

УДК 616.379-008.64: 616.124.2: 599.323.4

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ Na/K-АТФазы В МИОКАРДЕ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ПРЕДИАБЕТА И САХАРНОГО ДИАБЕТА

© 2020 г. О. В. Чистякова^{1,*}, И. Б. Сухов¹, М. Г. Добрецов¹, И. В. Кубасов¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: chiosana@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 30.10.2019 г.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, левый желудочек, Na/K-АТФаза, крыса

DOI: 10.31857/S0044452920020047

Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) и связанная с ней сердечная недостаточность определены как систолическая и диастолическая дисфункции левого желудочка сердца, возникающие при сахарном диабете (СД) и развивающиеся независимо от коронарной болезни сердца и артериальной гипертензии. Исследования последних лет главным образом посвящены изучению молекулярных основ ДКМ при СД 2-го типа [1]. Данные, касающиеся ДКМ при СД 1-го типа (СД1), ограничены, а сам факт существования данного осложнения СД1 до недавнего времени оставался под вопросом [2]. Грызуны достаточно резистентны к развитию коронарной болезни сердца (если не применяются технологии генной инженерии), что делает их идеальной моделью для изучения ДКМ при различных типах СД [2]. В качестве универсального раннего механизма сердечной недостаточности различной этиологии рассматривают структурно-функциональные перестройки в Т-системе кардиомиоцитов – системе инвагинаций плазматической мембраны t-трубочек внутрь клетки. В t-канальцах с большей плотностью, чем в поверхностной сарколемме, представлена α_2 изоформа Na/K-АТФазы (КФ 3.6.3.9), которая регулирует градиент Na^+ на мембране t-трубочек и опосредованно важна для контроля $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником концентрации цитоплазматического Ca^{2+} и сократимости кардиомиоцитов [3]. Большой диагностический интерес представляет исследование функционального состояния Т-системы на ранних сроках СД1. В этот период в качестве основных патогенных факторов прогрессии осложнений СД1 рассматривают снижение продукции инсулина, окислительный стресс, при этом еще нет острой гипергликемии и не нарушен жировой обмен [4]. Na/K-АТФаза – один из древнейших мембранных белков, участвующий в возбудимости тканей животных. Эффек-

тивность работы фермента находится в прямой зависимости от контроля тканевых функций инсулиновой системой [5] – филогенетически поздней регуляции на уровне организма, результатом становления которой в эволюции стало формирование инсулинозависимого пула клеток, к которым, наряду с адипоцитами и скелетными миоцитами, относятся кардиомиоциты. Все вышесказанное определяет интерес к функционированию Na/K-АТФазы в условиях инсулиновой недостаточности. Целью настоящей работы являлось изучение активности Na/K-АТФазы в кардиомиоцитах крыс с разной степенью диабетических нарушений, вносящих вклад в развитие ДКМ.

Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар в возрасте 5.5–6 мес. СД1 вызывали однократной внутривенной инъекцией стрептозотцина (СТЗ, Sigma, США) в дозе 30 (СД30-группа, $n = 6$) или 45 мг/кг (СД45-группа, $n = 5$). Контрольным животным (К-группа, $n = 5$) вводили буфер. Массу тела измеряли до индукции СД1 и далее каждую неделю на протяжении месяца. Уровень глюкозы измеряли натощак с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Уровень гликированного гемоглобина ($\text{HbA}_{1\text{C}}$) определяли в конце эксперимента с помощью набора A1CNOW⁺ Professional (Polymer Technology Systems, USA). Уровень инсулина измеряли методом твердофазного ИФА с помощью набора Rat Insulin ELISA (“Merckodia AB”, Швеция). Крыс выводили из эксперимента введением хлоралгидрата (400 мг/кг). АТФазную активность определяли в микросомальной фракции мембран миокарда, выделенной из левого желудочка методом дифференциального центрифугирования. При определении общей АТФазной активности пробы, содержащие 40–45 мкг белка, инкубировали в среде: 20 мМ Трис-НСl (рН 7.4),

Таблица 1. Морфометрические и метаболические показатели контрольных и диабетических крыс ($M \pm SEM$)

Группа	Вес, г		Инсулин, нг/мл, на 30-й день после индукции	Глюкоза, ммоль/л		HbA _{1C} , %, на 30-й день после индукции	Активность Na/K-АТФазы, P _i ммоль/г в час, на 30-й день после индукции
	до индукции	на 30-й день после индукции		на 4-й день после индукции	на 30-й день после индукции		
К, n = 5	397 ± 15	418 ± 17	1.7 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	8.0 ± 0.8
СД30, n = 6	405 ± 12	401 ± 13	0.4 ± 0.1*	9.1 ± 2.3	5.6 ± 0.2	6.8 ± 0.7*	9.9 ± 1.0
СД45, n = 5	392 ± 14	337 ± 17*#	0.3 ± 0.1*	22.3 ± 1.6*#	27.1 ± 1.8*#	11.6 ± 0.4*#	3.6 ± 1.4*#

Статистически значимые отличия от К-группы (*) и от СД30-группы (#), по методу ANOVA с post hoc тестом Тьюки при $p < 0.05$

150 mM NaCl, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM ЭГТА, 1 mM Na₂АТФ [6]. Na/K-АТФазную активность оценивали по содержанию неорганического фосфата по методу Фиске–Суббароу. Na/K-АТФазную активность рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg²⁺-зависимую, определяемую в присутствии 1 mM убаина (специфический ингибитор α-изоформ Na/K-АТФазы). Статистическую обработку данных проводили в программе “Microsoft Office Excel 2007” (надстройка “AtteStat 12.5”) и “GraphPad Prism 7 software” (GraphPad Software, LaJolla, США). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$ по методу ANOVA с post hoc тестом Тьюки.

Как следует из таблицы, у крыс в СД30-группе на 4-й день после введения СТЗ развивалась умеренная гипергликемия. Через месяц развития диабета уровень инсулина в СД30-группе снижался в ~4 раза ($p < 0.0001$), а уровень HbA_{1C} превышал показатели в К-группе в 1.5 раза ($p = 0.040$). У крыс в СД45-группе на 4-й день после введения СТЗ наблюдали выраженную гипергликемию (таблица 1). Через месяц развития диабета вес крыс в СД45-группе по сравнению с К-группой был ниже на 20% ($p = 0.017$), а уровень инсулина значительно снижался. К концу эксперимента у крыс СД45-группы уровень глюкозы был значительно ниже контрольных показателей ($p < 0.0001$). В конце эксперимента уровень HbA_{1C} в СД45-группе превышал таковой в К-группе в 2.6 раза ($p < 0.0001$). Таким образом, через месяц после введения СТЗ состояние крыс СД30-группы можно определить как начальную стадию диабета – преддиабет, для которой характерна инсулиновая недостаточность при умеренном повышении HbA_{1C} и минимальных изменениях показателей метаболизма глюкозы. Состояние животных СД45-группы можно охарактеризовать как острый СД1, что следует из выраженной инсулиновой недостаточности, гипергликемии и повышения уровня HbA_{1C}.

Подавление активности Na/K-АТФазы в миокарде крыс выявлено при остром диабете, но не на

стадии преддиабета. Так, активность Na/K-АТФазы у крыс СД45-группы снижалась более чем на 50% относительно К-группы ($p = 0.040$) и была ниже порядка 80% относительно активности в СД30-группе ($p = 0.005$) (табл. 1). Наши данные по исследованию острого СД1 (СД45-группа) согласуются с предыдущими работами, где снижение активности Na/K-АТФазы в миокарде крыс более чем на 20% показано уже на первых неделях после введения СТЗ [7]. Результаты других работ позволяют предполагать, что падение активности Na/K-АТФазы при остром СД1 связано со снижением чувствительности фермента к активации внутриклеточным натрием. Найдено также, что при СД1 количество белка α1-субъединицы Na/K-АТФазы не меняется, в то время как количество α2 снижается на ~50% [8]. Поскольку α2 составляет менее 25% от общего числа α-субъединиц Na/K-АТФазы в миоцитах крысы, сокращение ее экспрессии не оказывает значительный эффект на функцию Na/K-АТФазы. Однако поскольку α2 имеет предпочтительную локализацию в t-трубочках [9], снижение ее количества (экспрессии) может существенно влиять на обмен ионов Ca²⁺ и таким образом регулировать сокращение кардиомиоцитов через локальные субклеточные механизмы. Исследование эффекта инсулина на субклеточную локализацию изоформ Na/K-АТФазы в сердечной мышце здоровых и СТЗ-индуцированных диабетических крыс показало, что инсулин опосредует транслокацию α1- и α2-субъединиц фермента на плазматическую мембрану кардиомиоцитов через ФИ-3-киназный путь, причем при СД1, при снижении инсулинового сигнала, транслокация α2 оказывается более уязвимой [5]. Можно предполагать, что факторами выявленного нами снижения активности Na/K-АТФазы при недостатке инсулина и ослаблении инсулиновой сигнальной системы является нарушение транслокации представленных в кардиомиоцитах крыс α1- и α2-субъединиц фермента, а также снижение экспрессии α2-субъединицы. Вероятно, что на стадии преддиабета (СД30-группа), при выраженной инсулиновой недостаточности, но отсутствии длительной гипергликемии не дефицит инсулина, а какие-либо иные

факторы, ассоциированные с СД1 (нарушения сопряжения ионной проводимости мембран), вносят вклад в регуляцию активности Na/K-АТФазы в миокарде.

Таким образом, в работе выявлено подавление активности Na/K-АТФазы в миокарде левого желудочка крыс при остром СД1, но не на стадии преддиабета, что указывает на зависимость степени повреждения транспортных процессов в мембране кардиомиоцитов от тяжести диабета. Патологические основы развития ДКМ требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 19-015-00139).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с подопытными животными”, утвержденными этическим комитетом ИЭФБ РАН (30.12.2015 г.) и согласно требованиям Директивы Европейского парламента (1986 г.). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bugger H., Abel E.D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 57(4): 660–671. 2014.
2. Hölscher M.E., Bode C., Bugger H. Diabetic cardiomyopathy: does the type of diabetes matter? *Int. J. Mol. Sci.* 17(12): E2136. 2016.
3. Louch W.E., Sejersted O.M., Swift F. There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:503906. 2010.
4. Dobretsov M., Romanovsky D., Stimers J.R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. *World J. Gastroenterol.* 13: 175–191. 2007.
5. Rosta K., Tulassay E., Enzsoly A., Ronai K., Szantho A., Pandics T., Fekete A., Mandl P., Ver A. Insulin induced translocation of Na⁺/K⁺-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin.* 30: 1616–1624. 2009.
6. Bublitz M. (ed.). P-type ATPases: methods and protocols, methods in molecular biology. New York. Springer Science+Business Media. 1377. 2016.
7. Ефимов Д.А. Механизм развития диабетической кардиомиопатии в условиях эксперимента. *Международный эндокринологический журнал*. 2(42): 67–69. 2012. [Yefimov D.A. Mechanism of Experimental Diabetic Cardiomyopathy Development. *International Journal of Endocrinology (Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal)* 2(42): 67–69. 2012 (in Russ)].
8. Lambert R., Srodulski S., Peng X., Margulies, K. B., Despa, F., Despa S. Intracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_i) is elevated in diabetic hearts due to enhanced Na⁺-glucose cotransport. *J. Am. Heart Assoc.* 4:e002183. 2015.
9. Despa S., Lingrel J.B., Bers D.M. Na/K-ATPase α 2-subunit preferentially affects sarcoplasmic reticulum Ca release in mouse cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 95: 480–486. 2012.

The Study of Rat Myocardial Na/K-ATPase Activity in Experimental Conditions of Prediabetes and Diabetes Mellitus

O. V. Chistyakova^{a,#}, I. B. Sukhov^a, M. G. Dobretsov^a, and I. V. Kubasov^a

^a Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: chiosana@yandex.ru