

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ И КОМПОНЕНТОВ
 Ca^{2+} -ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ В МИОКАРДЕ В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕДИАБЕТА И ДИАБЕТА
1-ГО ТИПА У КРЫС

© 2024 г. И. Б. Сухов¹*, О. В. Чистякова¹, М. Г. Добрецов¹

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

* E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 07.05.2024 г.

Принята к публикации 10.05.2024 г.

Одним из осложнений сахарного диабета (СД) является диабетическая кардиомиопатия, молекулярные механизмы патогенеза которой в полной мере не исследованы. Ранее показано участие Na^+/K^+ -АТФазы и компонентов Ca^{2+} -транспортной системы в кардиомиоцитах в развитии диабетической кардиомиопатии. Целью работы было изучить экспрессию и активность Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2) в миокарде самцов крыс Вистар на модели индуцированного стрептозотоцином (STZ) преддиабета и явного СД 1-го типа (СД1). STZ вводили однократно в/б в дозе 30–35 мг/кг. Крыс с уровнем глюкозы выше 11 мМ считали диабетическими (STZ-D1 группа), с умеренной гипергликемией – преддиабетическими (STZ-preD1 группа). Определяли активность Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (по скорости высвобождения неорганического фосфата, P_i) методом RT-ПЦР оценивали экспрессию генов $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na^+/K^+ -АТФазы, SERCA2 и Kir6.1, Kv7.1 и Kv2.1 калиевых каналов. В контрольной (С) группе активность чувствительной к 1 мМ убаина Mg^{2+} -зависимой АТФазы составляла 6.03 ± 0.6 ммоль P_i /г/ч. В группах STZ-D1 и STZ-preD1 активность Na^+/K^+ -АТФазы не отличалась от группы С. Уровень генной экспрессии $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ - субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в группе STZ-D1 снижался более чем на 45%, тогда как в группе STZ-preD1 повышался на 64 и 81%, что может указывать на высокую чувствительностью экспрессии к инсулинопении. Активность Ca^{2+} -АТФазы и экспрессия гена этого фермента в группах не различались – вероятно, 4-недельный период после введения STZ недостаточен для развития дефицита Ca^{2+} -АТФазы в сердце крысы. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 возрастал в STZ-preD1 группе, что может указывать на определенный вклад изученных подтипов калиевых каналов в адаптационный механизм к умеренной гипергликемии.

Ключевые слова: сахарный диабет, преддиабет, диабетическая кардиомиопатия, Na^+/K^+ -АТФаза, SERCA2, инсулин, крыса

DOI: 10.31857/S0869813924060033, EDN: BFBYKQ

ВВЕДЕНИЕ

Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) является одним из осложнений сахарного диабета (СД), ведущим к высокой смертности среди пациентов. Молекулярные механизмы патогенеза ДКМ в полной мере не исследованы. Ранее показано участие Na^+/K^+ -АТФазы и компонентов Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах в развитии ДКМ.

Na^+/K^+ -АТФаза – ионный транспортер, ответственный за поддержание высоких натриевого и калиевого градиентов на плазматической мембране эукариотических клеток. Для кардиомиоцитов как клеток с активным электрогенезом, функция Na^+/K^+ -АТФазы критически значима. В особенности это относится к контролю натриевого градиента, который определяет порог возбудимости клетки, скорость распространения и амплитуду потенциала действия, и активность множества вторичных транспортеров – важных для регуляции внутриклеточного кальция и механизмов клеточной энергетики. В кардиомиоцитах сердца крысы экспрессируются две изоформы Na^+/K^+ -АТФазы: $\alpha 1$ – универсальная, присутствует во всех компартментах плазматической мембраны кардиомиоцитов; $\alpha 2$ – локализуется в t-трубочках, где количество мест этого транспортера контролируется инсулином [1, 2].

В процесс сопряжения возбуждения и сокращения кардиомиоцитов вовлечен комплекс белков, регулирующих уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Саркоплазматическая Ca^{2+} -АТФаза (SERCA2), кодируемая специфичным для миокарда геном *Atp2a2*, выводит Ca^{2+} из цитозоля, способствуя расслаблению кардиомиоцитов. Инсулин регулирует SERCA2 в скелетных мышцах и в миокарде путем прямого контакта С-концевого домена SERCA2 с белками-субстратами инсулинового рецептора [3]. Снижение экспрессии или потеря функциональной активности данного транспортера может изменить Ca^{2+} -волны, что станет триггером для развития сердечной недостаточности. Кроме того, снижение активности SERCA2 понижает возврат Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум, что уменьшает уровень Ca^{2+} , доступного для следующего сердечного цикла сокращения-релаксации, и понижает сократительную способности миокарда [4]. Этот патогенный механизм лежит в основе развития ДКМ, которая на ранних стадиях проявляется диастолической дисфункцией сердца, а позже – систолической дисфункцией.

Известно, что реполяризация кардиомиоцитов определяется в значительной степени активностью калиевых каналов. Однако стоит отметить, что экспрессия каналов и вклад токов через них зависит от периода развития животного [5]. Ранее в наших исследованиях [6] у диабетических крыс было показано статистически значимое возрастание QT-интервала и значения QTc на 23 и 11% соответственно. Эти изменения имеют важное диагностическое значение для изучения диабетической кардиомиопатии и согласуются с данными литературы по исследованию ЭКГ у пациентов с СД 1-го типа (СД1) [7, 8]. У кроликов в условиях аллоксан-индуцированного СД1 также выявлено увеличение QT интервала [9]. Значимый вклад в изменение показателей ЭКГ, в частности, интервала QT, как при СД1, так при СД2, вносят каналы $\text{Kv} 2.1$ и $\text{Kv} 7.1$ [10, 11]. Локализация каналов $\text{Kv} 2.1$ в миоцитах желудочков взрослой крысы впервые описана в работе O'Connell с соавт. [12]. Показано, что все подтипы $\text{Kv} 7$ каналов присутствуют в миоцитах крыс Wistar [13, 14]. Через 14 дней после индукции СД1 стрептозотоцином (STZ) у крыс в левых желудочках сердца содержание белков $\text{Kv} 2.1$ и $\text{Kv} 4.2$ и $\text{Kv} 4.3$ и экспрессия мРНК соответствующих генов значительно снижаются [15]. Также показано, что после инфаркта миокарда у крыс снижена плотность белка $\text{Kv} 2.1$ и экспрессия мРНК соответствующего гена [16], а у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной перевязкой проксимального отдела левой коронарной артерии, экспрессия каналов $\text{Kv} 2.1$ и $\text{Kv} 7.1$ возрастает в синоатриальном узле [17]. Таким образом, имеющиеся данные неоднозначны относительно вклада токов I_{ss} в развитие в сердечной недостаточности и ДКМ.

Ранее, исследуя роль K⁺-каналов в патогенезе сердечных нарушений в условиях СД [18], мы пришли к заключению, что в кардиомиоцитах крыс через две недели после введения STZ фаза следовой гиперполяризации, отчетливо выраженная в большинстве потенциалов действия, обусловлена возрастанием активности АТФ-зависимых K⁺-каналов (Kir6.x). Другими авторами в миоцитах крыс показана стимулируемая сахарозой экспрессия гена канала Kir6.1 [19].

Суммируя вышеизложенное, можно утверждать, что дефицит инсулина при СД1 ослабляет сигнальные каскады гормона в мышцах, в том числе в миокарде [20, 21]. Обращает внимание тот факт, что, как показано нами ранее [22], для нормализации действия инсулина в мышцах недостаточно устранения дефицита гормона путем инсулинотерапии, и, очевидно, что молекулярные инсулин-зависимые сигнальные каскады в мышцах претерпевают более глубокие молекулярные перестройки, которые недостаточно изучены на данный момент. Целью исследования было изучение экспрессии и активности Na⁺/K⁺-АТФазы компонентов Ca²⁺-транспортирующей системы (SERCA2) и калиевых каналов в миокарде самцов крыс на модели индуцированного стрептозотоцином предиабета и явного СД1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Исследования проводили на самцах крыс Вистар массой тела 240–260 г на начало эксперимента. Развитие СД индуцировали однократным в/б введением стрептозотоцина (STZ, Sigma, США) в дозе 30–35 мг/кг. Животным контрольной группы (С, *n* = 13) вводили цитратный буфер (рН 4.6) в эквивалентном объеме. Крыс с уровнем глюкозы выше 11 мМ считали диабетическими (STZ-D1 группа, *n* = 16), с умеренной гипергликемией (7.8–11 мМ) – преддиабетическими (preSTZ-D1 группа, *n* = 9), в соответствии с принятыми клиническими критериями предиабета, удовлетворяющими экспериментальную модель [23]. Количество животных преддиабетических и диабетических при дозе STZ 30 мг/мл составляло 40 и 60%, при дозе 35 мг/кг – 30 и 70% соответственно. Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Забор левых желудочков (ЛЖ) сердца проводили через 4 недели после инъекции STZ. Животных выводили из эксперимента декапитацией после анестезии хлоралгидратом (в/б, в дозе 400 мг/кг). Ткань хранили при –80 °С до определения активности ферментов и уровня экспрессии генов.

Анализ уровня экспрессии генов. Анализ уровня экспрессии генов проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией. Тотальную РНК из миокарда левых желудочков выделяли с помощью коммерческого набора «Реагент ExtractRNA» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя с использованием стеклянных гомогенизаторов. Образцы РНК тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля отсутствия деградации препаратов РНК.

Для обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) брали 1 мг РНК и использовали набор MMLV RT (Евроген, Россия). ОТ-ПЦР проводили с использованием Random Hexamer Primer в соответствии с протоколом производителя. Предварительно все образцы РНК обрабатывали DNaseI, RNase-free (Thermo Fisher Scientific Inc., США) для очистки от содержащих примесей молекул ДНК.

ПЦР амплификацию проводили с идентификаций SybrGreen в объеме 25 мкл следующего состава: 10 нг продукта ОТ-ПЦР, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера, реагент qPCRmix-HSSYBR+LowROX (Евроген, Россия). Непосредственно ПЦР проводили с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies (ABI), Thermo Fisher Scientific Inc., США). Режим амплификации: (1) 95 °С в течение 5 мин; (2) трех-этапная амплификация и детекция – 38 циклов при 95 °С в течение 30 с, (температура

отжига подбирались индивидуально) в течение 30 с, и 72 °С в течение 30 с; (3) кривая плавления (для детекции димеров). Температура отжига праймеров была рассчитана с помощью программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Размер ампликона ПЦР реакции протестировали в 2%-ном агарозном геле. Праймеры для анализа уровня экспрессии генов приведены в табл. 1.

Анализ результатов ПЦР проводился по методу $\Delta\Delta C_t$. В качестве гена «домашнего хозяйства» использована 18S/45S рибосомальная РНК.

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов

Мишень исследования	Ген	Последовательность прямого и обратного праймеров	Источник
Na ⁺ /K ⁺ транспортирующая субъединица $\alpha 1$	<i>Atp1a1</i>	CCCAAAACGGACAAACT GCACTACCACGATACTGAC	24
Na ⁺ /K ⁺ транспортирующая субъединица $\alpha 2$	<i>Atp1a2</i>	GGTGGCCCTCCGAATGTAC ATGAAGATGAGGAGACTGTAGGGAAA	25
18S/45S ribosomal RNA	<i>Rn18s/ Rn45s</i>	GTAACCCGTTGAACCCCATC CCATCCAATCGGTAGTAGCG	26
Kv2.1	<i>Kcnb1</i>	GACGACTACAGCCTTGAGGAC TCGTTTCATCTGCTCCTTCTTT	27
Kir6.1	<i>Kcnj8</i>	AGCTGGCTGCTCTTCGCTATC CCCTCCAAACCCAATGGTCACT	28
Kv7.1	<i>Kcnq1</i>	ACCTCATCGTGGTTGTAGCC TCCTGGCGGTGAATGAAGAC	29
SERCA2	<i>Atp2a2</i>	AAACCCCCACGGAACCCAAAAG AAGTCTGGGTTGTCCTCCTTACACT	30

Анализ активности Na⁺/K⁺-АТФазы. У животных групп С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$) активность Na⁺/K⁺-АТФазы определяли в микросомальной фракции мембран миокарда, выделенной из левого желудочка сердца методом дифференциального центрифугирования [31] по содержанию неорганического фосфата Pi (Pi ммоль/г/ч) в инкубационной среде (мМ): 20 Трис-НСl (рН 7.4), 150 NaCl, 10 KCl, 3 АТФ, 3 MgCl₂, 1 ЭГТА, 1 Na₂АТФ (метод Фиске-Суббароу). После 10-минутной инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 10%-ной ТХУ. Активность Na⁺/K⁺-АТФазы рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg²⁺-зависимую, определяемую в присутствии 1 мМ или 100 мкМ убаина – селективного ингибитора Na⁺/K⁺-АТФазы, полностью блокирующего активность $\alpha 1$ и $\alpha 2$, $\alpha 3$ -изоформы крысиного фермента при указанных концентрациях [32].

Анализ активности Ca²⁺-АТФазы (SERCA2). У животных групп С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$) активность SERCA2 определяли в препаратах легкой фракции саркоплазматического ретикула миокарда, выделенной методом дифференциального центрифугирования, по содержанию неорганического фосфата Pi (Pi ммоль/г/ч) в инкубационной среде (мМ): 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.5 ЭДТА, 30 имидозол, 3 АТФ и ~10 свободного Ca²⁺ (метод Фиске-Суббароу). Активность SERCA2 рассчитывали, как разность между общей АТФазной активностью и активностью Mg²⁺-АТФазы, определяемой в бескальциевой инкубационной среде с добавлением 100 нМ тапсигаргина – специфического ингибитора SERCA2 [33–35].

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали, используя пакет программ GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для контроля соответствия нормальному распределению использовали критерий Шапиро-Уилка. При подтверждении нормальности распределения полученных данных описательная статистика включала среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM), при ненормальности – значения медианы и процентилей. Параметрический критерий применяли: для сравнения двух несвязанных совокупностей – t -тест, для сравнения трех и более несвязанных совокупностей – метод ANOVA с поправкой Тьюки. Непараметрические критерии применяли: для двух независимых выборок – критерий Манна-Уитни, для более двух несвязанных совокупностей – критерий Крускала-Уоллиса и последующий тест Дана, для трех и более связанных совокупностей – тест Фридмана и последующий тест Дана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика модели

До индукции патологии масса тела животных в группах и уровень случайной глюкозы не различались (табл. 2). У контрольной С группы масса тела статистически значимо увеличивалась, начиная с 14-го дня эксперимента, уровень глюкозы в группе на протяжении всего эксперимента не менялся. У STZ-preD1 группы масса тела в ходе эксперимента не менялась, а уровень глюкозы на 3-й и 14-й дни после введения STZ был статистически значимо выше такового у группы С. У STZ-D1 группы на 3-й и 14-й дни после введения STZ масса тела была меньше, чем до введения STZ, а также меньше, чем у контрольных животных. Уровень глюкозы у STZ-D1 группы через 3 дня после введения STZ и далее до конца эксперимента был статистически значимо выше такового в контрольной С группе. Масса сердца в конце эксперимента у животных контрольной С и STZ-preD1 групп не различалась. У животных STZ-D1 группы масса сердца была статистически значимо меньше, чем у контрольных животных (табл. 2).

Таблица 2. Уровень случайной глюкозы, масса тела и сердца у экспериментальных животных

День эксперимента	Контрольная (С) группа, <i>n</i> = 13	STZ-preD1 группа, <i>n</i> = 9	STZ-D1 группа, <i>n</i> = 16
Глюкоза, мМ			
День введения STZ	5.8 (5.4; 6.5)	5.9 (5.5; 6.1)	5.9 (5.7; 6.3)
3 дня после введения STZ	6.3 (5.6; 6.6)	9.2 (8.9; 13.6)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0448	25.8 (23.6; 27.5)* # * <i>p</i> = 0.0007 # <i>p</i> < 0.0001
14 дней после введения STZ	5.8 (5.1; 6.3)	7.5 (7.3; 8.7)	27.4 (22.0; 32.0)* # * <i>p</i> = 0.0003 # <i>p</i> < 0.0001
28 дней после введения STZ	6.0 (5.7; 6.1)	7.8 (7.6; 8.7)* # * <i>p</i> = 0.0057 # <i>p</i> = 0.0445	30.8 (28.2; 33.0)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> < 0.0001
Масса тела, г			
День введения STZ	364 (318; 391)	374 (332; 394)	353 (345; 370)
3 дня после введения STZ	376 (322; 400)	356 (321; 384)	331 (323; 368)
14 дней после введения STZ	380 (334; 407)* <i>p</i> = 0.0004	371 (338; 392)	319 (299; 326)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0012
28 дней после введения STZ	390 (344; 419)* <i>p</i> < 0.0001	383 (342; 399)	305 (289; 330)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0003
Масса сердца, г			
28 дней после введения STZ	0.98 (0.88; 1.03)	1.02 (1.00; 1.12)	0.88 (0.83; 0.96)* <i>p</i> = 0.0359

Данные представлены как медиана (25-й; 75-й процентиля).

* – статистически значимое отличие от значения в группе в день введения STZ, тест Фридмана и последующий тест Дана. # – статистически значимое отличие от значения в контрольной группе в соответствующий день эксперимента, тест Крускала-Уоллиса и последующий тест Дана.

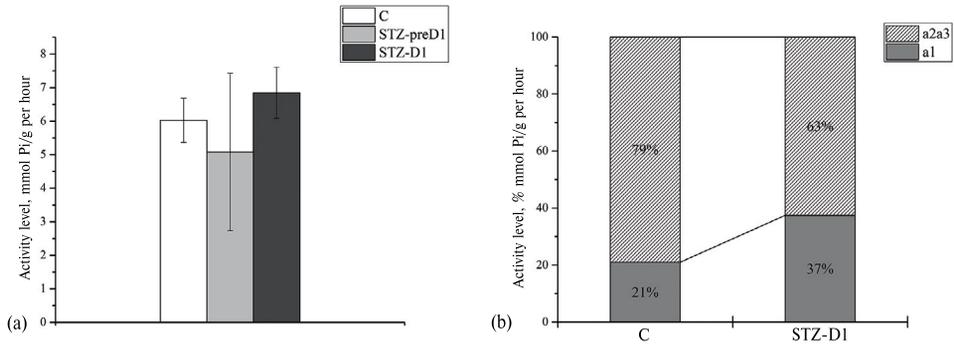


Рис. 1. Уровень активности Na⁺/K⁺-АТФазы в левом желудочке в группах контрольной (C, *n* = 5), STZ-preD1 (*n* = 3) и STZ-D1 (*n* = 8). (a) – активность чувствительной к убаину (1 мМ) Mg²⁺-зависимой Na⁺/K⁺-АТФазы. Данные представлены как *M* ± *SEM*. (b) – активность высокочувствительной к убаину (100 нМ) Na⁺/K⁺-АТФазы. Данные представлены как % от общей активности Na⁺/K⁺-АТФазы.

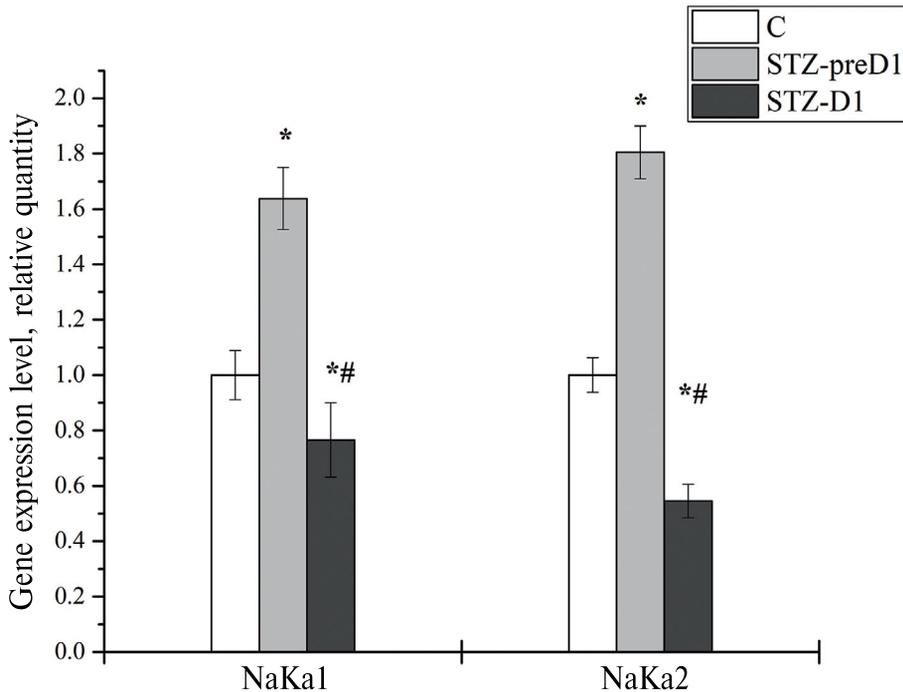


Рис. 2. Уровень экспрессии генов субъединиц alpha1- и alpha2-изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы в левом желудочке в группах C (*n* = 5), STZ-preD1 (*n* = 8) и STZ-D1 (*n* = 8) группах. Данные представлены как *M* ± *SEM*. Статистически значимые отличия, при *p* < 0.05: * – групп STZ-preD1 и STZ-D1 от группы C; # – группы STZ-D1 от STZ-preD1. Референсный ген – 18S/45S рибосомальная РНК.

Исследование Na^+/K^+ -АТФазы

Активность Na^+/K^+ -АТФазы в левом желудочке в группах STZ-preD1 и STZ-D1 не отличалась от таковой в группе С, составляя 84 и 113% соответственно от контрольного уровня (рис. 1а).

Фракция высокочувствительной к убаину (100 нМ) активности Na^+/K^+ -АТФазы ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы) в группах С и STZ-D1 составляла 79 и 63% от общей активности Na^+/K^+ -АТФаза (рис. 1б).

Уровень экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы, возрастал в группе STZ-preD1 на 63.8 и 80.5% относительно группы С, и снижался в группе STZ-D1 на 23.4 и 45.5% (рис. 2).

Исследование SERCA2

В группах С, STZ-preD1 и STZ-D1 уровень активности SERCA2, а также уровень экспрессии соответствующего гена *Atp2a2* не различались (рис. 3а, б).

Исследование уровня экспрессии генов подтипов калиевых каналов *Kv2.1*, *Kir6.1* и *Kv7.1*

ПЦР анализ показал, что в группе STZ-preD1 по сравнению с группой С экспрессия транскриптов *Kv2.1*, *Kir6.1* и *Kv7.1* подтипов калиевых каналов возрастала на 85, 99 и 92% соответственно (рис. 4). В группе STZ-D1 транскрипции РНК изученных подтипов калиевых каналов не отличалась от таковой в группе С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы относительно уровня активности Na^+/K^+ -АТФазы в модельных экспериментах СД1 достаточно противоречивы [1, 36–38], но в ряде работ уже через две недели после введения STZ показано значительное – до 35–40%, снижение максимальной активности Na^+/K^+ -АТФазы [39]. В этой связи при анализе данных по активности Na^+/K^+ -АТФазы, вероятно, необходимо учитывать возраст животных при индукции патологии, сроки развития СД1, а также малоконтролируемые биохимические сдвиги уровней глюкозы и инсулина в крови экспериментальных животных.

Уровень фракций высокочувствительной к убаину Na^+/K^+ -АТФаза ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы) в группах С и STZ-D1, обнаруженный нами в данном исследовании, превышает пределы этой фракции, описанные в работах [1, 32, 35, 39], но, тем не менее, соответствует литературным данным [1, 36, 39], где описано, что при развитии СД1 пропорции $\alpha 1/\alpha 2$ изоформ существенно не меняются. В одной работе описано, что при 6-недельном STZ-D1 снижается количество высокоаффинных к убаину связывающих мест ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы), но не низкоаффинных ($\alpha 1$ -изоформа) [37].

Ранее при анализе профилей мРНК, кодирующих белки, связанные с генерацией и проведением электрической активности в биоптатах атриовентрикулярного узла (АВ-узел), в сердцах диабетических крыс через 12 недель после введения STZ в дозе 60 мг/кг заметных различий в экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы, не было выявлено [40]. Нами ранее показано [41], что в миокарде левого желудочка у крыс с преддиабетом активности Na^+/K^+ -АТФазы не отличалась относительно таковой у контрольных животных, но снижалась у животных с 4-недельным СД1. Выявленное в настоящем исследовании снижение экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2* в группе STZ-D1 на фоне стабильной активности Na^+/K^+ -АТФазы, можно рассматривать как фактор, обуславливающий снижение активности Na^+/K^+ -АТФаза по мере усугубления диабетических нарушений.

При имеющимся достаточном количестве работ, показывающих, что ухудшение сердечной деятельности при диабете сопряжено с уменьшением содержания белка SERCA2 и снижением поглощения кальция в саркоплазматическом ретикулеуме

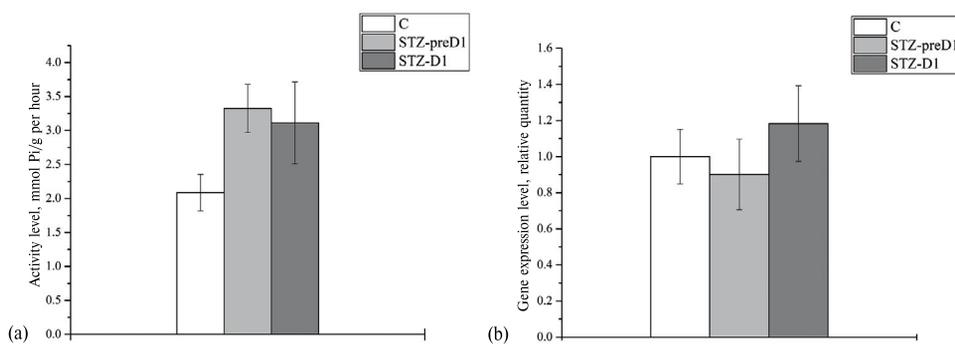


Рис. 3. Уровень активности (а) и экспрессии гена фермента SERCA2 (б) в левом желудочке (а) группы C ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$), (б) группы C ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 8$) и STZ-D1 ($n = 8$). Данные представлены как $M \pm SEM$. Референсный ген для ПЦР – 18S/45S рибосомальная РНК.

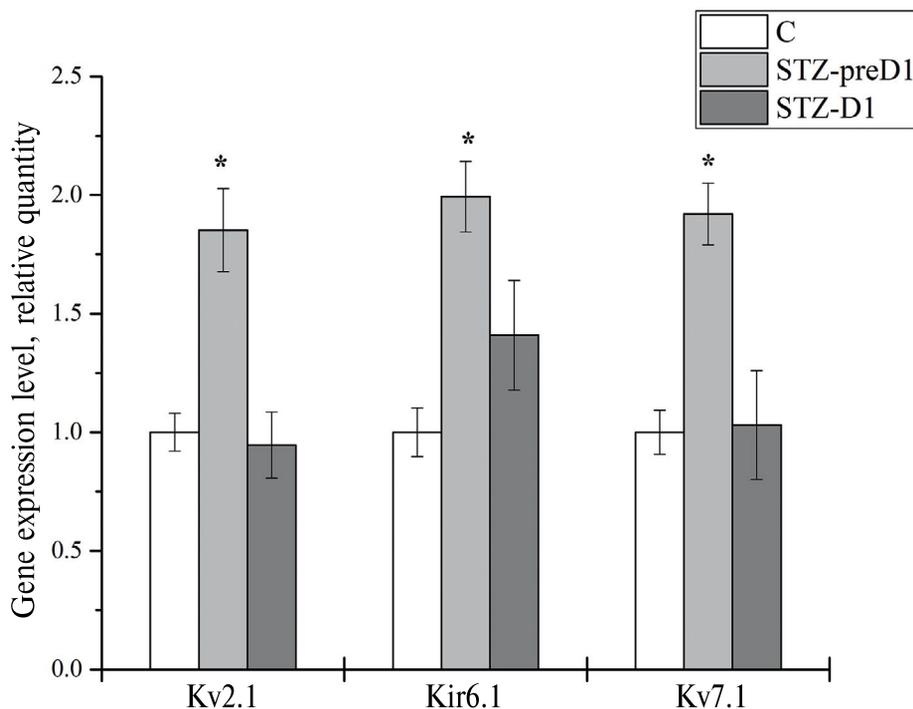


Рис. 4. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 в левом желудочке в группах C ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 8$) и STZ-D1 ($n = 8$). Данные представлены как $M \pm SEM$. Статистически значимые отличия при $p < 0.05$: * – группа STZ-preD1 от C. Референсный ген – 18S/45S рибосомальная РНК.

кардиомиоцитов [42, 43], однако механизмы, лежащие в основе патологии, до конца не установлены. Основным регулятором SERCA2 сердца является интегральный белок мембран фосфоламбан (PLB), ингибирующее действие которого заключается в уменьшении активности Ca^{2+} -АТФазы и снижении ее сродства к кальцию за счет изменения характера белок-белковых взаимодействий при изменении конформации как фосфоламбана, так и Ca^{2+} -АТФазы [44]. PLB, фосфорилируемый цАМФ-зависимой протеинкиназой (PKA), теряет способность ингибировать SERCA2. Предыдущие исследования выявили значительное повышение экспрессии PLB на уровнях мРНК и белка у крыс с STZ-СД1 по сравнению с контрольными животными, при снижении активности и экспрессии SERCA-2. Так, в сердце крыс линии Спрэг-Доули через 10 недель после однократного введения STZ в дозе 70 мг/кг значительно возрастала экспрессия PLB и протеинкиназы С (PKC), но снижалась экспрессия SERCA2, протеинфосфатазы-1 (PPI-1) и риадинового рецептора (RyR), что позволило предполагать важную роль в патогенезе ДКМ сигнального пути PKC/PPI-1/PLB/SERCA2 [45].

В другой работе у крыс Спрэг-Доули через 6 недель после однократного введения STZ в дозе 65 мг/кг ухудшение сердечной деятельности и снижение поглощения кальция саркоплазматическим ретикуломом (SR) сердца сопровождалось снижением уровней белков SERCA2 и PLB, однако соотношение PLB и SERCA2 в сердце было повышено [46]. Отмеченное снижение фосфорилирования PLB Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназой (CaMK) и PKA, при том, что их активности были повышены, объясняется снижением содержания белка PLB, а также повышенной активностью SR-ассоциированной протеинфосфатазы. Авторы заключают, что в диабетическом сердце в ответ на депрессию функции SR активируется процесс фосфорилирования, однако этот компенсаторный механизм может быть недостаточен для поддержания функции SR из-за значительного снижения белка SERCA2, а также значительного увеличения дефосфорилирования PLB.

В настоящем исследовании через 4 недели после введения STZ нарушения функции SR в миокарде крыс, вероятно, не имеют драматичный характер и достаточно скомпенсированы, что отражается в стабильности экспрессии гена *Atp2a2* и выраженной активности SERCA2. Ранее в биоптатах АВ-узла сердец крыс через 12 недель после введения STZ различий в экспрессии гена *Atp2a2* также не было выявлено [40].

Возможной причиной нарушения биоэлектрической активности в миокарде может являться изменение соотношения потенциал-зависимых ионных каналов и транспортеров, как описано нами ранее [18]. Одним из факторов, влияющих на данное соотношение, является уровень экспрессии генов ионных каналов или транспортеров. По нашим данным при умеренной гипергликемии в группе STZ-preD1 экспрессия генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 увеличивается в 1.8–2 раза относительно контроля. Однако эта активация транскрипции, по-видимому, не сопровождается увеличением трансляции и экспрессии протеинов и доставкой соответствующих калиевых каналов на плазматическую мембрану кардиомиоцитов. В противном случае можно было бы ожидать укорочение, а не удлинение потенциалов действия, регистрируемых в кардиомиоцитах преддиабетических крыс через 4 недели после введения STZ, как показано ранее [18]. Согласно выше цитируемой работе [40], у крыс при СД1 в сердце, в клетках АВ-узла экспрессия генов *Kcnb1* (Kv2.1 канал), *Kcnj8* (Kir6.1 канал) и *Kcnq1* (Kv7.1 канал) не менялась. При обсуждении роли KCNQ (Kv7) каналов в развитии сердечно-сосудистых факторов риска, таких как гипертония, СД и ожирение [47] важно, что работа Kv7.1 каналов и характеристика тока через данный тип каналов могут модулироваться аксессуарной субъединицей MinK, однако ее роль в потенцировании нарушений физиологической функции миокарда до конца не ясна. Так, у собак в условиях аллоксанового СД1 в желудочках миокарда показано

увеличение уровня белка Kv7.1. при снижении MinK [48]. Однако у кролика в условиях аллоксанового СД1 при постоянстве активности Kv7.1 выявлено снижение количества белка MinK [9].

Таким образом, интегральная оценка активности ионных каналов, их насосной функции, а также экспрессии соответствующих генов требует учитывать региональную и/или клеточную специфику и ряд коэкспрессируемых вспомогательных факторов. В этой связи для понимания внутриклеточных процессов, протекающих в миокарде в условиях преддиабета и выраженного СД1, перспективным видится использование клеточных культур и переживающих срезов.

На основании полученных результатов сделаны выводы:

1. У крыс в миокарде левого желудочка при предСД1 и СД1 активность Na⁺/K⁺-АТФазы сохраняется стабильной относительно контрольного уровня. При этом уровень экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы, возрастает при предСД1, но снижается при СД1 относительно контрольного уровня. Это может указывать на высокую чувствительностью данного транспортёра к инсулинопениии.
2. Активность Ca²⁺-АТФазы и экспрессия гена *Atp2a2* у крыс в миокарде левого желудочка при предСД1 и СД1 стабильны, что может отражать ключевую роль данной АТФазы для сократительной функции кардиомиоцита.
3. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 в миокарде левого желудочка крыс возрастает при предСД1, но при СД1 не отличается от контрольного уровня, что может указывать на определенный вклад изученных подтипов калиевых каналов в адаптационный механизм к умеренной гипергликемии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. Г. Д. и О. В. Ч.), сбор и обработка данных (И. Б. С., О. В. Ч.), написание и редактирование манускрипта (И. Б. С., О. В. Ч., М. Г. Д.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания № 075–00264–24–00 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, протокол № 2–1/2022 от 24.02.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rosta K, Tulassay E, Enzsoly A, Ronai K, Szantho A, Pandics T, Fekete A, Mandl P, Ver A* (2009) Insulin induced translocation of Na⁺/K⁺-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 30: 1616–1624.
<https://doi.org/10.1038/aps.2009.162>
2. *Despa S* (2018) Myocyte [Na⁺]_i dysregulation in heart failure and diabetic cardiomyopathy. *Front Physiol* 9: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01303>
3. *Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR* (1997) Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem* 272: 23696–23702.
<https://doi.org/10.1074/JBC.272.38.23696>
4. *Zarain-Herzberg A, Garcia-Rivas G, Estrada-Avilés R* (2014) Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell Calcium* 56: 302–310.
<https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.09.005>
5. *Grandy SA, Trépanier-Boulay V, Fiset C* (2007) Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 293: 2168–2177.
<https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00521.2007>
6. *Сухов ИБ, Чистякова ОВ, Баюнова ЛВ, Шестакова НН* (2023) Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс. *Интегра́т физиол* 4: 69–78. [*Sukhov IB, Chistyakova OV, Bayunova LV, Shestakova NN* (2023) Evaluation of side effects of na-ca exchange inhibitor kb-r7943 used as an analgesic drug in diabetic neuropathy in rats. *Integrat fiziol* 4: 69–78. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78>
7. *Amione C, Giunti S, Fornengo P, Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Fuller JH, Barutta F, Gruden G, Bruno G* (2017) Incidence of prolonged QTc and severe hypoglycemia in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol* 54: 871–876.
<https://doi.org/10.1007/S00592-017-1018-6/TABLES/2>
8. *Inanir M, Gunes Y, Sincer I, Erdal E* (2020) Evaluation of electrocardiographic ventricular depolarization and repolarization variables in type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Cardiol* 114: 275–280.
<https://doi.org/10.36660/ABC.20180343>
9. *Zhang Y, Xiao J, Lin H, Luo X, Wang H, Bai Y, Wang J, Zhang H, Yang B, Wang Z* (2007) Ionic mechanisms underlying abnormal qt prolongation and the associated arrhythmias in diabetic rabbits: a role of rapid delayed rectifier K⁺ current. *Cell Physiol Biochem* 19: 225–238.
<https://doi.org/10.1159/000100642>
10. *Gallego M, Zayas-Arrabal J, Alquiza A, Apellaniz B, Casis O* (2021) Electrical features of the diabetic myocardium. arrhythmic and cardiovascular safety considerations in diabetes. *Front Pharmacol* 12: 687256.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.687256>
11. *Ozturk N, Uslu S, Ozdemir S* (2021) Diabetes-induced changes in cardiac voltage-gated ion channels. *World J Diabet* 12: 1–18.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i1.1>
12. *O'Connell KM, Whitesell JD, Tamkun MM* (2008) Localization and mobility of the delayed-rectifier K⁺ channel Kv2.1 in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(1): H229–H237.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01038.2007>
13. *Hedegaard ER, Johnsen J, Povlsen JA, Jespersen NR, Shanmuganathan JA, Laursen MR, Kristiansen SB, Simonsen U, Botker HE* (2016) Inhibition of KV7 Channels Protects the Rat Heart against Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther* 357(1): 94–102.
<https://doi.org/10.1124/jpet.115.230409>
14. *Morales-Cano D, Moreno L, Barreira B, Pandolfi R, Chamorro V, Jimenez R, Villamor E, Duarte J, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A* (2015) Kv7 channels critically determine coronary artery reactivity: left-right differences and down-regulation by hyperglycaemia. *Cardiovasc Res* 106(1): 98–108.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvv020>
15. *Qin D, Huang B, Deng L, El-Adawi H, Ganguly K, Sowers JR, El-Sherif N* (2001) Downregulation of K⁽⁺⁾ channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 549–553.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.4825>
16. *Huang B, Qin D, El-Sherif N* (2001) Spatial alterations of Kv channels expression and K⁽⁺⁾ currents in post-MI remodeled rat heart. *Cardiovasc Res* 52(2): 246–254.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00378-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00378-9)

17. *Yanni J, Tellez JO, Maczewski M, Mackiewicz U, Beresewicz A, Billeter R, Dobrzynski H, Boyett MR* (2011) Changes in ion channel gene expression underlying heart failure-induced sinoatrial node dysfunction. *Circ Heart Fail* 4(4): 496–508.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957647>
18. *Кубасов ИВ, Степанов АВ, Панов АА, Чистякова ОВ, Сухов ИБ, Добрецов МГ* (2021) Роль калиевых токов в формировании фазы следовой гиперполяризации внеклеточных потенциалов действия вентрикулярных кардиомиоцитов крысы в норме и при стрептозотоциновом сахарном диабете. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107: 1583–1596. [*Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG* (2021) Role of potassium currents in the formation of after-hyperpolarization phase of extracellular action potentials recorded from the control and diabetic rat heart ventricular myocytes. *Russ J Physiol* 107: 1583–1596. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813921120062>
19. *Gaber EM, Jayaprakash P, Qureshi MA, Parekh K, Oz M, Adrian TE, Howarth FC* (2014) Effects of a sucrose-enriched diet on the pattern of gene expression, contraction and Ca²⁺ transport in Goto-Kakizaki type 2 diabetic rat heart. *Exp Physiol* 99(6): 881–893.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.077594>
20. *Mandavia CH, Aroor AR, Demarco VG, Sowers JR* (2013) Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. *Life Sci* 92: 601–608.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2012.10.028>
21. *Sukhov IB, Chistyakova OV* (2022) Impact of intranasal insulin administration on Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-transporting system components in rat cardiomyocytes with type 1 diabetes mellitus. *J Biomed* 18: 52–62.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>
22. *Kubasov IV, Arutyunyan RS, Dobretsov MG, Shpakov AO, Matrosova EV* (2014) Effect of insulin on characteristics of contractile responses of fast and slow skeletal muscles of rats with acute streptozotocin-induced diabetes. *J Evol Biochem Physiol* 50: 136–145.
<https://doi.org/10.1134/S0022093014020069/METRICS>
23. *Dobretsov M, Backonja MM, Romanovsky D, Stimers JR* (2011) Animal models of diabetic neuropathic pain. *Neuromethods* 49: 147–169.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-880-5_9/TABLES/3
24. *Mendez N, Torres-Farfan C, Salazar E, Bascur P, Bastidas C, Vergara K, Spichiger C, Halabi D, Vio CP, Richter HG* (2019) Fetal programming of renal dysfunction and high blood pressure by chronodisruption. *Front Endocrinol* 10: 362.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00362>
25. *Galuska D, Kotova O, Barrès R, Chibalina D, Benziane B, Chibalin AV* (2009) Altered expression and insulin-induced trafficking of Na⁺-K⁺-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1): E38–E49.
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90990.2008>
26. *Yu Z, Liu J, Van Veldhoven JPD, Ijzerman AP, Schaliy MJ, Pijnappels DA, Heitman LH, De Vries AAF* (2016) Allosteric modulation of Kv11.1 (hERG) channels protects against drug-induced ventricular arrhythmias. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 9(4): e003439.
<https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003439>
27. *Alessandri-Haber N, Alcaraz G, Deleuze C, Jullien F, Manrique C, Couraud F, Crest M, Giraud P* (2002) Molecular determinants of emerging excitability in rat embryonic motoneurons. *J Physiol* 541: 25–39.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2001.013371>
28. *Liu X, Duan P, Hu X, Li R, Zhu Q* (2016) Altered KATP channel subunits expression and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with age. *J Cardiovasc Pharmacol* 68: 143–149.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000394>
29. *Zimmer J, Takahashi T, Hofmann AD, Puri P* (2017) Downregulation of KCNQ5 expression in the rat pulmonary vasculature of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 52: 702–705.
<https://doi.org/10.1016/J.JPESURG.2017.01.016>
30. *Hu W, Xu T, Wu P, Pan D, Chen J, Chen J, Zhang B, Zhu H, Li D* (2017) Luteolin improves cardiac dysfunction in heart failure rats by regulating sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a. *Sci Rep* 7: 41017.
<https://doi.org/10.1038/SREP41017>
31. *Bublitz M* (ed) (2016) P-Type ATPases. Springer. Humana New York, NY.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3179-8>
32. *Lucchesi PA, Sweadner KJ* (1991) Postnatal changes in Na, K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle: conservation of biphasic ouabain affinity. *J Biol Chem* 266: 9327–9331.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31589-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31589-8)
33. *Lytton J, Westlin M, Hanley MR* (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266: 17067–17071.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)47340-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)47340-7)

34. *Saborido A, Delgado J, Megías A* (1999) Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E-type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal Biochem* 268: 79–88. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3043>
35. *Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT* (2015) Thapsigargin – from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules* 20: 6113–6127. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20046113>
36. *Gerbi A, Barbey O, Raccah D, Coste T, Jamme I, Nouvelot A, Ouafik L, Lévy S, Vague P, Maixent JM* (1997) Alteration of Na, K-ATPase isoenzymes in diabetic cardiomyopathy: effect of dietary supplementation with fish oil (n-3 fatty acids) in rats. *Diabetologia* 40: 496–505. <https://doi.org/10.1007/S001250050707>
37. *Kato K, Lukas A, Chapman DC, Rupp H, Dhalla NS* (2002) Differential effects of etomoxir treatment on cardiac Na^{+} - K^{+} ATPase subunits in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 232: 57–62. <https://doi.org/10.1023/A:1014841216418>
38. *Vlkovičová J, Javorková V, Štefek M, Kysel'ová Z, Gajdošíková A, Vrbjar N* (2006) Effect of the pyridoinole antioxidant stobadine on the cardiac Na^{+} , K^{+} -ATPase in rats with streptozotocin-induced diabetes *Gen Physiol Biophys* 25(2): 111–124.
39. *Vér A, Szántó I, Bánász T, Csermely P, Végh E, Somogyi J* (1997) Changes in the expression of $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. *Diabetologia* 40: 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/S001250050818>
40. *Howarth FC, Parekh K, Jayaprakash P, Inbaraj ES, Oz M, Dobrzynski H, Adrian TE* (2017) Altered profile of mRNA expression in atrioventricular node of streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Med Rep* 16(4): 3720–3730. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7038>
41. *Chistyakova OV, Sukhov IB, Kubasov IV, Dobretsov MG* (2020) The study of rat myocardial Na/K -ATPase activity in experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 56: 166–168. <https://doi.org/10.31857/S0044452920020047>
42. *Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Jonathan Lederer W, Matlib MA* (2002) Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(4): H1398–H1408. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00313.2002>
43. *Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA* (2001) Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1137–H1147.
44. *Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG* (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77: 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.005>
45. *Wang M, Zhang WB, Zhu JH, Fu GS, Zhou BQ* (2010) Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca^{2+} -cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol* 47 Suppl 1: 209–218. <https://doi.org/10.1007/s00592-009-0164-x>
46. *Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T* (2004) Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 261(1–2): 245–249. <https://doi.org/10.1023/b: mcbi.0000028762.97754.26>
47. *Fosmo AL, Skraastad ØB* (2017) The Kv7 channel and cardiovascular risk factors. *Front Cardiovasc Med* 4: 314626. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2017.00075/BIBTEX>
48. *Lengyel C, Virág L, Biró T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, Kocsis E, Skoumal R, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JG, Varró A* (2007) Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res* 73(3): 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.010>

STUDY OF Na⁺/K⁺-ATPase AND COMPONENTS OF THE Ca²⁺-TRANSPORTING SYSTEM IN MYOCARDIUM UNDER EXPERIMENTAL PREDIABETES AND TYPE1 DIABETES IN RATS**I. B. Sukhov^{a,*}, O. V. Chistyakova^a, and M. G. Dobretsov^a**

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

** e-mail: sukhov.ivan@gmail.com*

One of the complications of diabetes mellitus (DM) is diabetic cardiomyopathy (DCM), the molecular mechanisms of pathogenesis of which have not been fully studied. Previously, the involvement of Na⁺/K⁺-ATPase and components of the Ca²⁺ transport system in cardiomyocytes in the development of DCM was shown. The aim of the work was to study the expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in the myocardium of male Wistar rats in a model of streptozotocin (STZ)-induced prediabetes and overt type 1 diabetes (T1DM). STZ was administered at once i.p. in dose of 30–35 mg/kg. Rats with glucose levels above 11 mM were considered diabetic (STZ-D1 group), and those with moderate hyperglycemia were considered prediabetic (STZ-preD1 group). The activity of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase was determined (by the rate of release of inorganic phosphate, Pi), and the expression of the genes α 1- and α 2-isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase, SERCA2 and Kir6.1, Kv7.1 and Kv2.1 potassium channels. In the control (C) group, the activity of Mg²⁺-dependent ATPase (α 1- and α 2-isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase), sensitive to 1 mM ouabain, was 6.03±0.6 mmol Pi/g/h. In the STZ-D1 and STZ-preD1 groups, Na⁺/K⁺-ATPase activity did not differ from group C. The level of gene expression of α 1- and α 2- subunits of Na⁺/K⁺-ATPase in the STZ-D1 group decreased by more than 45%, then both in the STZ-preD1 group increased by 64 and 81%, which may indicate a high sensitivity of expression to insulinopenia. The activity of Ca²⁺-ATPase and the expression of the SERCA2 gene did not differ between the groups – probably, the 4-week period after STZ administration is not sufficient for the development of Ca²⁺-ATPase deficiency in the rat heart. The level of expression of the genes of the potassium channel subtypes Kv2.1, Kir6.1 and Kv7.1 increased in the STZ-preD1 group, which may indicate a certain contribution of the studied potassium channel subtypes to the adaptation mechanism to moderate hyperglycemia.

Keywords: diabetes mellitus, prediabetes, diabetic cardiomyopathy, Na⁺/K⁺-ATPase, SERCA2, insulin, rat