналогичные зависимости могут быть написаны для L и M серий в соответствии с рисунком 1.2.



Рисунок 1.2. Графическое отображение закона Мозли [18].

Возникновение серий рентгеновских квантов, близких по энергиям пояснено на рисунке 1.3. Ускоренный электрон выбивает связанный атомом

электрон с нижних электронных уровней, на место выбитого электрона переходят электроны с более высоких уровней. Ионизованный атом в возбужденном состоянии находится около 10⁻¹⁴с [19]. По мере увеличения заряда ядра и количества электронов у атома появляются и новые электронные уровни. Так у водорода единственный электрон находится на Куровне, начиная с лития появляется L-уровень, у калия начинает заполняться М-уровень, N-уровень полностью заполняется у лютеция, а О и Р - уровни полностью не заполнены ни у одного из элементов периодической системы Менделеева. Энергия связи К-электронов изменяется от 13,6 эВ у водорода до 116 КэВ у урана, L-электронов - от 3 эВ у лития до ~ 20 КэВ у урана, а Мэлектронов - от нескольких электронов у натрия до ~ 4 кэВ у урана. Здесь следует отметить, что существуют очень близкие по энергиям L, M, N, O и P - подуровни, которые изображены на рисунке 1.3а. Вследствие этого, в спектре испускания атома будут присутствовать серии рентгеновских квантов (рис. 1.36). Соотношения количества рентгеновских квантов различных энергий определяется вероятностными характеристиками перехода электрона на соответствующие уровни.

Отдельно стоит рассмотреть принцип работы энергодисперсионных спектрометров. В основе их работы лежит явление образования электроннодырочных пар в полупроводнике при воздействии на него рентгеновским излучением [20]. При этом между поверхностями кристалла возникает некоторый каждый потенциал, скачок которого соответствует рентгеновскому кванту. Величина скачка зависит от энергии рентгеновского кванта. Для более точного измерения энергии кванта кристалл, обычно это кремний легированный литием, должен поддерживаться при постоянной низкой температуре. Термостатирование кристалла осуществляется охлаждением его жидким азотом или элементом Пельтье.

«Мертвое время» энергодисперсионного детектора определяется как сумма времен, затрачиваемым прибором на регистрацию рентгеновских квантов одной энергии, и временем, необходимым на приведение потенциала

между противоположными сторонами кристалла в начальное нулевоезначение. Разрешение спектрометра тем лучше, чем больше время измерения количества рентгеновских квантов одной энергии. Требование к образцу для проведения энергодисперсионного анализа относительно невысоки.



Рисунок 1.3. Возникновение серий испускания атомом рентгеновского излучения близкого по энергиям: а - схема орбиталей и б - соотношение серий по энергиям (для атома с Z>29).

Так, допускается осуществлять анализ шероховатых образцов, а положение образца по высоте может варьироваться в пределах нескольких миллиметров. Энергодисперсионный спектрометр позволяет эффективно проводить элементный анализ т.к. одновременно фиксируется весь спектр. Существенный недостаток энергодисперсионного анализа - энергетическое разрешение спектра. Это проявляется в существенных ограничениях энергодисперсионного анализа образцов, содержащих элементы с близкими по энергиям переходами.

Принимая во внимание всё вышесказанное следует отдельно остановиться на точности данного метода. Разрешающая способность метода определим как способность выделить на рентгенограмме пик концентрации элемента на фоне тормозного рентгеновского излучения. Для этого высота пика должна быть в три раза больше стандартного отклонения счетчика фонового сигнала. Стандартная лабораторная практика определяет эту величину в районе 1000 ppm или 0.1 wt%.

1.2. Рентгеновское элементное картирование

Рентгеновское картирование позволяет определить распределение элемента в образце, что позволяет решать различные задачи, не прибегая к точечному анализу. В то время как изображение в обратно рассеянных электронах (BSE) дает лишь фазовый контраст, рентгеновское картирование позволяет определить, как элемент соответствует определенной фазе в соответствии с рисунком 1.4.



Рисунок 1.4. Сравнение изображения в обратно рассеянных электронах и рентгеновского картирования элементов.

картирование Элементное рентгеновское осуществляется путем фиксирования количества фотонов определенной энергии, излучаемых с каждой точки образца за фиксированное время в процессе его сканирования электронным лучом. Изображение формируется путем перевода количества рентгеновских фотонов определенной энергии в значение яркости пикселя цифрового изображения. Таким образов исходные данные для карты представляют собой двумерный массив чисел, значение, в каждом элементе которого соответствует количеству зарегистрированных фотонов в восьми битном формате данных (0 - 255). Данный массив может быть визуализирован в виде оттенков серого (grayscale) или с наложением псевдоцвета в соответствии с рисунком 1.5.

BSE изображение

Картирование одного элемента







Рисунок 1.5.BSE изображение и карта распределение элемента для CaKa1 представленная в виде 256 уровней красного.

Картирование обычно производится при увеличениях в 50 - 1000 раз. При увеличениях меньше 50 раз возможны критические ошибки за счет геометрии образца. При увеличениях больше 1000 раз очень велика вероятность перекрытия пиков характеристического рентгеновского излучения [21].

Данный метод является крайне трудоёмким, ввиду большого количества требований, как к образцу, так и к измерительной системе. Поглощение рентгеновского излучения, выделенного образцом, геометрический фактор, а именно угол, при котором происходит регистрация сигнала, рентгеновская флуоресценция в образце - это основные факторы, мешающие проведению рентгеновской спектроскопии В целом И рентгеновскому картированию в частности. Неспособность биологического образца воздействию противостоять длительному разрушающему электронного пучка энергии 30 кЭв в условии низкого давления (p~10⁻⁵ torr), отсутствие необходимых для количественного анализа эталонных образцов, низкая плотность и «лабильность» биологических образцов дополнительно Подробное усложняют проведению данного метода исследования.

изложение особенностей влияния каждого фактора выходит за рамки данной работы, однако их влияние учитывалось при проведении исследования.

1.3.Кардиомиоциты, их строение и функция

Сердечная мышечная ткань по морфофункциональной классификации относится к поперечнополосатой или исчерченной мышечной ткани и находится как мышечной оболочке сердца (миокард), так и в устьях связанных с ним крупных сосудов. Структурной единицей сердечной мышечной ткани является клетка кардиомиоцит. Между клетками находится рыхлая волокнистая соединительная ткань с кровеносными сосудами и нервами. Большую часть объема кардиомиоцитов составляют миофибриллы, которые в свою очередь состоят из последовательно соединённых между собой саркомеров в соответствии с рисунком 1.6 [22, 23]. Саркомер - это участок миофибриллы между двумя соседними Z-дисками, который имеет длину около 2.5 µм.

Актиновые филаменты (тонкие нити) прикрепляются к Z-диску и копируются за счет связывания с копирующим белком (CapZ), что предотвращает деполимеризацию актиновых филаментов. Заостренные концы актиновых нитей ориентированы к центру саркомера и копированы тропомодулином. Взаимодействие небулина с актиновыми филаментами позволяет регулировать сборку волокон и длину тонких филаментов.



Рисунок 1.6. Строение саркомера. Показаны Z-диски. К Z-дискам крепятся актиновые нити и миозиновые нити

В центральной части саркомера вдоль его оси расположены миозиновые биполярные филаменты относящиеся к семейству миозина II. Они имеют длину ~1,6 мкм и толщиной ~15 нм и называются толстыми нитями [100].

Тонкие и толстые филаменты переплетаются, образуя трехмерную решетчатую структуру. Поскольку саркомер биполярен, в обеих половинах миозиновые моторы по отношению к актину ориентированы одинаково.

Основным механизмом мышечного сокращения является скольжение толстых и тонких нитей друг относительно друга. Этот принципиальный механизм был сформулирован в модели «скользящих нитей» Э. Хаксли в 1957 году [24]. Было показано, что глобулярные домены миозина, называемые миозиновыми головками, прикрепляются к актину (образуя поперечные мостики), развивают активное усилие, что в свою очередь приводит к сокращению кардиомиоцитов. При сокращении моторные домены миозина толстых филаментов взаимодействуют с актином тонких филаментов. При сокращении саркомер укорачивается за счет скольжения тонких и толстых филаментов относительно друг друга, что сближает соседние Z-диски к центру саркомера. По мере продвижения головок миозина к зазубренным концам актиновых филаментов, длина толстых и тонких филаментов остается постоянной. Позже было установлено, что

процесс взаимодействия между актином и миозином регулируется тропонинтропомиозиновыми комплексами, который связан с актином в тонких филаментах, и ионами кальция [25]. Молекулы тропомиозина представляют собой суперспирализованные 40 полипептиды длиной HM. Они располагаются друг за другом вдоль актиновых спиралей. Тропонин представляете собой комплекс из трех различных белков: тропонина С, тропонина I и тропонина Т. Один комплекс связывается с тропомиозином так, что они располагаются вдоль тонких филаментов через 40 нм интервалы. При низких концентрациях ионов Ca²⁺ тропомиозин находится в таком состоянии, что пространственноблокирует сайт связывания миозина на актине, так что мышца расслабляется и гидролиз АТФ под действием миозина происходит очень медленно. За счет взаимодействия актина с миозином релаксированные саркомеры способны к пассивному растяжению, оказывая небольшое сопротивление. Нервные импульсы вызывают выход ионов Ca²⁺ в цитозоль из саркоплазматического ретикулума в соответствии с рисунком 1.7. [26]



Рисунок 1.7. Сеть саркоплазматического ретикулума в кардиомиоците. Триада – одна поперечная, Т-трубочка (впячивания мембраны внутрь клетки) и прилегающие к ней мембраны саркоплазматического ретикулума.

Последний представляет собой органеллу, которая депонирует кальций в мышце. Повышение уровня Ca²⁺ в цитозоле приводит к его связыванию с тропонином-C(CaTnC)и к конформационным изменениям в молекуле белка. В результате этих изменений тропомиозин отходит от миозин-связывающего сайта в актине, и миозин получает возможность взаимодействовать с актином и генерировать усилия за счет механохимического цикла [31].

1.4. Хроническая сердечная недостаточность

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) продолжают оставаться наиболее актуальной проблемой здравоохранения большинства стран мира, в том числе России, несмотря на существенный прогресс последних десятилетий в сфере диагностики и лечения этой патологии.

Смертность от болезней системы кровообращения в Российской Федерации составила 56,5% в общей структуре смертности, превышая показатели развитых европейских стран в 3-4 раза, при этом,по данным европейского исследования Euro Heart Survey Study [32] и американских регистров ADVANCENT [33] и ADHERE [34], хроническая сердечная недостаточнсть (XCH) занимает лидирующее место [81].

ХСН представляет собой патофизиологический синдром, при котором в результате поражения сердечно-сосудистой системы происходит снижение насосной функции сердца, что приводит к дисбалансу между потребностями организма и метаболическими и гемодинамическими возможностями сердца. Восполнить эту потребность возможно только повысив давление наполнения сердца.

Реакцией механический нейрогормональную на стресс и/или активацию субпопуляции фибробластов является их трансформация в миофибробласты, что также сопровождается увеличением экспрессии αактин-позитивных гладкомышечных ростом секреторной клеток И активности. Миофибробласты перемещаются в область, окружающую поврежденную ткань, и вносят свой вклад, как в секрецию коллагена, так и в

уплотнение или перестройку формирующихся коллагеновых волокон. При XCH происходит дисбаланс синтеза И деградации компонентов внутриклеточного матрикса [36]. В последние годы появляется все больше данных, что тучные клетки, образованные в костном мозге, но мигрирующие сохранившиеся в миокарде, также имеют большое значение для И ремоделирования ВМ. Миокардиальные тучные клетки локализуются около кровеносных сосудов среди КМЦ, инициируя И экскрецию профибротических цитокинов и факторов роста. Это в свою очередь, благодаря увеличению секреции компонентов ВМ и коллагенообразованию, вызывает пролиферацию миофибробластов, перемещение и реконструкцию сердечного интерстиция, в так же содержание в сыворотке крови ингибитора активатора плазминогена-1 у больных сахарным диабетом 2 типа. [37]. При формировании миокардиального фиброза происходит увеличение количества коллагенов I, III, IV и VI, фибринонектина, ламинина, виметина, и снижение отношения коллагена I к III типу (за счет преобладания в экстрацеллюлярном матриксе коллагена III типа над I типом). Фиброз сердечной ткани влечет за собой значительные последствия для функции сердца, т.к. изменения синтеза внутриклеточного матрикса повышает механическую жесткость миокарда и способствует возникновению диастолической дисфункции [41]. При ХСН происходит увеличение потери перекрестных связей коллагена и взаимосвязи коллагеновой сети с отдельными КМЦ, что, возможно, вызывает глубокие повреждения структуры и изменения функции ЛЖ [42]. Прогрессивное увеличение фиброза в итоге приводит к гипертрофии ЛЖ и систолической дисфункции. Дальнейшая перекрестно-связанного утрата строения фибриллярного коллагена ассоциируется с прогрессирующей дилатацией ЛЖ вслед за повреждением миокарда.

Депонирование коллагена происходит реактивно вокруг интрамуральных коронарных артерий и артериол (периваскулярный фиброз) или в интерстициальном пространстве (интерстициальный фиброз) и не приводит к гибели кардиомиоцита. Дополнительное скопление коллагена

возможно вследствие микроскопического рубцевания (заместительный фиброз). Заместительный фиброз является адаптационным механизмом к снижению размеров паренхимы, для поддержания структурной целостности сердца. Доказано, что именно увеличение количества фиброзной ткани повышает жесткость миокарда, нарушает электрофизиологические процессы в кардиомиоците [39,40].

Фиброз миокарда создает структурный субстрат для возникновения предсердных или желудочковых аритмий, разобщенности сокращений камер и/или сегментов миокарда, диссинхронии сердца и, таким образом, может стать причиной снижения инотропной функции миокарда ЛЖ и внезапной сердечной смерти [41].

Установлено, что разрушение внутриклеточного матрикса вызывает истончение стенки ЛЖ вследствие дилатацию И интрамуральной перегруппировки пучков кардиомиоцита и/или отдельных клеток внутри стенки ЛЖ [42] в большинстве случаев приводит к разобщенности сокращений камер и сегментов миокарда (диссинхронии), в следствие чего также происходит дополнительное влияние на скорость прогрессирования падения инотропной функции сердца. Это обстоятельство в конечном итоге приводит к необратимым процессам в миокарде, а именно к дилатации полостей, истончению стенки желудочка, повышению периферического сосудистого сопротивления, сопровождается дисрегуляционным И жидкости, дисбалансом гомеостазом вазодилатирующих И вазоконстрикторных нейрогуморальных систем, а также увеличением электрофизиологической нестабильности миокарда [43].

Увеличение содержания фиброзной коллагена И ткани внутриклеточного матрикса, включает изменение как его количества, так и его качества, которые на фоне ремоделирования миокарда и ухудшенной ЛЖ изменению функции способствуют структуры миокарда И электрофизиологической нестабильности.

Различают систолическую и диастолическую сердечную недостаточность. Сердечная недостаточность характеризуется нарушением расслабления ЛЖ сердца, так называемая ХСН с сохранной ФВ (ФВ>50%). Систолическая сердечная недостаточность характеризуется нарушением сократительной функции ЛЖ сердца ХСН с низкой ФВ (ХСНнФВ(ФВ <40%). При этом патофизиологические механизмы ХСН с различными фракциями выброса значительно отличаются [47].

На протяжении многих десятилетий и по сегодняшний день проводятся исследования, направленные на выявление взаимосвязи между патологическими процессами и метаболизмом макро- и микроэлементов в живом организме. Круг заболеваний, при которых исследуются изменения элементного состава организма ограничен онкологическими заболеваниями, сахарным диабетом и ожирением [45]. Особый интерес представляют исследования, направленные на изучение взаимосвязи патогенетических механизмов заболеваний сердечно-сосудистой системы с изменениями содержания и распределения макроэлементов, однако подобные работы единичны.

Синхронность левого желудочка оказывает важное влияние на эффективность ЛЖ. Доказано, что замедленная электрическая активация и ослабленная связь между возбуждением и сокращением приводит К механической дисперсии региональной активации, известной как диссинхрония, внутрижелудочковая которая оказывает отрицательное влияние на показатели сердечной деятельности [44]. При этом, отсутствие скоординированной механической функции ЛЖ создает дополнительные условия к прогрессирующему снижению сократимости ЛЖ, аномальной растяжению контрактурных сегментов ЛЖ, релаксации, изменению геометрии сердца и дилатации его полости, что является одним из ведущих механизмов прогрессирования ХСН. Каскад данных механизмов оказывает дополнительное отрицательное влияние, не только на внеклеточный матрикс, внутриклеточный элементный состав кардиомиоцита, HO И вызывая

изменения в его элементном составе [45]. Так, кальциевая перегрузка признана одним из важных факторов понижения механической активности кардиомиоцита.

Известно, что снижение скорости работы Na⁺- K⁺ насоса может причиной возникновения кальциевой являться перегрузки, Т.К. OHO способствует накоплению ионов натрия в кардиомиоцитах и как следствие увеличению обмена Na^+ - Ca^{2+} , что, в свою очередь ведет к накоплению ионов кальция [46]. Однако исследований, определяющих связь данных изменений в содержании и распределении макроэлементов в ткани миокарда у больных, в зависимости от типа сердечной недостаточности не проводилось. Также, в исследованиях, посвященных математическому моделированию нарушений ритма, важную роль играют режимы функционирования Na^+ - K^+ , Na^+ - Ca^{2+} и Ca²⁺ - Mg²⁺ насосов [82], что делает задачу сравнительного анализа данных экспериментального определения содержания И распределения макроэлементов в ткани миокарда у больных ХСН, в зависимости от состояния сократительной функции ЛЖ важной для определения новых дополнительных механизмов в формировании прогрессирования ХСН.

Считается, что в основе ХСНсФВ лежит прогрессирующий интерстициальный фиброз и жесткость кардиомиоцитов, что содействует манифестации и развитию диастолической дисфункции, с последующим присоединением систолической дисфункции [47,48]. Несмотря на важность ХСНсФВ, ее патофизиология плохо изучена, и оптимальное лечение остается в значительной степени неопределенным. Следовательно, нет рекомендаций класса А для улучшения клинических исходов у пациентов с ХСНсФВ [49].

Поиск новых механизмов прогрессирования ХСН, направленных на улучшение диастолической и систолической функции сердца, может иметь большое значение как в понимании патогенеза ХСНсФВ так и в последующем поиске воздействия на профилактику появления и прогрессирования ХСНнФВ [50]. Важным представляется сохранение высокой летальности данной категории больных. Аритмии являются

основной причиной смертности у пациентов с ХСН, а внезапная сердечная смерть ранее была связана с более высоким классом по классификации New York Heart Association (NYHA) [51,52]. Кроме того, в недавнем исследовании желудочковая аритмия наблюдалась у 45% пациентов. Риск смерти у пациентов с ХСН составляет от 10 до 50% [53].В тоже время, до 50% смертей вызвано в основном желудочковой тахикардией (ЖТ), вследствие чего развивается фибрилляция желудочков (ФЖ), или непосредственно ФЖ.

Считается, что субстратом фатальных нарушений ритма также является фиброз миокарда И нарушение локальной проводимости фоне на электролитных нарушений. Понятие миокардиального фиброза появилось в 1957 г. благодаря патоморфологу Е. G. Philpot и было ознаменовано введением в 1953 г. понятия внеклеточного матрикса миокарда. Под фиброзом миокарда понимают - прогрессирующее избыточное замещение рабочего миокарда и коллагеновыми волокнами внеклеточного матрикса (чем больше коллагена, тем выше жесткость не только сосудистой стенки, но миокарда) И стенки С последующим снижением сократимости И растяжимости сердца.

Изучение этих патофизиологических процессов, как одной из ведущих основ патогенеза ХСН, является одним из важных и актуальных направлений среди ученых и клиницистов в настоящее время.

Сердечная ткань включает в себя несколько групп клеток, основными из которых являются кардиомиоциты (КМЦ), сердечные фибробласты, миоциты, эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов, при этом большую часть из них составляют фибробласты и КМЦ. За счет этих клеток поддерживается электрическая, химическая и биомеханическая чувствительность органа [54].

Через аутокринную и паракринную регуляцию секретируемых факторов, а также через прямое межклеточное взаимодействие они формируют трехмерную структуру сердца. Поддержание трехмерной сети

сердца за счет синтеза и деградации внеклеточного матрикса, является одной из основных функций сердечных фибробластов.

ВМ включает в себя несколько основных типов белковых молекул -(основным компонентом ЭТО протеогликаны которых являются гликозаминогликаны) и фибриллярные белки двух функциональных классов которых преимущественно структурными являются гликопротеины ИЗ семейства коллагена и эластина, а преимущественно адгезивными – фибронектина и ламинина. ВМ предназначен для нескольких целей: популяции КМЦ, формирует каркас для помогает распределить механические силы по всему миокарду, с помощью рецепторов на клеточной поверхности передает механические сигналы между клетками, а также участвует в движении жидкости во внеклеточной среде [55].

Сердечный фиброз участвует в патологическом ремоделировании сердца, вызывая нарушения сердечной проводимости, жесткость стенок желудочков, снижение сократительной способности и ухудшение общей работы сердца [56].

Таким образом, фиброз сердца является дополнительным отрицательным фактором при формировании субстратов аритмий у больных с терминальной сердечной недостаточность, когда произошло изменение геометрии сердца, истончились волокна миокарда по эксцентрическому типу (преобладание объемов левого желудочка, над толщиной его стенки) морфологическая структура ЛЖ, И изменилась как следствие его функциональные способности. Существуют важные экспериментальные демонстрирующие, что фиброз замедляет данные, распространение потенциала действия. инициирует повторный ВХОД И способствует эктопической автоматичности, тем самым способствуя аритмогенезу [58; 59].

Многочисленные сигнальные пути вовлечены в активацию сердечного фиброгенеза [60], среди которых было обнаружено, что внутриклеточный Ca^{2+} играет особенно важную роль [61-63]. В последние годы наблюдается растущий интерес к выяснению механизмов передачи сигналов Ca²⁺.

Внутриклеточный кальций (Ca²⁺) сигнализирует о возбуждениисокращении (ВС) миокарда и, следовательно, необходим для того, чтобы сердце эффективно качало кровь в легочную артерию и аорту. Вследствие этого, любой дефект в механизме циклирования Ca²⁺ или в сложной сети белков, связанных с Ca²⁺которые поддерживают сердечныйгомеостазCa²⁺под строгим контролем, может серьезно нарушить работу сердца. Сократительная функция сердца обусловлена временным увеличением внутриклеточной концентрации Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), вызванной деполяризацией мембраны, в соответствии с процессом, известным как связывание с ВС [64-66].

Коротко можно этот процесс осветить следующим образом: когда потенциал действия, вызванный притоком натрия (Na⁺) через управляемые напряжением каналы Na^+ , распространяется вдоль Т-канальцев, деполяризация мембраны открывает $Ca_{v1,2}$, который является парообразующей α-субъединицей. Закрытые по напряжению каналы Ca²⁺Lтипа (VGCC), вызывают тем самым приток Ca^{2+} в диадическое соединение, сарколемму от близко расположенного (~15 нм) которое отделяет соединительного саркоплазматического ретикулума (CP) [67:68] В кардиомиоцитах ЛЖ [69]. Внеклеточный приток Ca²⁺вызывает значительное увеличение местного [Ca²⁺]_i, который активирует кластер (7–20) рецепторов рианодина типа 2 (RYR2) в процессе, известном как Ca²⁺-индуцированное высвобождение Ca²⁺ (CICR) и приводит к значительной степени высвобождения Ca²⁺ из соединительного СР, называемого искрами Ca²⁺. Следует отметить, что временное суммирование этих локальных событий по распространяющемуся потенциалу действия приводит к восстановлению Ca²⁺ переходного который обнаруживается И формированию периода, тропонином С для инициирования скольжения толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) филаментов, укорочения клеток и, следовательно, развития давления в каждом желудочке и выброса крови в кровоток во время систолы сердца. Впоследствии [Ca²⁺]_і падает, и механическая сила быстро

расслабляется до предсистолического уровня во время сердечной диастолы, что необходимо для того, чтобы сердечные полости наполнялись кровью. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ действительно является кратковременным, поскольку цитозольный Ca²⁺проникает через плазматическую мембрану с помощью Na⁺/Ca²⁺ канала (NCX1) и Ca²⁺-АТФаза, находящаяся в плазмолемме (PMCA), а также секвестрированная обратно в CP саркоэндоплазматическим ретикулумом Ca²⁺АТПазой 2a (SERCA2a) [70].

Связь постдеполяризации на уровне одного миоцита с аритмогенезом на всем уровне сердца чрезвычайно сложна и не до конца понятна. В неповрежденном сердце миоциты электрически связаны друг с другом, а это означает, что напряжение мембраны регулируется не одной, а несколькими клетками. Кроме того, вклад одной постдеполяризации, происходящей в одном источнике, вероятно, будет нейтрализован соседними клетками, не испытывающими постдеполяризацию. Однако при тяжелой сердечной недостаточности, механизмы изменяются и существуют подтверждающие экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что изменения ранней пост-деполяризации (РПД) также могут быть вызваны в результате Ca^{2+} особенно I_{TI} внутриклеточным активации В условиях перегрузки Ca²⁺[71; 72].

Доказано, что хаотическая РПД способна глобально синхронизироваться, в том случае если зоны ассинхронии ткани миокарда меньше критического размера.

Кроме того, работа той же группы также оценила, что число локальных задержанных постдеполяризаций миоцитов, которые необходимо синхронизировать, чтобы не вызвать преждевременное сокращение миокарда, будет очень большим, однако это может снизить структурное и электрическое ремоделирование [73].

Наконец, недавнее исследование, проведенное в лаборатории Берса, также показало, что при сердечной недостаточности намного выше плотность асинхронных Ca²⁺миоцитов, которые плохо связаны с

окружающим миокардом. Эти, плохо связанные, миоциты могут также способствовать инициации триггерной активности [74].

В последние годы стало очевидным, что Ca²⁺ контролирует реполяризацию и, следовательно, аритмогенез, является скорее локальным, а не глобальным явлением. Как функциональные, так и структурные микродомены определяют локальные концентрации Ca²⁺, градиенты и эффекторные белки. Поскольку эти домены, по-видимому, затрагиваются при CH, особенно когда мы рассматриваем β -адренергическую стимуляцию и растяжение, мы также должны учитывать, как происходит этот локальный контроль.

В миоцитах сердца Ca²⁺ принимает центральное участие во многих процессах, включая возбудимость, сокращение и регуляцию экспрессии генов. Такое разнообразие функциональных ролей постулирует существование выделенных микродоменов, В которых сигналы Са²⁺генерируются независимо от концентрации цитозольного Са²⁺ и распознаются макромолекулярными сигнальными компонентами, этих микродоменах. Помимо функционального локализованными В Са²⁺микродомены компонента, физически часто ограничены специализированными мембранными структурами субклеточными И компартментами. Специализированные структуры включают диадические соединения между поперечными мембранными инвагинациями (Т-трубочки) и SR, сарколеммальные домены вне диад, такие как липидные рафты и кавеолы, и внутриклеточные структуры, такие как привязные соединения между SR и митохондриями. Интересно, что компартментализация белков, которые генерируют или регулируют передачу сигналов Ca²⁺микродомена, является динамической, часто как причина или следствие заболевания. Например, нейрональная NO-синтаза (nNOS), связанная с RyR, может транслоцироваться из диады в сарколемму, которая изменяет их функцию, путем соединения предположительно с различными сигнальными комплексами[75;76].

Зависимое от увеличения полостей ЛЖ регулирование системы Ca^{2+} осуществляется посредством процесса механотрансдукции. Его механизмы включают множество сигнальных каскадов, нацеленных на разнообразные внутриклеточные источники Ca^{2+} , включая SR и митохондрии [83]. Однако, работ изучающих при тяжелой сердечной недостаточности Ca^{2+} -зависимые механизмы аритмий, вызванных увеличением размеров и объемов сердца и в частности механизмы диссинхронии с изучением качественного и количественного локального содержания в миокарде не проводилось.

Известно. механочувствительность RyR ЧТО является частью эффективной адаптации к преднагрузке и постнагрузке за счет повышения эффективности локального высвобождения Ca²⁺, она также вызывает спонтанные всплески Ca²⁺ во время диастолы. В нормальном сердце данное повышение Ca²⁺ вызванные растяжением, локально ограничены. При определенных условиях, когда одновременно возникает больше всплесков Ca²⁺ с образованием волн Ca²⁺, адаптивная к нагрузке система Ca²⁺ может превратиться в аритмогенный механизм. Индуцированное растяжением увеличение содержания активных форм кислорода (ROS), всплесков содержания Ca^{2+,} а также скорости распространяющихся волн Ca²⁺ градуируется, то есть повышается с увеличением степени растяжения [77]. Таким образом, дилатация камер, чаще вызывает вентрикулярную эктопию [78].

Механическая диссинхрония, часто обусловленная структурной неоднородностью тканей, является еще одним компромиссным фактором. В случае диссинхронных сокращений волны Ca²⁺возникают из не-CP-источника в результате диссоциации Ca²⁺от сократительных нитей во время поздней релаксации неоднородной сердечной мышцы.

Большее количество активных форм кислорода (ROS) также может быть вызвано гиперчувствительностью механочувствительной передачи сигналов из-за активизации молекулярного компонента, что было продемонстрировано на мышиной модели мышечной дистрофии Дюшенна,

которая показала активацию NOX2 и продуцировала волны $Ca^{2+}в$ ответ на умеренное растяжение [79]. В дополнение ROS также активирует EAD посредством реактивации I_{CaL} [80] или повышенного позднего тока Na⁺.

 Ca^{2+} физиологических Огромная роль И патофизиологических процессах не вызывает сомнений. В связи с чем исследования направленные связей на установление между патогенетическими механизмами прогрессирования хронической сердечной недостаточности у больных с сохранной и низкой фракцией выброса, с изменениями содержания и распределения макроэлементов (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+) в ткани миокарда являются новыми, малоизученными и крайне перспективными.

Заключение к главе 1

В первой главе производится анализ существующих методов электронной микроскопии, позволяющих проводить измерение содержания и распределения содержания макроэлементов, однако, разрешающая способность метода, т.е. способности выделить на рентгенограмме пик концентрации элемента на фоне тормозного рентгеновского излучения ограничена 1000 ppm или 0.1 wt %. В главе отмечается, что картирование элементного состава методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС картирование), который имеет широкое применение в области физического материаловедения и физики конденсированного состояния, имеет ряд критических недостатков при работе с биологическими образцами, а именно:

1. Неспособность биологического образца противостоять длительному разрушающему воздействию электронного пучка энергии 30 кЭв в условии низкого давления.

2. Отсутствие необходимых для количественного анализа эталонных образцов.

3. Низкая плотность и «лабильность» биологических образцов.

4. Отмечается, что макроэлементы $Ca^{2+,}$ K⁺, Mg^{2+} , Na^+ играют ключевую роль в механизме мышечного сокращения. Необходимость разработки методики качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей объясняется отсутствием методик, позволяющих проводить одновременное измерение пространственного распределения содержания $Ca^{2+,}$ K⁺, Mg^{2+} , Na^+ в биологических тканях.

5. Отмечается, что различные нарушения метаболизма Ca²⁺ в миокарде являются причиной серьезных патологических процессов, приводящих к нарушению сердечного ритма.

Глава 2. Методика качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологической ткани

В ходе выполнения исследовательской работы нами была разработана и опробована новая методика картирования макроэлементного состава биологических тканей малой массы (биопсии, аутопсии).

Анализ образцов биологических тканей малой массы (до нескольких миллиграмм) является крайне сложным случаем при исследовании биологических образцов. Данная задача возникает при исследовании локальных участков ткани, затронутых патофизиологическими процессами, при исследовании материала биопсии. В таком случае количество сухого образца биологической ткани может составлять менее 20 мг, последующее растирание и прессование таких образцов может быть вообще невозможно из-за неизбежных потерь материала [84]. Примеры работ. где количественный ЭДС анализ цельных образцов биологических тканей проводится напрямую, крайне немногочисленны [85]. В данном случае проблема несоответствия характеристик стандартных и исследуемых образцов возникает особенно остро. Прямой анализ цельных образцов биологической ткани с минимальной пробоподготовкой является перспективной возможностью и неоспоримым достоинством метода ЭДС.

Развитие методов анализа химического состава, а именно оптикоэмиссионной спектрометрии параллельного действия с ИНДУКТИВНОсвязанной плазмой (ИСП-ОЭС) позволило разработать методику качественного и количественного картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным методом ИСП-ОЭС/ЭДС, представленная на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1. Структурная схема методики количественного картирования макроэлементного состава биологической ткани.

Калибровка результатов ЭДС картирования по данным о содержании макроэлементов, полученных методом ИСП-ОЭС, позволяет локализовать область содержания макроэлементов. ЭДС - картирование осуществлялось при помощи растрового электронного микроскопа (FEI 200, FEI 600, FEI Nova NanoSEM). Использование нескольких моделей растровых электронных обусловлено необходимостью микроскопов проверки повторяемости картирования. Калибровочные результатов данные 0 содержании макроэлементов в исследуемом образце были получены при помощи вакуумного спектрометра с индуктивно связанной плазмой ІСРЕ-9000 одновременного действия с CCD детектором с оптической схемой эшеллеспектрометра (точность определения элементов согласно паспорту 1-10 ppb). Контроль морфологической целостности тканей осуществлялся при помощи просвечивающих электронных микроскопов FEI Tecnai и Jeol JEM-2100 (Энергия электронов = 60 кВ) с целью исключения влияния деградации биологической ткани (лизис) вследствие ишемии. Волокна миокарда левого желудочка фиксировали 4% глутаровым альдегидом с 0.1М фосфатном 1% раствором OsO₄ и 2%буфере (рН 7.2–7.4), контрастировали нымуранилацетатом, последовательно обезвоживали и заключали в Эпон812. Продольные ультратонкие срезы дополнительно контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Максимальное время хранения тканей с момента забора до анализа при температуре 5°C не превышало 240 минут. ЭДС - картирования с тонких пленок образцов в режиме сканирующей электронной микроскопии дали отрицательные результаты ввиду крайне низкой толщины (35 нм) пленки, что недостаточно ДЛЯ характеристического генерации рентгеновского излучения макроэлементов.

Информация об области (глубине) генерации ХРИ и площади области сканирования образца позволила вычислить объем исследуемой области по формуле:

$$V = R * S. \tag{2.1}$$
Формула Канайя - Окаямы [86] и экспериментальные кривые глубины проникновения электронов в материалы различной плотности, указанные на рисунке 2.2, позволили оценить глубину проникновения падающих электронов в биологический образец:

$$R = 0.0276 * E^{1.67} * \frac{A}{\rho * Z^{0.889}},$$
(2.2)

где [E] = кэВ; [A] = г/моль;

 $[\rho] = \Gamma/cM3;$

 $[\mathbf{R}] = \mathbf{M}\mathbf{K}\mathbf{M}.$

Так, в нашем случае, глубина генерации ХРИ составила от 0.3 до 20 мкм в зависимости от белкового состава образца, что соответствовало диаметру кардиомиоцита человека (10-20 мкм).



Рисунок 2.2. Экспериментальные кривые глубины проникновения электронов в материалы различной плотности (адаптировано из [87]).

Площадь области сканирования исследуемого образца рассчитывается по формуле:

$$S = m * n * S_n^2 , (2.3)$$

где *m* и *n* – количество пикселей карты по горизонтали и вертикали соответственно;

 S_n^2 - площадь одного пикселя в мкм².

Калибровка осуществлялась карты путем приравнивания интегрального значения интенсивности пика ХРИ макроэлемента со значением содержания данного макроэлемента полученным методом ИСП-ОЭС в единице объема. Высота пика ХРИ макроэлемента Іпропорционально содержанию макроэлемента в объеме, в котором происходила генерация рентгеновского излучения. ZAF коррекция т.е. учет различий в рассеянии электронов, обусловленных атомным номером (Z), влиянием поглощения (A) рентгеновского излучения в заданном объеме и изменением интенсивности вследствие выхода флюоресценции (F) (флюоресценция характеристических рентгеновских лучей с энергией Е₁ существенно усиливается, если энергия характеристического излучения E_2 чуть выше, чем E_1 : $E_2 = E_1 + \Delta E$) учитывалась в программном пакете EDAX Genesis.

Так, зная эталонное значение концентрации макроэлемента С_еполученное методом ИСП-ОЭС, вычислялось содержание макроэлемента в объеме, соответствующему одному пикселю на карте С_р по формуле:

$$C_p = \frac{m_p}{S_p^2 * R} = \frac{I_{mn}}{m * n * S_p^2 * R} * C_e, \qquad (2.4)$$

где *I_{mn}* – интегральная интенсивность пика ХРИ макроэлемента со всей области сканирования;

2.1 Протокол методики

С целью обеспечения повторяемости результатов и унифицирования процесса анализа был разработан протокол методики. Полученный образец массой не менее 2,5г делился на три части: 1,0г, 1,0г и 0,5г (I, II и III часть соответственно). Часть І шла на исследование макроэлементного состава методом ИСП-ОЭС. Проба растворялась в 100 мл азотной кислоты при нагревании в камере СВЧ печи. Так же подготавливались три раствора элемента известной концентрацией. исследуемого С Bce растворы ИСП-ОЭС анализировались методом c последующим определением концентрации в образце методом калибровочных кривых. Данные о содержании макроэлементов, полученные данным методом (рис. 2.3) выступили в качестве эталонных значений концентраций элементов.



Рисунок 2.3. Определение концентрация Mg методом калибровочных кривых.

Вторая часть прессовалась с последующей дегидратацией на воздухе. В данном образце исследовалось содержание макроэлементов методом ЭДС (рис 2.4).

Детектором ЭДС приставки сканирующего электронного микроскопа является полупроводниковый детектор ионизирующего излучения. В нашем случае использовался кремниевый дрейфовый детектор (silicon drift detector - SDD), установленный в Octane Elect ЭДС системы, предел разрешения которого составляет 127 эВ по линии MnK_{α} с ограничением входной скорости счета порядка 500 тысяч отсчетов в секунду.

Полученные методом ЭДС данные использовались при определении интегральной интенсивности I_{mn} со всей области сканирования образца.



Рисунок 2.4. Определение содержания макроэлементов в биологическом образце методом РФА.

Нестандартная для методов электронной микроскопии фиксация образца эпоксидным клеем с нано частицами серебра и нано частицами углерода в соотношении 1:0.5:0.5 соответственно (рис.2.5) позволяет поверхности образца, обеспечить оптимальное токоотведение с что позволяет отказаться от углеродного или металлического напыления на поверхность образца, не совместимого с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией. Углеродное картирование напыление делает 40

нём макроэлементов невозможным ввиду поглощения на характеристического рентгеновского излучения. Напыление слоя металлов, не входящих в состав образца вносит ошибки, связанные с ложным энергодисперсионного срабатыванием детектора ввиду близкого расположения К линий элементов I и II группы третьего и четвертого периодов таблицы Менделеева и L линий элементов I и II группы пятого и шестого периода таблицы Менделеева.



Рисунок 2.5. Фиксация биологического образца эпоксидным клеем с нано частицами серебра и нано частицами углерода в соотношении 1:0.5:0.5.

При длительном исследовании образцов в камере сканирующего электронного микроскопа большой проблемой является, т.н. дрейф образца с течением времени. Данная проблема возникает при исследовании методом дифракции обратно рассеянных электронов и ЭДС картирования.

Специально подобранный режим работы сканирующего электронного микроскопа в соответствии с таблицей 2.1 позволил обеспечить стабильность биологического образца при длительной экспозиции (4 - 12 часов без дрейфа)

в камере электронного микроскопа и исключить сокращение ткани под действием электронного луча (рис. 2.6 а, б) и обеспечить отсутствие дрифта при длительной экспозиции под действие электронного луча (рис. 2.7 а, б). Контроль дрифта образцов осуществлялся при помощи специальный меток (например, CaCO₃). По взаимному расстоянию между метками делался вывод о стабильности образца (расстояние между метками) и дрифте электронного луча (метки на картировании размыты).

Таблица 2.1. Режим работы микроскопа при картировании макроэлементного состава ткани.

Параметры	Значение, ед. измерения
Ускоряющее напряжение	30 кэВ
Увеличение	800 pa3
Угол приема сигнала (угол детектора)	39°
Время накопления сигнала на пиксель	300 мкс
Усиление по времени	51,2 мкс
Матрица	1024x1024 пикселей
Микрон/пиксель Х	0,286мкм
Микрон/пиксель У	0,286мкм

Корректировке получаемого сигнала ХРИ от биологического образца осуществлялась при помощи дискриминатора детектора таким образом, чтобы данные количественного анализа совпадали с результатами ИСП-ОЭС, т.е. осуществлялось увеличение точности результатов картирования до 10-30 ppm (рис. 2.8). Данный подход позволяет решить проблему отсутствия эталонных калибровочных образцов тканей миокарда ЛЖ человека и крысы, необходимых при стандартном количественном исследовании образцов методом ЭДС.



Рисунок 2.6. а) Электроннограммакардиомиоцитов ЛЖ человека; б) Картирование макроэлементного состава кардиомиоцитов ЛЖ человека в спектре углерода.



Рисунок 2.7. а) Электроннограммакардиомиоцитов ЛЖ человека с элементными метками CaCO₃ б) Картирование макроэлементного состава кардиомиоцитов ЛЖ человека в спектре кальция с элементными метками CaCO₃.

Знания о глубине генерации, размерах пикселя и содержании макроэлементах в эталоне позволили пересчитать уловные единицы ЭДС детектора в содержание макроэлемента в программном пакете

MATLAB/Simulink 2016г, что позволило осуществить количественное картирование макроэлементов в образце массой 0.5 г, представленном на рисунке 2.9.



Рисунок 2.8. Картирование ткани миокарда левого желудочка человека по С, Ca, K, Na, P, S с калибровкой детектора.

При оценке неоднородности распределения содержания макроэлементов в биологических тканях применялись два математических метода: метод сингулярного разложения матриц и метод нормированной взаимной кросс корреляции. Данные методы себя отлично зарекомендовали в таких областях как обработка сигналов, методы машинного обучения и компьютерное зрение.

2.2. Анализ результатов картирования методом сингулярного разложения матриц

Сингулярное разложение (Singular Value Decomposition, SVD) декомпозиция вещественной матрицы с целью ее приведения к каноническому виду.



Рисунок 2.9 - Картирование содержания Са, К, Мg, Na в миокарде ЛЖкрысы линии «Вистар»

Согласно теореме Форсайта [88], для любой вещественной (n×n)матрицы A существуют две вещественные ортогональные (n × n) - матрицы U и V такие, что $U^T A V = \Lambda$. В случае произвольной матрицы A размера m×n, необходимо построить её разложение в виде:

$$A = USV^*, \tag{2.5}$$

где *U* и *V* - унитарные матрицы размера m×m и n×n соответственно, *S* - диагональная матрица с вещественными положительными числами на диагонали. Диагональные элементы матрицы S - сингулярные числа матрицы A, a столбцы матриц U и V - левый и правый сингулярный вектор соответственно. Учитывая, что подобные матрицы будут иметь подобные сингулярные числа, задача определения изменения распределения элемента в биологической ткани сводится к вычислению и сравнению сингулярных чисел. Полученные карты представлялись в виде матриц размерностью 1024х800. В результате сингулярного разложения экспериментально полученных карт (матриц), в программном пакете MATLAB/Simulink 2019a (команда svd(A)) были получены матрицы U, S, и V*. Диагональные элементы матрицы S записывались в отдельный вектор s. Значение угла theta между вектором s_e экспериментально полученных карт и вектором s_n матрицы, все элементы которой равны 1 пропорционально степени неоднородности распределения макроэлемента в ткани миокарда и должно вычисляться по формуле:

$$theta = \arccos[\underbrace{(s,s_n)}_{|s|*|s_n|}), \tag{2.6}$$

2.3 Анализ результатов картирования методом нормированной взаимная корреляция

Метод нормированной взаимной корреляции позволил производить сравнение карт содержания макроэлементов. Рассмотрим карты содержания макроэлементов в качестве двумерных функций яркости (дискретных двумерных матриц интенсивности сигнала), тогда для сравнения необходимо посчитать либо расстояние между изображениями, либо меру их близости. Представив одну карту как функцию (многомерный вектор) F, а вторую карту как функцию (многомерный вектор) G, получим значение корреляции (F,G):

$$(F,G) = \sum F(i) \times G(i), \qquad (2.7)$$

Данная величина является скалярным произведением двух функций. В качестве меры расстояния между картами использовалась следующая величина:

$$m(F,G) = \frac{(F,G)}{|F| \times |G|},$$
(2.8)

При работе с большими массивами данных (размерность карты составляет в среднем 1000х1000 элементов) применялась операция свертки. Согласно определению, свёрткой функций F и G является функция F×G такая, что:

$$F \otimes G(t) = \sum_{t=-\infty}^{\infty} F(i) \times G(t-i), \qquad (2.9)$$

Тогда, при условии G'(t) = G(-t) получим выражение для корреляции двух изображений:

$$m(F,G) = F(t) \otimes G'(t), \qquad (2.10)$$

Далее, применяя преобразование Фурье (F), получим:

$$F \otimes G'(t) = BFT(FFT(F) \otimes FFT(G')), \qquad (2.11)$$

где *FFT* – операция прямого преобразования Фурье;

BFT– операция обратного преобразования Фурье.

Полученное выше выражение позволяет вычислить взаимную корреляцию двух карт, т.к. функция взаимной корреляции связана с функцией свёртки отношением:

$$F(t) \star G(t) = F(t) \otimes G'(-t), \qquad (2.12)$$

Программный пакет MATLAB (Mathworks) позволяет относительно быстро вычислять нормированную взаимную корреляцию двух функций с помощью команды *normxcorr2*. Сквозной алгоритм выполнения данной команды заключается в:

вычислении функция взаимной корреляции в пространственной или частотной областях в зависимости от размерности массива;

 вычислении локальных сумм методом промежуточного суммирования;

использовании локальных сумм для нормализации функции кросс корреляции и вычисления коэффициентов корреляции.

Данный математический метод применялся в контексте поиска областей на ЭДС картах распределения макроэлементов областей, в которых концентрация макроэлементов превышало в 2.5-3 раза среднее значение содержания данного макроэлемента в зоне исследования. Графическое представление данного метода (рис. 2.8, 2.9) позволяет определить области, удовлетворяющие условию поиска. Координаты по осям X и Y даны в пикселях. Полученная в результате описанной выше процедуры нормированная неоднородность о (в процентах) указана вдоль по оси Z.



Рисунок 2.8. Карта нормированной неоднородности σ содержания кальция в ткани миокарда ЛЖ человека. Содержание Сав данном участке ткани находится на уровне 3-5% выше медианного.



Рисунок 2.9. Карта нормированной неоднородности σ содержания кальция в ткани миокарда ЛЖ человека. Содержание Са в данном участке ткани находится на уровне 9-10% с ярко выраженными областями неоднородности 50-65% выше нормы.

Использование реализованного В программном пакете MATLAB/Simulink2019a описанного выше математического метода позволяет выяснить, имеются ли в поле измерения области локальной перегрузки кардиомиоцитов определенным макроэлементом и если да, то локализовать данную область. Следует также отметить, что измеренная различными методами степень неоднородности *v* имеет одинаковые значения, и если первый дает интегральный показатель неоднородности, то второй дает её локализацию.

Приведенная степень неоднородности вычисляется по формуле:

$$\nu = \frac{\sigma * 1000}{\text{S}},\tag{2.13}$$

где σ - нормированная неоднородность [0,1]; S- площадь неоднородности.

Заключение к главе 2

Разработанная методика картирования макроэлементного состава биологических образцов, заключается в определении референтных значений концентраций макроэлементов методом ИСП-ОЭС и калибровке детектора при помощи дискриминатора таким образом, чтобы результаты исследования калибровочных образцов совпадали. Данный метод позволяет увеличить точность картирования макроэлементного состава биологических образцов в сто раз до 10-30 ppm, что является количественным картированием макроэлементного состава биологических образцов и несет практическую значимость для медицины.

При оценке неоднородности распределения содержания макроэлементов в биологических тканях применялись два математических метода: метод сингулярного разложения матриц и метод нормированной взаимной кросс корреляции. Первый метод сводит задачу оценки неоднородности распределения макроэлементов в биологических тканях к вычислению и сравнению сингулярных чисел массивов (карт). Второй областей позволил определить наличие поле измерения локальной неоднородности распределения содержания макроэлементов, локализовать данные области и определить степень неоднородности по шкале от 0 до 100 при различных критериях задания поиска неоднородности.

Глава 3. Экспериментальное исследование изменения содержания макроэлементов в ткани миокарда крысы в постморбидный период

ЭЛС Описанная BO второй главе методика количественного картирования имеет огромный потенциал при исследовании различных патофизиологических биологических изменений В тканях человека, ассоциированных с электролитным дисбалансом макроэлементов. Влияние макроэлементов на патогенез, клинику развитие осложнений заболеваний не вызывает сомнений.

При проведении клинических исследований обычно оценивается тканевое, сывороточное и эритроцитарное содержание макроэлементов. Имеются достаточное количество референтных значений, позволяющих отделить «гипер-» и «гипо-» содержание макроэлементов от нормы. Так, к выявление самого факта артериальной гипертензии примеру, vже подтверждает имеющийся тканевой или сывороточный дефицит калия и магния, что сразу является показанием для дополнительного введения данных макроэлементов в виде медикаментозных препаратов. Однако все клинические показатели оценивают интегральное содержание макроэлемента в пробе и в случае с тканевым содержанием теряют информацию о пространственном распределении макроэлементов в ткани. Применимость разработанной методики, с целью получения данных о распределении макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека, находилась под вопросом, т.к. на момент проведения исследования отсутствовала информация о влияние ишемических процессов в ткани на распределение макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека, в связи с чем, изучение изменения содержания постморбидный период различной макроэлементов В длительности представляло как научный, так и практический интерес. В данной главе исследования результаты экспериментального приводятся изменения содержания и распределения Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в ткани миокарда левого

желудочка модельного животного – крысы линии Вистар спустя 30 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч и 12 ч после эвтаназии.

3.1. Материалы и методы исследования

В ходе выполнения работы было проведено патологоанатомическое вскрытие тридцати крыс с последующим удалением сердечной мышцы. Медикаментозная эвтаназия проводилась хлоралгидратом в дозировке 10 мкг на один грамм веса животного в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Летальный исход наступал вследствие брадикардии с последующей остановкой дыхания.

Крысы делились на пять групп в зависимости от продолжительности постморбидного периода: 30 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч и 12 ч (группы RAT30`, RAT1H, RAT3H, RAT6H, RAT12H соответственно). Взвешивание крыс производилось при помощи лабораторных весов (Ш класс точности) ввиду необходимости расчета дозы хлоралгидрата при инъекции (таблица 3.1). Смерть констатировалась по прошествии 15 минут с момента инъекции на основании вероятностных признаков смерти: отсутствие деятельности нервной системы, отсутствие сердцебиения, отсутствие внешнего дыхания. Начало отсчета продолжительности постморбидного периода совпадает с моментом констатации смерти.

Образцы	RAT30`(n=6)	RAT1H	RAT3H	RAT6H	RAT12H
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Масса, г	190±20	190±20	192±20	190±20	191±20

Таблица 3.1. Масса исследуемых крыс на момент эвтаназии (n=30).

В течение всей продолжительности постморбидного периода крысы находились в индивидуальных контейнерах при температуре 10±1°C ввиду необходимости замедлить аутолитические изменения, т.к. у крыс они

протекают значительно быстрее. Известно, что 2,5-часовая ишемия не приводит к гибели кардиомиоцитов крысы. Через 2,5 часа после начала ишемии в миокарде прогрессируют патологические изменения в ультраструктуре ядерного и митохондриального аппаратов. Сократительный аппарат кардиомиоцитов остается без патологических изменений [89]. В случае миокарда ЛЖ человека подобное состояние ткани наблюдается через 6 часов после начала эпизода ишемии.

Патологоанатомическое вскрытие проводилось по прошествии 30 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч и 12 ч (рис 3.1).



Рисунок 3.1. Внутренние органы крысы при разной продолжительности постморбидного периода.

Удаленная ткань миокарда промывалась изотоническим раствором хлорида натрия с целью удаления крови с исследуемого образца и помещались в 0,2 М фосфатном буфере (pH = 7,3 - 7,4).

Определение концентрации в тканях миокарда осуществлялась методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС). Картирование макроэлементного состава тканей осуществлялось комбинированным методом ИСП-ОЭС/ЭДСсогласно протоколу методики. Статистическая обработка данных проводились в программном пакете MATLAB 2019a (Mathworks).

3.2. Результаты картирования методом ИСП-ОЭС/ЭДС

В результате исследования образцов методом ИСП-ОЭС были получены данные о содержании Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺в миокарде ЛЖ тридцати крыс линии Вистар при различных длительностях постморбидного периода методом калибровочных кривых.

Образцы	Ca, mg/L	K, mg/L	Mg, mg/L	Na, mg/L
30 мин	0,22±0.02	5,24±0.05	0,34±0.03	2,63±0.03
1ч	0,22±0.02	5,56±0.05	0,30±0.03	2,15±0.03
3ч	0,20±0.02	5,09±0.05	0,39±0.03	2,44±0.03
бч	0,22±0.02	5,01±0.05	0,21±0.03	2,24±0.03
12 ч	0,22±0.02	5,53±0.05	0,40±0.03	2,45±0.03

Таблица 3.2. Содержание макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ крысы.

Обнаружено отсутствие достоверных различий (p=0.05)в концентрациях Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ между исследуемыми группами.

Количественное картирование содержания Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ (рис. 3.3) в ткани миокарда ЛЖ крыс позволило определить содержание элементов в слое толщиной до 10 мкм. Статистически значимых различий (p = 0.05) при оценке распределения содержания Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в тканях миокарда ЛЖ обнаружить не удалось (таблица 3.3-3.6).



Рисунок3.2. Зависимость концентраций Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ в зависимости длительности постморбидного периода (шесть измерении на точку, σ=±0.05 мг/л).

Таблица 3.3. Статистические различия между картами распределения Cap=0.05 (Статистический анализ (угол между подпространствами)).

Длительность	Статистистич	неские разли	ичия, усло	вные един	ицы
постморбиного периода	30 мин	1ч	3ч	6ч	12 ч
30 мин	0	4.1*10 ⁻⁵	1.6*10 ⁻⁵	3.7*10 ⁻⁵	3.1*10 ⁻⁵
1 ч	4.1*10 ⁻⁵	0	7.9*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	6.7*10 ⁻⁵
3 ч	1.6*10 ⁻⁵	7.9*10 ⁻⁵	0	9.6*10 ⁻⁴	3.4*10 ⁻⁴
6 ч	3.7*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	9.6*10 ⁻⁴	0	3.0*10 ⁻⁴
12 ч	3.1*10 ⁻⁵	$6.7*10^{-5}$	3.4*10 ⁻⁴	3.0*10 ⁻⁴	0

Кр=0.05 (Статистический анализ (угол между подпространствами)).						
Длительность постморбиного периода	Статистистические различия, условные единицы					
постморойного периода	30 мин	1ч	3ч	6ч	12 ч	
30 мин	0	$4.1*10^{-5}$	1.6*10 ⁻⁵	$3.7*10^{-5}$	3.1*10 ⁻⁵	
1 ч	$4.1*10^{-5}$	0	7.9*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	6.7*10 ⁻⁵	
3 ч	1.6*10 ⁻⁵	7.9*10 ⁻⁵	0	9.6*10 ⁻⁴	3.4*10 ⁻⁴	
6 ч	3.7*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	9.6*10 ⁻⁴	0	$3.0*10^{-4}$	

12 ч

Таблица 3.4. Статистические различия между картами распределения

Таблица 3.5. Статистические различия между картами распределения Мдр=0.05 (Статистический анализ (угол между подпространствами)).

6.7*10⁻⁵

3.4*10⁻⁴

3.1*10⁻⁵

0

3.0*10⁻⁴

	Статистистические различия, условные					
длительность		единицы				
постморойного периода	30 мин	1ч	3ч	6ч	12 ч	
30 мин	0	$4.1*10^{-5}$	$1.6*10^{-5}$	$3.7*10^{-5}$	3.1*10 ⁻⁵	
1 ч	$4.1*10^{-5}$	0	7.9*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	6.7*10 ⁻⁵	
3 ч	$1.6*10^{-5}$	7.9*10 ⁻⁵	0	9.6*10 ⁻⁴	3.4*10 ⁻⁴	
6 ч	3.7*10 ⁻⁵	$1.4*10^{-4}$	9.6*10 ⁻⁴	0	3.0*10 ⁻⁴	
12 ч	3.1*10 ⁻⁵	6.7*10 ⁻⁵	3.4*10 ⁻⁴	3.0*10 ⁻⁴	0	

Таблица 3.6. Статистические различия между картами распределения Nap=0.05 (Статистический анализ (угол между подпространствами)).

	Статистистические различия, условные						
		единицы					
постморойного периода	30 мин	1ч	3ч	6 ч	12 ч		
30 мин	0	1.1*10 ⁻⁵	3.3*10 ⁻⁵	3.7*10 ⁻⁵	3.1*10 ⁻⁵		
1 ч	1.1*10 ⁻⁵	0	1.9*10 ⁻⁵	5.3*10 ⁻⁴	6.7*10 ⁻⁵		
3 ч	3.3*10 ⁻⁵	1.9*10 ⁻⁵	0	9.6*10 ⁻⁴	$3.4*10^{-4}$		
6 ч	$3.7*10^{-5}$	5.3*10 ⁻⁴	9.6*10 ⁻⁴	0	$3.0*10^{-4}$		
12 ч	3.1*10 ⁻⁵	$6.7*10^{-5}$	$3.4*10^{-4}$	$3.0*10^{-4}$	0		



Рисунок 3.3. Картирование содержания Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ в миокарде ЛЖ крысы линии «Вистар».

3.3.Анализ результатов картирования методом сингулярное разложения матриц

Сингулярное разложение карт распределения элементов проводилось для карт распределения Са, К, Мg, Na. Все элементы матрицы сравнения равнялись среднему значению пикселя в исследуемой карте (равномерная матрица). Угол theta между сингулярными векторами вычислялся методом определения угла между двумя подпространствами, т.к. векторное произведение, необходимое для вычисления угла между двумя векторами

векторов, размерностью 3 и 7. Угол между введено для ДВУМЯ подпространствами вычислялся при помощи функции subspace(A, B) в программном пакете MATLAB 2019а. Так, к примеру, если некоторый физический эксперимент описывается массивом А, а вторая реализация данного эксперимента – массивом В, то функция subspace(A, B) измеряет количество новой информации, полученной из второго эксперимента и не связанной со случайными ошибками и флуктуациями. Применительно к анализу неоднородности распределения элементов, данная функция показывает меру неоднородности распределения элемента, т.к. вектор сравнения – сингулярные числа равномерной матрицы. Так, чем больше угол неоднородность theta, тем сильнее распределения элементов В экспериментально полученной карте. С целью определения «шумового» значения угла theta в программном пакете MATLAB 2019а были созданы две матрицы размерностью 1200 на 800 элементов. Первая матрица имела все (ones(1200, 800)),элементы вторая равные единице непрерывно распределенные, случайные числа в диапазоне от 0 до 1 (rand(1200, 800)). Двадцать последовательных экспериментов со случайно сгенерированными матрицами дали значение угла theta = 0.5232 ± 0.0005 . Данное значение угла theta считалось «шумовым», а различие в распределении элементов в данном диапазоне считались незначительными.

Данный метод позволил обнаружить (таблица 3.7) отсутствие неоднородностей распределения Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ в ткани миокарда ЛЖ крысы, т.к. угол неоднородности theta имеет значение в пределах [0.5815, 1.5526], которые незначительно (максимум на один градус) превышают уровень шума.

При интерполяции полученных данных была получена экспериментальная кривая (рисунок 3.4)зависимости угла неоднородности распределения Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ от продолжительности постморбидного периода.

	Таблица 3.7	7. Значения	углов	неоднор	одности	распреде	ления	Са в	ткани
миок	арда крысы.								

Т постморбил периола	Время проведения эксперимента				
Угол theta, рад.	30 мин	1ч	3ч	6ч	12 ч
Са	1.3050	1.3319	1.1650	1.0457	0.8781
К	1.5226	1.4347	1.2312	1.2145	1.1463
Mg	0.8241	0.9710	1.0391	1.0373	1.1029
Na	0.9301	1.1339	1.4301	0.9250	1.2651



Рисунок 3.4. Зависимость угла неоднородности распределения Ca, K,Mg, Na, Feot продолжительности постморбидного периода.

3.4.Анализ результатов картирования методом нормированной взаимной корреляции

При изучении карт содержания Ca, K,Mg, Na также использовался метод нормированной взаимной корреляции. Использование данного математического метода обусловлено необходимостью ответа на вопрос: имеются ли в поле измерения области локальной перегрузки кардиомиоцитов определенным макроэлементом, и если да, то какова локализация данной области. Данный подход позволяет не только обнаружить, но и определить степень неоднородности по шкале от 0 до 1 при заданном критерии поиска неоднородности. В качестве «образа» неоднородности выступала матрица G, элементы которой превышали в 2.5 раза среднее значении исследуемой карты в радиусе 200 пикселей (57.2 мкм).

Вычисление функции взаимной корреляция исследуемой карты с матрицей неоднородности проводилось В программном пакете MATLAB2019a с применением модуля NVIDIA CUDA, позволяющего проводить расчеты на графических процессорах (GPU), что значительно ускорило вычисления. Графики функций normxcorr2(G,X) для каждого из исследуемых макроэлементов, где Х – исследуемая карта, представлены на рисунках 3.5-3.8. На рисунках видно отсутствие областей, содержание макроэлемента в которых превышает в 2.5 раза (красная область на шкале) среднее значение содержания макроэлемента в исследуемой карте, что об отсутствии локальных позволило сделать вывод перегрузок кардиомиоцитов кальцием, калием, магнием и натрием. Данный факт позволил говорит о применимости методики ИСП-ОЭС/ЭДС картирования различных патофизиологических изменений при исследовании в биологических ассоциированных с электролитным тканях человека, дисбалансом макроэлементов, т.к. в норме не наблюдалось значимого (p=0.05) изменения в локализации содержания макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ крысы в зависимости от продолжительности постморбидного Особый периода. интерес представляет информация 0 возможных

изменениях в распределении содержания макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека в зависимости от наличия или отсутствия патологий сердца.



Рисунок 3.5. Картирование неоднородности содержания Са в миокарде ЛЖ крыс при различной длительности постморбидного периода (0 – нормальное содержание, превышение содержания макроэлемента в 2.5 раза).



Рисунок 3.6. Картирование неоднородности содержания К в миокарде ЛЖ крыс при различной длительности постморбидного периода (0 – нормальное содержание, 1 – превышение содержания макроэлемента в 2.5 раза).



Рисунок 3.7. Картирование неоднородности содержания Mg в миокарде ЛЖ крыс при различной длительности постморбидного периода (0 – нормальное содержание, 1 – превышение содержания макроэлемента в 2.5 раза).



Рисунок 3.8. Картирование неоднородности содержания Na в миокарде ЛЖ крыс при различной длительности постморбидного периода (0 – нормальное содержание, 1 – превышение содержания макроэлемента в 2.5 раза).

Заключение к главе 3

работе получены экспериментальные данные об изменениях В содержания Ca, K, Mg, Na в тканях миокарда ЛЖ крыс в первые двенадцать часов постморбидного периода с помощью различных методов. Показано отсутствие достоверных различий в содержании Ca, K, Mg, Na в ткани миокарда спустя 30 мин, 1ч, 3 ч, 6 ч и 12 ч после смерти. Картирование макроэлементов позволило обнаружить содержания отсутствие неоднородностей распределения Са, К, Мg, Na в ткани миокарда ЛЖ крысы, содержание макроэлементав которых превышает в 2.5 раза среднее значение содержания макроэлемента в исследуемой карте, что позволило сделать вывод об отсутствии локальных перегрузок кардиомиоцитов кальцием, калием, магнием и натрием. Была обоснована применимость методики ИСП-ОЭС/ЭДС картирования при исследовании различных патофизиологических биологических изменений В тканях человека, ассоциированных С электролитным дисбалансом макроэлементов.

Глава 4. Сравнительный анализ содержания и распределения макроэлементов (Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺) в ткани миокарда по данным аутопсии больных хронической сердечной недостаточностью с низкой и сохранной фракциями выброса левого желудочка сердца

Экспериментальное исследование изменения содержания макроэлементов в ткани миокарда крысы в постморбидный период показало отсутствие изменений в распределении макроэлементов, ассоциированном с аутолитическими изменениями в ткани миокарда левого желудочка в первые 12 часов после смерти. Данный факт позволили предположить, что изменение распределения содержания макроэлементов является одной из возможных биофизических основ падения ФВ у пациентов XCHнФВ.

С целью подтвердить или опровергнуть данное предположение было проведено исследование содержания и распределения макроэлементов (Са, K, Mg, Na) в ткани миокарда ЛЖ человека.

4.1. Материалы и методы исследования

В ходе выполнения исследования был произведен забор аутопсии 27 образцов ткани миокарда ЛЖ человека. Забор аутопсии осуществляли у трех целевых групп пациентов (рис. 4.1). Первую группу (У1) составили пациенты ХСНнФВ, находившиеся в протоколе "трансплантации сердца" и погибшие от терминальной сердечной недостаточности, причина смерти – асистолия (внезапная сердечная смерть). Прижизненно пациенты были обследованы (эхокардиография сердца), установлена диссинхрония миокарда сердца; средние показатели ФВ в данной группе составили 27,43 ± 5,82% (таблица 4.1, n= 7).

Во вторую группу (У2) вошли пациенты ХСНсФВ, погибшие вследствие перенесенного геморрагического инсульта на фоне артериальной

гипертензии; средние показатели ФВ в данной группе составили 61,09±1,22% (таблица 4.2, n = 11).

Третья группа (УЗ) (контрольная группа) представлена данными аутопсии ткани миокарда здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии, погибших в результате дорожно-транспортных происшествий (n = 9).



Рисунок 4.1. Схема эксперимента.

Таблица 4.1.Показатели ФВ у пациентов группы У1.

№ пациента	Показатель ФВ, %
1	28
2	28
3	34
4	19
5	20
6	31
7	32
Среднее значение	27,87
Стандартное отклонение	5,82

№ пациента	Показатель ФВ, %
1	62
2	62
3	59
4	60
5	63
6	61
7	62
8	60
9	61
10	62
11	60
Среднее значение	61,09
Стандартное отклонение	1,22

Таблица 4.2. Показатели ФВ у пациентов группы У2.

Забор аутопсии осуществлялся максимум спустя двенадцать часов после констатации смерти пациента. Изъятая ткань миокарда промывалась изотоническим раствором хлорида натрия с целью удаления крови с исследуемого образца и помещались в 0,2 М фосфатный буфер (pH = 7,3 - 7,4) и хранилась при температуре $3-5^{\circ}$ С. Согласно протоколу методики полученные образцы доставлялись в лабораторию в запечатанных ампулах с 0,2 М фосфатным буфером (pH = 7,3 - 7,4) при температуре $3-5^{\circ}$ С. Образцы взвешивались и делились на три части. Исследование образцов проводилось в течение часа с момента получения аутопсии. Анализ структуры ткани проводился на просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai и Jeol JEM-2100 и на сканирующем просвечивающем микроскопе FEI Nova

NanoSEM. Картирование содержания макроэлементов проводилось методом ИСП-ОЭС/ЭДС. Анализ картирования осуществлялся методами сингулярного разложения матриц и нормированной взаимной корреляции.

4.2. Результаты исследования структуры ткани миокарда ЛЖ

Согласно протоколу методики одна часть аутопсийного материала направлялась на морфологическое исследование методами просвечивающей и сканирующей просвечивающей микроскопий. Необходимость данного исследования обусловлена невозможностью подтвердить целостность кардиомиоцитов в ткани миокарда ЛЖ человека методами сканирующей электронной микроскопии, т.к. данными методами можно получить лишь информацию о топологии поверхности ткани (детектор вторичных электронов) и фазовой составе ткани (детектор обратно рассеянных электронов).

Полученные образцы окрашивались солями тяжелых металлов (уранилацетат двуводный и тетраоксид осмия) с последующей прогонкой в Эпон812. Подготовка тонких срезов, толщиной 100 мкм проводилась на ротационном микротоме LeicaRM-2265. Полученные срезы окрашивались метиленовым синим и изучались на оптическом микроскопе Leica DM LB2 с области, представляющей (область последующим выбором интерес скопления областей кардиомиоцитов). Ультратонкие срезы данных подготавливались на Leica EM UC7.

Исследование структуры ткани показало относительную целостность основных функциональных органелл кардиомиоцитов: ядра, миофибрилл, и митохондрий (рис. 4.2). Большое количество митохондрий с просветленным матриксом и хаотичная структура крист, конденсация хроматина - следствие прижизненной ишемии. У всех исследованных тканей миокарда ЛЖ человека отмечается целостность миофибрилл, представляющих наибольший интерес в рамках данного исследования.



Рисунок 4.2.Электронограмма кардиомиоцита миокарда левого желудочка человека. Обозначения: Я – ядро; М – митохондрии; МФ – миофибриллы.



Рисунок 4.3.Электронограмма кардиомиоцита миокарда левого желудочка человека полученная методом сканирующей просвечевующей электронной микроскопии.

Элекронограммы кардиофмиоцитов методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 4.3) показали, что кардиомиоциты имеют очерченную форму и имеют целостноую структуру.Данные результаты позволил заключить, что при картировании макроэлементного состава ткани миокарда ЛЖ человека сигнал ХРИ генерируется в структуре целостного кардиомиоцита.

4.3. Результаты исследования содержания методом ИСП-ОЭС

Исследование содержания Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ методом ИСП-ОЭС позволило получить данные об интегральном содержании макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека групп У1, У2 и У3 методом калибровочных прямых. Исследование проводилось на масс-спектрометре Shimadzu ICPE-9000 при измерительных условиях, представленных в таблице 4.3.

Параметры плазмы	Значение
Мощность радиоизлучения	1.20 КВт
Расход газа плазмы	10.0 л/мин
Расход вспомогательного газа	0.60 л/мин
Расход газа-носителя	0.70 л/мин
Параметры измерений	Значение
Время экспозиции	30 секунд
Чувствительность	Широкий спектр
Направление измерения	Аксиальное

Таблица 4.3. Измерительные условия измерения макроэлементов.

Полином третьей степени был выбран в качестве уравнения калибровочной кривой.

Измерение концентрации макроэлемента в четырех стандартных образцах позволило построить калибровочные кривые (рис. 4.4-4.7) и определить содержание макроэлементов в биосубстрате. Корректировка

спектрального дрифта применялась с целью уточнить содержание макроэлементов. Паспортная погрешность измерения составляет одна часть на миллиард.



Рисунок 4.4. Определение концентрации Са в ткани миокарда ЛЖ человека.



Рисунок 4.5. Определение концентрации К в ткани миокарда ЛЖ человека.



Рисунок 4.6. Определение концентрации Мд в ткани миокарда ЛЖ человека.



Рисунок 4.7. Определение концентрации Na в ткани миокарда ЛЖ человека.
Ввиду относительно небольшого числа экспериментов в выборках было принято решение использовать точный тест Фишера в качестве теста статистической значимости различий между группами У1, У2 и У3.

Из таблиц 4.4, 4.5 видно, что интегральный показатель содержания макроэлементов находится в пределах стандартного отклонения (0.8 мг/л) измерений и не зависит от сократительной функции миокарда (фракции выброса) при р≤0.05. Статистически значимых различий в содержания макроэлементов между группами У1, У2 и У3 обнаружить не удалось.

Показатель		У1 (n=7	7)	У2 (n=11)		V3 (n=9)		Урол значи Р<(вень мости).05		
	Соде	ержание	е, мг/л	Содержани		е, мг/л	Содержание, мг/л		мг/л	R (1.3)	R(2.3)
	МИН	макс	медиана	МИН	макс	медиана	МИН	максимум	медиана	(-,-)	
Кальций	0.6120	2.0	1.235	0.92	1.70	1.22	1.63	3.12	1.86	0.012049	0.005946
Магний	0.8350	1.4	1.310	1.13	1.58	1.32	1.56	2.70	2.15	0.002694	0.003619
Калий	7.2400	13.2	11.700	8.45	16.20	12.70	10.20	15.70	11.30	1.000000	0.736585
Натрий	7.7000	12.6	10.505	8.72	14.60	11.50	4.71	13.50	8.43	0.244624	0.117898

Таблица 4.4. Сравнительный анализ концентрации макроэлементов в группе У1, У2 с группой контроля.

							Уровень
		У1 (n=7)			У2 (n=11)		значимости
Показатель							P<0.05
	Co	одержание, мг	Л	С	одержание, мг	/л	R (1,2)
	МИН	макс	медиана	МИН	макс	медиана	
Кальций	0.6120	2.0	1.235	0.9200	1.700	1.2200	0.845252
Калий	7.2400	13.2	11.700	8.4500	16.200	12.7000	0.204560
Магний	0.8350	1.4	1.310	1.1300	1.580	1.3200	0.329115
Натрий	7.7000	12.6	10.505	8.7200	14.600	11.5000	0.379776

Таблица 4.5. Сравнительный анализ концентрации макроэлементов в группе У1, У2.

4.4. Результаты картирования неоднородностей содержания макроэлементов методом ИСП-ОЭС/ЭДС

Картирования макроэлементного состава биологических тканей комбинированным методом ИСП-ОЭС/ЭДС обнаружило локальные перегрузки Ca²⁺ в тканях больных с низкой фракцией выброса (рис. 4.2). Так, при картировании кальция в ткани пациентов группы У1 данный подход позволили обнаружить неоднородность, определить её степень по шкале от 0 до 1, ее площадь (таблица 4.6) и локализацию (рис. 4.8).



Рисунок 4.8. Картирование перегрузок Са в ткани миокарда ЛЖ пациента группы У1.

Таблица 4.6. Величина неоднородности распределения макроэлементов и площади неоднородностей у пациентов группы У1.

N⁰	Marman Harris	Степень	Площадь
пациента	макроэлементы	неоднородности, v	неоднородности <i>s, мкм</i> ²
1	2	3	4
1	Кальций	0.65	974.1
	Калий	0.65	972.6
	Магний	0.33	1003.3
	Натрий	0.24	1007.9
2	Кальций	0.71	824.3
	Калий	0.22	821.5
	Магний	0.08	78524.3
	Натрий	0.08	78524.3
3	Кальций	0.21	1258.4
	Калий	0.25	984.3
	Магний	0.08	78524.3
	Натрий	0.10	78524.3
4	Кальций	0.65	1014.8
	Калий	0.65	1043.9
	Магний	0.12	78524.3
	Натрий	0.13	78524.3
5	Кальций	0.71	913.5
	Калий	0.22	1003.1
	Магний	0.13	78524.3
	Натрий	0.04	78524.3
6	Кальций	0.43	1044.0
	Калий	0.33	1048.6
	Магний	0.13	78524.3
	Натрий	0.11	78524.3

Продолжение таблицы 4.6.

1	2	3	4
7	Кальций	0.78	874.5
	Калий	0.29	871.3
	Магний	0.12	78524.3
	Натрий	0.08	78524.3

Для удобства интерпретации и увеличения динамического диапазона карт, было принято решение оценивать степень неоднородности по сто бальной шкале. Так, типичное распределение неоднородностей содержания макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека группы У1 имело области сильных (60-80%) неоднородностей (содержание макроэлемента выше нормы в 2 раза) в случаях Са и К. Неоднородностей содержания Mg и Na экспериментально обнаружить не удалось (n=7) (рис. 4.9-4.12).



Рисунок 4.9. Картирование перегрузок макроэлементов Ca, K, Mg и Na в ткани миокарда пациентов группы У1.



Рисунок 4.10. Картирование перегрузок макроэлементов Ca, K, Mg и Na в ткани миокарда пациентов группы У1.



Рисунок 4.11. Рельеф неоднородности содержания Са у пациентов группы У1. Условие поиска – локальное повышение содержания Са в два раза выше нормы. Величина неоднородности дана в процентах.



Рисунок 4.12. Рельеф неоднородности содержания Са у пациентовгруппы У1. Условие поиска – локальное повышение содержания Са в два раза выше нормы. Величина неоднородности дана в процентах.

У пациентов группы У2 подобные, ярко выраженные области неоднородностей содержания макроэлементов обнаружить не удалось (n=11). Типичное распределение неоднородностей содержания макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ человека пациента группы У2 имело вид плато с незначительными флуктуациями (рис.4.13-4.14). Исследование тканей миокарда левого желудочка методом ИС-ОЭС/ЭДС так же позволил определить степень и область неоднородностей (таблица 4.7). Из таблицы видно, что средняя неоднородность содержания макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ пациентов группы У2 варьируется в диапазоне 4-5% что свидетельствует об отсутствии макроэлементных перегрузок, а содержание макроэлементов можно назвать однородным.



Рисунок 4.13. Картирование перегрузок макроэлементов Са, К, Мg и Na в ткани миокарда пациентов группы У1.



Рисунок 4.14. Рельеф неоднородности содержания Са у пациентов группы У2. Условие поиска – локальное повышение содержания Са в два раза выше нормы. Величина неоднородности дана в процентах.

Таблица 4.7. Величина неоднородности распределения макроэлементов и площади неоднородностей у пациентов группы У2.

N⁰	Marpanautu	Степень	Площадь
пациента	макроэлементы	неоднородности, v	неоднородности <i>s, км</i> ²
1	2	3	4
1	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
2	Кальций	0.05	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
3	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.05	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
4	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.05	59200
5	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
6	Кальций	0.05	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200

Продолжение таблицы 4.7.

1	2	3	4
7	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.05	59200
8	Кальций	0.04	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
9	Кальций	0.05	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.05	59200
	Натрий	0.04	59200
10	Кальций	0.05	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.04	59200
	Натрий	0.04	59200
11	Кальций	0.05	59200
	Калий	0.04	59200
	Магний	0.05	59200
	Натрий	0.04	59200

Аналогичная картина наблюдалась при картировании неоднородностей содержания макроэлементов группы УЗ (рис. 4.15). Методом ИСП-ОЭС/ЭДС обнаружить неравномерность распределения макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ людей группы УЗ (n=9) обнаружить не удалось. Измерение распределение макроэлементов (таблица 4.8) показало, что средняя неоднородность содержания макроэлементов варьируется в диапазоне 4-7%.



Рисунок 4.15. Картирование перегрузок макроэлементов Са в ткани миокарда пациентов группы УЗ.

$\mathbb{N}_{\mathbf{Q}}$	Marpoanementu	Степень	Площадь
пациента	макроэлементы	неоднородности, v	неоднородности <i>s, км</i> ²
1	Кальций	0.04	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.04	266400
	Натрий	0.04	266400
2	Кальций	0.06	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.05	266400
	Натрий	0.04	266400
3	Кальций	0.04	266400
	Калий	0.05	266400
	Магний	0.04	266400
	Натрий	0.07	266400

Таблица 4.8. Величина неоднородности распределения макроэлементов и площади неоднородностей у пациентов группы УЗ.

Продолжение таблицы 4.8.

1	2	3	4
4	Кальций	0.04	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.04	266400
	Натрий	0.05	266400
5	Кальций	0.04	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.06	266400
	Натрий	0.04	266400
6	Кальций	0.05	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.05	266400
	Натрий	0.04	266400
7	Кальций	0.07	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.05	266400
	Натрий	0.05	266400
8	Кальций	0.04	266400
	Калий	0.04	266400
	Магний	0.05	266400
	Натрий	0.04	266400
9	Кальций	0.07	266400

Заключение к главе 4

В данной главе показано, что имеют место значительные различия макроэлементного состава тканей миокарда пациентов при различных фракциях выброса. Интегральный показатель содержания макроэлементов Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ находится в пределах стандартного отклонения измерения и не зависит от сократительной функции миокарда (фракции выброса) (р≤0.05). В группе с низкой ФВ показана неоднородность распределения макроэлементов. Наличие областей высокого содержания Ca²⁺ и K⁺ свидетельствует о неравномерности распределения макроэлементов в ткани миокарда ЛЖ вследствие локальной кальциевой перегрузки, свидетельствуют о нарушениях в работе ионных насосов у пациентов с низкой ФВ и, как следствие, локальном нарушении электромеханического сопряжения в миокарде, что является причиной развития сократительной дисфункции миокарда ЛЖ. Известно, что снижение активности Na⁺-K⁺ насоса и увеличение концентрации внутриклеточного Na⁺ приводит к повышению Na⁺-Ca²⁺ обменного тока и, как следствие, к наблюдаемой в эксперименте кальциевой перегрузке кардиомиоцитов.

Глава 5. Влияние локальной кальциевой перегрузки и как следствие снижение инотропной способности миокарда на патогенетический механизм развития ХСН у пациентов с СНнФВ

Обнаружение областей кальциевых и калиевых перегрузок у пациентов группы У1 поставило ряд вопросов не только о влиянии данного эффекта на сократительную способность миокарда ЛЖ человека, HO и о его биофизических основах. Процесс, посредством которого кардиомицит миокарда левого желудочка преобразует электрические сигналы потенциала действия в механическую силу, известен как явление электромеханического сопряжения. Его подробное рассмотрение выходит за рамки данной работы, ионов Ca²⁺ однако стоит отметить решающую роль В процессах электромеханического сопряжения.

В кардиомиоцитах Ca²⁺ принимает центральное участие во многих процессах, включая возбудимость, сокращение и регуляцию экспрессии генов. Такое разнообразие функциональных ролей постулирует сигналы Ca²⁺ микродоменов, в которых существование выделенных Ca^{2+} концентрации цитозольного И генерируются независимо ОТ распознаются макромолекулярными сигнальными компонентами, Помимо функционального локализованными В ЭТИХ микродоменах. Ca^{2+} микродомены компонента, часто физически ограничены структурами специализированными мембранными И субклеточными компартментами. Специализированные структуры включают диадические соединения между поперечными мембранными инвагинациями (Т-трубочки) и SR, сарколеммальные домены вне диад, такие как липидные рафты и кавеолы, и внутриклеточные структуры, такие как привязные соединения между SR и митохондриями.

Одной из причин кальциевой перегрузки кардиомиоцитов является снижение активности Na⁺-K⁺ насоса. Ингибирование Na⁺-K⁺ насоса может возникать как следствие патологического ремоделирования кардиомиоцита

при длительной ишемии. Применяемые при лечении хронической сердечной недостаточности медикаментозные терапии, (использовании сердечных гликозидов) так же могут являться причиной замедления Na⁺-K⁺ATФазы, приводящей к увеличению концентрации внутриклеточного Na⁺, что через увеличение Na⁺-Ca⁺- обменного тока приводит к накоплению Ca²⁺ в цитозоле и сети саркоплазматического ретикулума.

5.1. Анализ влияния степени неоднородности и площади неоднородности содержания Ca²⁺ на фракцию выброса миокарда ЛЖ пациентов группы У1

С целью охарактеризовать влияние неоднородности распределения макроэлементов и площади неоднородности содержания макроэлементов на фракцию выброса левого желудочка сердца человека были построены графики зависимостей фракции выброса от степени неоднородности - ФВ (v) и фракции выброса от площади неоднородности – ФВ(S) методом математической регрессии (рис. 5.1, 5.2). В качестве функции аппроксимации был выбран кубический эрмитов сплайн, обладающий следующими свойствами:

1. Функция аппроксимации записывается в общем виде как:

$$g(x) = f_0 \alpha_0(x) + f_1 \alpha_1(x) + f_0^{(1)} \beta_0(x) + f_1^{(1)} \beta_1(x)$$

2. Каждая из базовых функций – полином третьей степени:

$$\alpha_0(x) \equiv 2x^3 - 3x^2 + 1$$
$$\alpha_1(x) \equiv -2x^3 + 3x^2$$
$$\beta_0(x) \equiv x^3 - 2x^2 + x$$
$$\beta_1(x) \equiv x^3 - x^2$$

Коэффициент детерминации данной аппроксимации R^2 составил 0.98, что свидетельствует о высоких значения коэффициентов корреляции, однако говорить о функциональной зависимости, ввиду ограниченного количества данных, не представляется возможным.



Рисунок 5.1. Влияние неоднородности распределения Ca²⁺ на ФВ.



Рисунок 5.2. Влияние площади неоднородности содержания макроэлементов на ФВ.

Из графика $\Phi B(v)$ видно, что средняя неоднородность в диапазоне значений 0,2 - 0,5 практически не влияет на ΦB , однако, при достижении критического значения 0,55 последующее увеличение неоднородности содержания макроэлементов приводит к резкому снижению ΦB и как следствие инотропной способности миокарда. Другими словами, появлением в ткани миокарда ЛЖ человека областей в которых концентрация Ca²⁺превышает норму в два и более раза, свидетельствует о начале патологических процессов, влияющих на нормальное функционирование ионных насосов и ионного обмена.

Полученные в нашем исследовании результаты, касающиеся площади локализации неоднородностей распределения Ca²⁺,позволили предположить о влиянии данного параметра на патогенетический механизм, играющий роль в возникновении диссинхронии и пусковых механизмах волн re-entry в манифестации фатальных желудочковых тахиаритмий.

Установлено, что чем сильнее локальная перегрузка Ca²⁺ в малых зонах локализованной области, тем ниже фракция выброса левого желудочка сердца (рис. 5.1) у пациентов хронической сердечной недостаточности. Доказано, что площадь локализации неоднородности само по себе не несет критически важную информацию, т.к. в рамках данного исследования большие площади неоднородности наблюдались у пациентов групп У2 и У3, однако перегрузок определенным макроэлементом в данных группах (У2 и У3) не наблюдалось. Это доказывает, что механизм локальной перегрузки Ca²⁺ присутствует только у больных низкой фракции выброса ЛЖ (r=-0.81 $p \le 0.05$).

В общем случае свидетельствует ЭТО 0 сильном влиянии локализованных (S \approx 160 мкм²) выраженных (v \geq 0.55) неоднородностей содержания Ca²⁺, которые к локальной сократительной приводят дисфункции ткани миокарда и прогрессированию ХСН вследствие в поврежденных кардиомиоцитах и как следствие накопления Ca²⁺

замедлению процесса расслабления сердца, что неизбежно сопровождается уменьшением диастолического объема сердца и снижением сердечного выброса И, В последующем ухудшая течение и прогноз больных XCH. Полученные терминальной результаты интересны с патофизиологической точки зрения и в свою очередь биофизические основы данного явления до конца не ясны. Это требует продолжение исследований в данном научном направлении, однако было высказано несколько гипотез о природе данного явления.

5.2. Биофизические основы локальной кальциевой перегрузки в ткани миокарда ЛЖ пациентов группы У1

С целью определить биофизические механизмы обнаруженных у пациентов группы У1 областей локальных кальциевых перегрузок были рассмотрены основные биофизические механизмы возникновения кальциевых перегрузок.

Локальная кальциевая перегрузка саркоплазмотического ретикулума причиной желудочковых нарушений ритма, может быть таких как желудочковая экстрасистолия, желудочковая фибрилляция и желудочковая тахикардия. Среди причин можно выделить гиперкальциемии различного генеза, приводящей к спонтанному высвобождению кальция в цитозоль с последующим появлением постдеполяризаций. Данный эффект подробно изучается методами математического моделирования. Однако, у всех пациентов группы У1 уровень сывороточного свободного (ионизированного) кальция был понижен или находился на нижней границе нормы (таблица 5.1), ассоциированные с гиперкальциемией что исключает патофизиологические процессы причины обнаруженных В качестве локальных кальциевых перегрузок, т.е. исключается механизм ингибирования Na⁺-K⁺ насоса, приводящего к накоплению внутриклеточного натрия. Это косвенно подтверждается отсутствием областей повышенного

содержания Na⁺ в результате картирования макроэлементного состава тканей миокарда ЛЖ пациентов группы У1.

№ пациента	Уровень ионов Ca ²⁺ , ммоль/л
1	1,007
2	1,081
3	0,998
4	0,697
5	0,874
6	0,873
7	0,984

Таблица 5.1 Уровень ионов Ca²⁺ у пациентов группы У1

Среди других процессов, приводящих к увлечению концентрации Ca^{2+} , был рассмотрен процесс кальций индуцированного высвобождения кальция, который по причинам повреждения саркоплазматического ретикулума и/или повреждений митохондрий вследствие продолжительной ишемии не смог завершиться высвобождением ионов Ca^{2+} с последующей деполяризацией.

Эффективной частью адаптации к преднагрузке и постнагрузке является механочувствительность RyR. За счет повышения эффективности локального высвобождения Ca²⁺, она также вызывает спонтанные всплески Ca²⁺ во время диастолы. В нормальном сердце данное повышение Ca²⁺ вызванное растяжением, локально ограничено. При определенных условиях, когда одновременно возникает больше всплесков Ca²⁺ с образованием к нагрузкесистемаCa²⁺может превратиться волн Ca^{2+} . адаптивная в механизм. Индуцированное аритмогенный растяжением увеличение активных форм кислорода, всплесков содержания Ca^{2+,} а также скорости распространяющихся волн Ca²⁺ градуируется, то есть повышается с увеличением степени растяжения. У всех пациентов группы У1 наблюдалась дилатационная кардиомиопатия. Данный факт, в свою очередь, не объясняет

высокую степень локализованности, обнаруженных областей кальциевых перегрузок, которые занимали от 15% до 30% поля зрения при картировании макроэлементного состава ткани миокарда ЛЖ пациентов группы У1. Также, остаются не до конца понятными причины появления областей повышенного содержания K^+ , которые на 90,3 \pm 7,2% были локализированы с областями перегрузок с хронической кальциевых y пациентов сердечной недостаточность с низкой фракцией выброса. На данный момент наиболее правдоподобным объяснением данного явления является предположение, что локальная кальциевая перегрузка кардиомиоцитов в ткани миокарда ЛЖ пациентов группы У1, индуцированная растяжением волокон вследствие, например, дилатационной кардиомиопатии с сопутствующим повреждением саркоплазматического ретикулума, привела к абсолютной рефрактерности ткани, т.е. не способности генерировать повторный потенциал действия (ПД), каким бы сильным ни был инициирующий стимул. Данные области обладают пониженной сократительной способностью, что влияет на распространения сигнала потенциала действия и на процесс расслабления (диастолы) и, В конечном счете, приводит к сердца уменьшению диастолического объема левого желудочка сердца у пациентов группы У1 и снижению фракции выброса.

Подтверждение или опровержение гипотез о возможных механизмах, приводящих к локальным кальциевым перегрузкам в ткани миокарда ЛЖ пациентов группы У1 требуют дополнительных целенаправленных исследований, которые выходят за рамки данного диссертационного исследования.

Заключение к главе 5

Показано влияние локальной перегрузки Ca²⁺ на прогрессирование XCH. Наличие областей повышенного содержания Ca²⁺ группы У1 свидетельствуют о локальной кальциевой перегрузке кардиомиоцитов, что приводит к локальной сократительной дисфункции ткани миокарда и

прогрессированию ХСН вследствие накопления Ca²⁺ в поврежденных кардиомицитах и как следствие замедлению процесса расслабления сердца, что неизбежно сопровождается уменьшением диастолического объема сердца и снижением сердечного выброса.

Основные результаты и выводы диссертационной работы

1. Разработана качественного количественного методика И картирования биологических тканей макроэлементного состава комбинированным энергодисперсионной методом рентгеновской спектроскопии И оптической атомно-эмиссионной спектрометрии параллельного действия с индуктивно-связанной плазмой.

2. Доказано отсутствие неоднородностей содержания макроэлементов в ткани миокарда в первые 12 часов после смерти (Модельный организм – крыса линии Вистар).

3. Доказаны значительные отличия в неоднородности и локализации неоднородности распределения макроэлементов в ткани миокарда левого желудочка у пациентов больных хронической сердечной недостаточностью с низкой фракцией выброса, являющиеся биофизической основой падении фракции выброса левого желудочка сердца человека.

4. Показано влияние локальной перегрузки Ca²⁺ на прогрессирование XCH. Наличие областей повышенного содержания Ca²⁺ группы У1 свидетельствуют о локальной кальциевой перегрузке кардиомиоцитов, что приводит к локальной сократительной дисфункции ткани миокарда и прогрессированию XCH вследствие накопления Ca²⁺ в поврежденных кардиомицитах и как следствие замедлению процесса расслабления сердца, что неизбежно сопровождается уменьшением диастолического объема сердца и снижением сердечного выброса.

Список опубликованных работ

Публикации автора по теме диссертации в журналах, индексируемых в базах данных WebofScience, Scopus, RSCI:

1. Osipova, O.A., **Komisov A.A.**,Zhernakova, N.I., Askari, I.V.Dyssynchrony of the heart as a pathogenetic mechanism of the chronic cardiac insufficiency progression on the backgroound of ischemic heart disease or physiological aging of the heart// Journal of international pharmaceutical research, 2018, v. 45 *Scopus* (Импакт-фактор0,13).

2. Комисов А.А., Осипова О.А., Головин А.И., Белов В.Н., и др.Анализ картирования макроэлементного состава ткани миокарда у больных систолической хронической сердечной недостаточности//Системный анализ и управление в биомедицинских системах, 2018, Т. 17. № 3. С. 576-583. *RSCI* (Импакт-фактор0,551).

3. Olga A. Osipova, **Alexandr A. Komisov**, Tatiana P.Golivets, Kseniya G. Plaksina// Changes of myocardial tissue macroelement composition at chronic heart failure with a reduced fraction of the left ventricular ejection, Journal of pharmacy research, 2017, v.11, 1476-1480. *Scopus*(Импакт-фактор0,13).

4. ОсиповаО.А., **КомисовА.А.**, ШепельР.Н., ОсиповП.Г., ПлаксинаК.Г., МалайН.В. Распределение элементного состава в биологических образцах почки у больных гипертонической болезнью. //Российский кардиологический журнал, 2017, т.22, №12. с.31-35. *Scopus, RSCI* (Импакт-фактор 1,074).

5. Комисов А.А., Осипова О.А., Шепель Р.Н., Драпкина О.М., Осипов Π.Γ., Плаксина К.Г., Малай Н.В.Разработка методики количественного картирования макроэлементарного состава ткани сердца с применением подходов нанотехнологий, а именно сканирующего трансмиссионного микроскопа//Российский кардиологический журнал, 2016, т. 21, №12, с. 18-22. *Scopus, RSCI* (Импакт-фактор 1,074).

6. Осипова О.А., Плаксина К.Г., **Комисов А.А.**, Годлевская О.А. Патогенетические механизмы участия межклеточного матрикса миокарда в

ремоделировании сердца у больных хронической сердечной недостаточностью//Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация, 2015, №22(219), с.18-25. *RSCI* (Импакт-фактор 0,162).

7. Осипова О.А., **Комисов А.А.**, Басараб Д.А., Аскари И.В., Клеткина А.С., Шеховцова Л.В., Нагибина А.И., Паулаускас А.В., Суязова С.Б.Картирование элементного состава ткани миокарда при хроническом констриктивном перикардите//Международный журнал экспериментального образования, 2015, №6, с.124. *RSCI* (Импакт-фактор 0,178).

8. Шеховцова Л.В., Осипова О.А., Комисов А.А., Басараб Д.А., Аскари И.В., Клеткина А.С., Нагибина А.И., Паулаускас А.В., Суязова С.Б. Структурно-функциональные и гемодинамические механизмы хронической сердечной недостаточности у больных ОКС после стентирования// Международный журнал экспериментального образования, 2015, №7, с.154-155. *RSCI* (Импакт-фактор 0,178).

9. Комисов А.А., Осипова О.А., Шепель Р.Н.Нанотехнологии в анализе картирования макроэлементного состава ткани миокарда// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2015,№12-10, с.1911. *RSCI* (Импакт-фактор 0,349).

10. Павлова Т.В., Белянский К.Д., Першин Е.В., Бессмертный Д.В., Маслов П.В., Павлов И.А., Прощаев К.И., Комисов А.А.Иммуногистохимические и электронномикроскопические особенности опухолевого роста предстательной железы в полиморбидном континууме человека // Фундаментальные исследования, 2012, №10-1, с. 82-86. *RSCI* (Импакт-фактор 0,512).

11. Павлова Т.В., **Комисов А.А.**, Бессмертный Д.В., Павлов И.А., Дифференциальные критерии при клинико-морфологических параллелях прогноза рака предстательной железы// Фундаментальные исследования, 2012, №5 (часть 1), с. 96-99 *RSCI* (Импакт-фактор 0,512).

Список литературы

 Сидорина А. В. Оптимизация методики определения элементного состава биологических объектов методом РФА-СИ: Дис. Канд. Хим. Наук. Новосибирск — 2015.

Волков Д. С., Проскурнин М. А. Высокочувствительное определение алюминия в воде для инъекций при помощи ИСП-ОЭС // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2013. — Т. 4, № 5

3. Смирнова Е.В., Зарубина О.В. Определение макро- и микроэлементов в биологических стандартных образцах растительного и животного происхождения методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой // Стандартные образцы — 2014 — №3.

 Лисецкая, Л.Г. Методологические вопросы анализа микроэлементов в биосредах // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. –2005. – № 1. – С. 168-173.

5. Ильин Александр Петрович, Мостовщиков Андрей Владимирович, Тимченко Николай Алексеевич Возможности синхротронного излучения для исследования фазообразования продуктов сгорания in situ // Вестник науки Сибири. — 2013. — №4 (10).

 Сидорина А.В., Трунова В.А. Учет погрешностей измерения спектров при анализе элементного состава биологических объектов методом РФА-СИ // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 1. – № 17. – С. 4-9.

7. Trunova V.A., Zvereva V.V., Okuneva G.N., Levicheva E.N. The alteration of interelemental ratios in myocardium under the congenital heart disease (SRXRF) //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. -2007. - V. 575. - N 1. - P. 202-205.

8. Lichtman, J.W., Conchello J.-A. (2005) Fluorescence microscopy, Nat. Methods, 2, —C. 910–919.

9. Huang, B., Bates, M., Zhuang, X. (2009) Super-resolution fluorescence microscopy, Annu. Rev. Biochem., 78 — C.993–1016.

10. Hess, S.T., Girirajan, T.P, Mason M.D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy, Biophys. J., 2006 — 91 — C. 4258–4272.

11. Noble D. Modelling of sodium-overload arrhythmias and their suppression. / Noble D., Varghese a // The Canadian journal of cardiology – 1998. – T. $14 - N_{2} 1 - C.97-100$.

12. Sulman T. Mathematical modeling of mechanically modulated rhythm disturbances in homogeneous and heterogeneous myocardium with attenuated activity of Na +-K+ pump / Sulman T., Katsnelson L.B., Solovyova O., Markhasin V.S. // Bulletin of Mathematical Biology – 2008. – T. $70 - N_2 3 - C.910-949$.

13. Bers D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force / D. M. Bers – London: Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Publishers— 2001. — Вып. Second edi–C. 427

14. Kohl P. Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias / P. Kohl, F. Sachs, M. R. Franz – Oxford University Press, — 2011.

15. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П., Джой Д., Фи ори Ч., Лифшин э. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский анализ. Перевод с английского языка// Москва, Мир— 1984 — Книга 1— С. 98-189.

16. Криштал М. М., Ясников И. С., Полунин В. И. И др. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ в примерах практического применения.//Техносфера — 2009— С.208

17. Нагорнов Ю.С., Ясников И.С., Тюрьков М.Н. Способы исследования поверхности методами атомносиловой и электронной микроскопии: учебное пособие. – Тольятти: ТГУ –2012 – С. 58

18. J.Moseley, Philos. Mag. -6- 27:703- 1914

Уманский Я.С., Скаков Ю.А., Иванов А.Н., Расторгуев Л.Н.
Кристаллография, рентгенография и электронная микроскопия. – М.:
Металлургия– 1982. – С.632 с.

20. Быков, Ю. А. Растровая электронная микроскопия и рентгеноспектральный анализ. Аппаратура, принцип работы, применение / Ю. А. Быков, С. Д. Карпухин, М. К. Бойченко и др //. Электр. Дан. –М.: МГТУ им. Н. Э. Баумана–2003

21. Georg Frosch microanalysis with eds, WDS & EBSD Possibilities and Restrictions Oxford Instruments Analytical – 2003.

22. Volk T. A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture / Volk T., Fessler L.I., Fessler J.H. // Cell – 1990. – T. $63 - N_{2} 3 - C.525-536$.

23. Pyle W.G. At the Crossroads of Myocardial Signaling: The Role of Z-Discs in Intracellular Signaling and Cardiac Function / Pyle W.G., Solaro R.J. // Circulation Research – 2004. – T. $94 - N_{2} 3 - C.296$ –305.

24. Huxley A. Muscle structure and theories of contraction / Huxley A. // Prog Biophys Biophys Chem. – 1957. – T. 7 – C.257–318.

25. Ebashi S. Calcium and muscle contraction / Ebashi S., Endo M. // Progress in Biophysics and Molecular Biology – 1968. – T. 18 – C.123–183.

26. Sweadner K.J. Structural similarities of Na,K-atpase and SERCA, the Ca(2+)-atpase of the sarcoplasmic reticulum. / Sweadner K.J., Donnet C. // The Biochemical journal – 2001. - T. 356 - C.685 - 704.

27. Окунева Г.Н., Чернявский А.М., Левичева Е.Н., Логинова И.Ю., Волков А.М., Кливер Е.Э., Трунова В.А., Зверева В.В. Распределение химических элементов в разных отделах сердца больных ИБС с острой сердечной недостаточностью // Кардиология. –2008. –Т. 48 –№ 2 –С. 41-46.

28. Горбатых Ю.Н., Окунева Г.Н., Кливер Е.Э., Левичева Е.Н., Логинова И.Ю., Трунова В.А., Зверева В.В., Распределение химических элементов по разным отделам миокарда у детей грудного возраста с интактным сердцем и при транспозиции магистральных сосудов // Педиатрия. –2008. – № 2– С. 10-14.

29. Kirz, J.; Jacobsen, C.; Howells, M. Q. Rev. Biophys. -1995 - T. 28-C.33-130.

30. Кравчун Н. А. Содержание в сыворотке крови ингибитора активатора плазминогена-1 у больных сахарным диабетом 2 типа // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия Медицина–2006. – №13(738) –С. 39–42

31. Гунин А.Г. Гистология в схемах и таблицах. – М.: «Практ. Медицина», –2011. – С. 224

32. Cleland JG1, Swedberg K, Cohen-Solal A. The Euro Heart Failure Survey of the EUROHEART survey programme. A survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. The Study Group on Diagnosis of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology. The Medicines Evaluation Group Centre for Health Economics University of York. Eur J Heart Fail. – 2000 Jun; –T.2(2) –C.123-132.

33. Hanna IR1, Heeke B, Bush H, Brosius L, King-Hageman D, Beshai JF, Langberg JJ. The relationship between stature and the prevalence of atrial fibrillation in patients with left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol. – 2006 Apr 18 – T.47(8) – C.1683-1688.

34. Fonarow GC1, Stough WG, Abraham WT, Albert NM. Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. J Am Coll Cardiol. –2007 Aug 21–T.50(8) –C.768-77

35. Агеев Ф.Т., Жубрина Е.С., Гиляревский С.Р. Сравнительная эффективность и безопасность длительного применения торасемида и фуросемида у больных с компенсированной сердечной недостаточностью. Влияние на маркеры фиброза миокарда. Журнал Сердечная Недостаточность. –2013–14(2) – С.55–62.

36. Mann DL Heart Failure. A Companion to Braunwald's Heart Disease.
Eng. : Saunders / Elsevier. – 2010. – C. 928

37. Кравчун Н.А. Содержание в сыворотке крови ингибитора активатора плазминогена-1 у больных сахарным диабетом 2 типа. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. – 2006. – Т.13(738) – С. 39–42.

38. A.M. G. Skeletal and cardiac muscl contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls" / A.M. G., M. R., E. H. // News Physiol Sci – 2001. – N_{2} 16 – C.49–55.

39. Осипова О.А., Нагибина А.И., Комисов А.А., Петрова Г.Д., Шеховцова Л.В., Власенко М.А., Власенко О.А. Патоморфологические механизмы регуляции образования миокардиального фиброза у больных хронической сердечной недостаточностью на фоне ишемической болезни сердца. Журнал сердечная недостаточность. 2016. – Т. 17–. № 5 (98). – С. 357-364.

40. Гунин А.Г. Гистология в схемах и таблицах. – М.: «Практ. Медицина» – 2011. – С. 224

41. Агеев Ф.Т., Жубрина Е.С., Гиляревский С.Р. Сравнительная эффективность и безопасность длительного применения торасемида и фуросемида у больных с компенсированной сердечной недостаточностью. Влияние на маркеры фиброза миокарда. Журнал Сердечная Недостаточность. 2013–Т. 14(2) – С. 55–62.

42. Осипова О.А., Плаксина К.Г., Покровский М.В. Клеточные и молекулярные механизмы участия внеклеточного матрикса миокарда у больных хронической сердечной недостаточностью с сохранной систолической функцией сердца на фоне ишемической болезни сердца Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5– С. 37.

43. Осипова О.А., Плаксина К.Г., Комисов А.А., Годлевская О.А. Патогенетические механизмы участия межклеточного матрикса миокарда в ремоделировании сердца у больных хронической сердечной недостаточностью Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. –2015. Т. № 22 (219). – С. 18-25.

44. Askari I.V., Osipova O.A. Influence of beta-blockers on mechanical dyssynchrony and cardiac remodeling in patients with ischemic chronic heart failure in the setting of revascularization Research results in pharmacology. -2019- T. $5. - N_{2} 1. -$ C. 1-13.

45. Комисов А.А., Осипова О.А., Головин А.И. Анализ картирования макроэлементного состава ткани миокарда у больных систолической хронической сердечной недостаточности. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. –2018. – Т. 17. – № 3. – С. 576-583.

46. Morotti S. Quantitative systems models illuminate arrhythmia mechanisms in heart failure: Role of the Na₊ -Ca₂₊ -Ca₂₊ /calmodulin-dependent protein kinase II-reactive oxygen species feedback.// Rev systbiol Med. – 2019 Mar –T.11(2)

47. Paulus W, Tschope C. A Novel Paradigm for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling Through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation. J Am Coll Cardiol. – 2013; –T.62–C.263–271.

48. Mohammed S.F., Borlaug BA, Roger vrl, Mirzoyev SA, Rodeheffer RJ, Chirinos JA, et al. Comorbidity and Ventricular and Vascular Structure and Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction / Clinical Perspective. Circ Heart Fail. – 2012; –T.5–C.710–719.7

49. Liu S, Guan Z, Jin X, Meng P, Wang Y. Left ventricular diastolic and systolic dyssynchrony and dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction and a narrow QRS complex. Int J Med Sci. 2018 Jan 1;15(2):108-114.

50. Saxon LA, Bristow MR, Boehmer J, Krueger S, Predictors of sudden cardiac death and appropriate shock in the Comparison of Medical Therapy, Pacing, and Defibrillation in Heart Failure (COMPANION) Trial. Circulation. 2006 Dec 19– T.114(25) –C.2766-72.

51. Santangeli P, Rame J.E, Birati E.Y, Marchlinski F.E Management of Ventricular Arrhythmias in Patients With Advanced Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 2017 Apr 11– T.69(14) –C.1842-1860.

52. Garan AR, Yuzefpolskaya M, Colombo PC, Morrow JP Ventricular arrhythmias and implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients with continuous-flow left ventricular assist devices: need for primary prevention? J Am Coll Cardiol. – 2013 Jun 25; –T. 61(25) –C.2542-50.

53. Baudino TA, Carver W, Giles W et al. Cardiac fibroblasts:friend or foe? American j. Ofphysiology—heart and circulatory physiology. – 2006; –T. 291(3) – C.1015–1026.

54. Bowerssl, Banerjee I,Baudino TA The extracellular matrix: at the center of it al. Journal of molecular andcellularcardiology–.2010–T.48 –C.474–482.

55. Poole-Wilson, P., Colucci, W., Massie, B., Chatterjee, K., Coats, A., Eds. Cardiac interstitium. In Heart Failure; Churchill Livingstone: New York, NY, USA, -1997– C.13–31.

56. Feng J, Armillei M.K, Yu A.S. Ca²⁺ Signaling in Cardiac Fibroblasts and Fibrosis-Associated Heart Diseases. Cardiovasc Dev Dis. – 2019 Sep 23– T.6(4)

57. Nguyen, M.N.; Kiriazis, H.; Gao, X.M.; Du, X.J. Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis. Compr. Physiol. – 2017–T.7–C. 1009–1049.

58. Yue, L.; Xie, J.; Nattel, S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. Cardiovasc Res. –T.89 – C.744–753.

59. Yue, Z.; Zhang, Y.; Xie, J.; Jiang, J.; Yue, L. Transient receptor potential (TRP) channels and cardiac fibrosis. Curr. Top. Med. Chem. – 2013 – T. – 13–C. 270–282.

60. Du, J.; Xie, J.; Zhang, Z.; Tsujikawa, H.; Fusco, D.; Silverman, D.; Liang, B.; Yue, L. TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. Circ. Res. – 2010–T,106–,C.992–1003.

61. Lin, B.L.; Matera, D.; Doerner, J.F.; Zheng, N.; Del Camino, D.; Mishra, S.; Bian, H.; Zeveleva, S.; Zhen, X.; Blair, N.T.; et al. In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA –2019 –T. 116 –C.10156–10161.

62. Adapala, R.K.; Thoppil, R.J.; Luther, D.J.; Paruchuri, S.; Meszaros, J.G.; Chilian, W.M.; Thodeti, C.K. TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast

differentiation by integrating mechanical and soluble signals. J. Mol. Cell. Cardiol. –2013–T.54–C. 45–52.

63. Landstrom A.P., Dobrev D., Wehrens X.H.T. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. Circ. Res. –2017 –T.120–C.1969–1993.

64. Terkeurs H.E., Boyden P.A. Calcium and arrhythmogenesis. Physiol. Rev. -2007-T.87-C.457-506..

65. Eisner D.A., Caldwell J.L., Kistamas K., Trafford A.W. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. Circ. Res. – 2017–T.121–C.181–195.

66. Johnson DM, Arrhythmogenic Mechanisms in Heart Failure: Linking β-Adrenergic Stimulation, Stretch, and Calcium. Front Physiol. –2018 Oct 16– T9

67. Nair R.S., Banerji A., Somasundaram V., Srinivas P. Structure activity relationship of plumbagin in BRCA1 related cancer cells. Mol. Carcinog. – 2013–T52(392) –C.403.

68. Eisner D.A., Caldwell J.L., Kistamas K., Trafford A.W. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. Circ. Res. –2017–T.121–C.181–195.

69. Priori S.G, Mantica M, Napolitano C, Schwartz P.J. Early after depolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias. Circulation. –1990 Jun– T.81(6) –C.1911-20

70. Volders PG, Kulcśar A, Vos MA, Sipido KR, Wellens HJ, Lazzara R, Szabo B. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. Cardiovasc Res. –1997 May–T.34(2) –C.348-59.

71. Xie Y, Sato D, Garfinkel A, Qu Z, Weiss J.N. So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue. Biophys J. -2010 Sep 8 - T.99(5) - C.1408-1415.

72. Bers D.M., Lang D., Sato D., Jiang Y., Ginsburg K.S., Ripplinger C.M. Calcium-Dependent Arrhythmogenic Foci Created by Weakly Coupled Myocytes in the Failing Heart., circ Res. – 2017 Dec 8–T. 121(12) –C.1379-1391.

73. Sanchez-Alonso J.L., Bhargava A., O'Hara T. Microdomain-Specific Modulation of L-Type Calcium Channels Leads to Triggered Ventricular Arrhythmia in Heart Failure. Circ Res. –2016 Sep 30–T.119(8) –C.944-55.

74. Carnicer R., Suffredini S., Liu X., Reilly S., Simon J.N. The Subcellular Localisation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Determines the Downstream Effects of NO on Myocardial Function. Cardiovasc Res. –2017 Mar–T.113(3) –C.321–331.

75. Miura M., Taguchi Y., Nagano T., Sasaki M., Handoh T., Shindoh C. Effect of myofilament $Ca(^{2+})$ sensitivity on $Ca(^{2+})$ wave propagation in rat ventricular muscle. J Mol Cell Cardiol. –2015 Jul–T.84–C. 162-169.

76. Hansen D.E., Craig C.S. Stretch-induced arrhythmias in the isolated canine ventricle. Evidence for the importance of mechanoelectrical feedback.. Circulation. – 1990 Mar–T.81(3) –C.1094-1105.

77. Prosser B.L., Ward C.W., Lederer W.J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. Science. –2011 Sep 9– T.333(6048) – C.1440-1445.

78. Song Y.H., Cho H., Ryu S.Y., Yoon J.Y. L-type Ca(2+) channel facilitation mediated by H(2)O(2)-induced activation of camkii in rat ventricular myocytes. J mol cell cardiol. – 2010 Apr– T.48(4) –C.773-778

79. Marieb, E. N., Hoehn, K., & Hoehn, F. (2007). Human Anatomy & Physiology. –7изд–., C. 284–87

80. Dhillon P.S. Relationship between gap-junctional conductance and conduction velocity in mammalian myocardium / Dhillon P.S., Gray R., Kojodjojo P., Jabr R., Chowdhury R., Fry C.H., Peters N.S. // Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology – 2013. – T. $6 - N_{\odot} 6 - C.1208-1214.4$

81. Cannell M.B. Model of calcium movements during activation in the sarcomere of frog skeletal muscle / Cannell M.B., Allen D.G. // Biophysical Journal – 1984. – T. $45 - N_{2} 5 - C.913-925$.

82. Peyronnet R. Cardiac Mechano-Gated Ion Channels and Arrhythmias / Peyronnet R., Nerbonne J.M., Kohl P. // Circulation Research – 2016. – T. 118 – $N_{2} 2 - C.311-329$.

83. Trunova V., Sidorina A., Zvereva V., Churin B. Changes in the elemental content of rat heart as a result of the fixation in formalin analyzed by synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis //Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. -2013. -V. 27. -N 1. -P. 76-77.

84. Зверева В.В. Разработка методических подходов для элементного анализа тканей сердца и сосудов человека методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения: дис. к.х.н.: 02.00.02. Место защиты: Новосибирск, ИНХ СО РАН– 2009– С.131

85. Kanaya, K. & Okayama, Shigeo. . Penetration and Energy-Loss Theory of Electrons in Solid Targets. Journal of Physics D-Applied Physics. – 1972– T.5. –C. 43

86. Kirz, J.; Jacobsen, C.; Howells, M. Q. Rev. Biophys. – 1995–T. 28– C.33–130.

87. Trunova V., Sidorina A., Zvereva V., Churin B. Changes in the elemental content of rat heart as a result of the fixation in formalin analyzed by synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis //Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. -2013. -V. 27. -N 1. -C. 76-77.

88. Сидорина А.В., Трунова В.А. Учет погрешностей измерения спектров при анализе элементного состава биологических объектов методом РФА-СИ // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 1. – № 17. – С. 4-9.

89. Гуничева Т.Н., Васильева И.Е. Изучение распределения элементов в материале стандартного образца состава мышечной ткани Байкальского окуня БОК-2 методом рентгенофлуоресцентного анализа //Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16. – № 3. – С. 318-324

90. Bush V. J., Moyer T.P., Batts K.P., Parisi J.E. Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues //Clinical chemistry. – 1995. – V. 41. – N 2. – C. 284-294.

91. Boskey A. L., Cohen M. L., Bullough P. G. Hard tissue biochemistry: a comparison of fresh-frozen and formalin-fixed tissue samples //Calcified tissue international. – 1982. – V. 34. – N 1. – C. 328-331.

92. Ménesguen Y., Lépy M.C. Mass attenuation coefficients in the range, K fluorescence yield and K β /K α relative X-ray emission rate for Ti, V, Fe, Co, Ni, Cu and Zn measured with a tunable monochromatic X-ray source //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 2010. – V. 268. – N 16. – C. 2477- 2486.

93. Szaloki I., Somogyi A., Braun M., Toth A. Investigation of geochemical composition of lake sediments using ED-XRF and ICP-AES techniques //X-Ray Spectrometry. – 1999. – V. 28. – N 5. – C. 399-405

94. Chantler C.T., Tran C.Q., Barnea Z., Paterson D., Cookson D.J., Balaic D.X. Measurement of the x-ray mass attenuation coefficient of copper using 8.85–20 keV synchrotron radiation //Physical Review A. – 2001. – V. 64. – N 6. – C. 062506-1 - 062506-15.

95. Ковальская Г. А. Количественная интерпретация результатов измерения интенсивности линий характеристического спектра биологических образцов //Сибирский экологический журнал. – 2000. – Т. 1. – С. 93-96.

96. Hondrogiannis E., Peterson K., Zapf C.M., Roy W., Blackney B., Dailey K. The use of wavelength dispersive X-ray fluorescence and discriminant analysis in the identification of the elemental composition of cumin samples and the determination of the country of origin //Food chemistry. – 2012. – V. 135. – N 4. - C. 2825-2831.

97. Potts P.J., Webb P.C., Williams-Thorpe O. Investigation of a correction procedure for surface irregularity effects based on scatter peak intensities in the field analysis of geological and archaeological rock samples by portable X-ray fluorescence spectrometry //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. -1997. - V. 12. - N7. - C. 769-776.
98. Van Dyck P.M., Van Grieken R.E. Absorption correction via scattered radiation in energy-dispersive X-ray fluorescence analysis for samples of variable composition and thickness //Analytical chemistry. – 1980. – V. 52. – N 12. – C. 1859-1864.

99. Nečemer M., Kump P., Scancar J., Jacimovic R., Simcic J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikus K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2008. – V. 63. – N 11. – C. 1240-1247.

100. Филимонов В.И. Руководство по общей и клинической физиологии. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002

101. Rousseau R.M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2006.
– V. 61. – N 7. – C. 759-777.

102. Carvalho M.L., Marques A.F. X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis //X-Ray Spectrometry. -2001. - V. 30. - N 6 - C. 397-402.

103. Лисецкая, Л.Г. Методологические вопросы анализа микроэлементов в биосредах // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. –2005. – № 1. – С. 168-173.

104. Gigante G.E., Gonsior B. Comparison of different excitation methods for X-ray spectral analysis: the case of synchrotron radiation //Fresenius' journal of analytical chemistry. -2000. -V. 368. -N 7. -C. 644-648.

105. Tran C.Q., Jonge M.D., Barnea Z., Chantler C.T. Absolute determination of the effect of scattering and fluorescence on x-ray attenuation measurements //Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. – 2004. - V. 37. - N 15. - C. 3163.

106. Dorn GW, Molkentin JD. Manipulating cardiac contractility in HF: Data from mice and men. Circulation. 2004–T.109–C.150–8.

109

107. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC) The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. Eur. Heart J. -2012-T.33(14) –C.1750-1757.

108. Калюжин, В.В., Тепляков, А.Т., Вечерский Ю.Ю., Рязанцева Н.В. Патогенез хронической сердечной недостаточности: изменение доминирующей парадигмы. Бюллетень сибирской медицины. –2007– №4.

109. Liu, L., Wu, J., Kennedy, D.J., Regulation of Cardiac Remodeling by Cardiac Na(+)/K(+)-ATPase Isoforms. Front Physiol, -2016–T.9(7) –C.382.

110. Spragg DD, Kass DA. Pathobiology of left ventricular dyssynchrony and resynchronization. Prog Cardiovasc Dis. – 2006–T.49–C.26–41

111. Осипова, О.А., Нагибина, А.И., Комисов, А.А., Петрова, Г.Д., Шеховцова Л.В., Власенко М.А. и др.. Патоморфологические механизмы регуляции образования миокардиального фиброза у больных хронической сердечной недостаточностью на фоне ишемической болезни сердца. Журнал Сердечная Недостаточность– 2016–Т.17 (5) –С.357–364.

112. Чернявский. А.М., Левичева, Е.Н., Логинова, И.Ю. Сердечная недостаточность и дисбаланс химических элементов в миокарде больных ишемической болезнью сердца. –2011– Т.8–С.15-21.

113. Despa, S., Bers, D.M., Functional analysis of Na+/K+-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Cell Physiol–2007–T.293(1) –C.321-327.

114. Bers D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force / D. M. Bers – London: Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Publishers– 2001– Вып. Second edi–C.427

115. Nagata, T., X-ray microanalysis of biological specimens by high voltage electron microscopy//Prog Histochem Cytochem. –2004– –T.39(4) – C.185-319.

116. Караськов, А.М., Каменская, О.В., Левичева, Е.Н., Дисбаланс химических элементов в прогрессировании сердечной недостаточности у

больных ишемической болезнью сердца..//Журнал Сердечная Недостаточность- 2011-12-Т.2(64) -С. 86-90.

117. Zaugg, C.E., Buser, P.T.,. When calcium turns arrhythmogenic: intracellular calcium handling during the development of hypertrophy and heart failure. Croat Med J. –2001 –T.42(1) –C.24-32.

118. Shattock, M.J., Ottolia, M., Bers, D.M., Blaustein, M.P., Na+/Ca2+ exchange and Na+/K+-ATPase in the heart. J Physiol. – 2015 –T. 15–V.593(6) – C.1361-82..

119. Goch, A.,.Concentration of elements in plasma of patients with essential hypertension. Pol Arch Med Wewn. – 2005–T.114 (4) –C.947-952.

120. Palmer, B.M., Vogt, S., Chen, Z., Intracellular distributions of essential elements in cardiomyocytes. J.Struct. Biol. –2006. –T. 155–C.12-21.

121. Fraùstoda Silva, Williams, The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life. published by Clarendon, Oxford, – 1991–C.561

122. Zang W.J., Yu X.J., Zang Y.M. Ca2+ sparks evoked by depolarization of rat ventricular myocytes involve multiple release sites. Acta Pharmacol Sin. — 2003–T.24(6)C.555-62.

123. Окунева Г.Н., Караськов А.М., Чернявский А.М., Логинова И.Ю., Трунова В.А., Зверева В.В. Роль химических элементов в патологии миокарда у кардиохирургических больных с ишемической болезнью сердца и дилатационной кардиомиопатией // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. –2010. – Т.3 – №6. – С. 71-78

124. Окунева Г.Н., Караськов А.М., Чернявский А.М., Волков А.М., Трунова В.А., Зверева В.В. Участие химических элементов в развитии сердечной недостаточности у пациентов с дилатационной кардиомиопатией // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011– Т.4– №5– С. 50-53

125. Rowayda A. Sadek. SVD Based Image Processing Applications: State of the Art, Contributions and Research Challenges // International Journal of Advanced Computer Science and Applications. –2012–№7 (Vol. 3) – C 26-34

111