

**ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ
ДЕЙСТВИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ РАЗВИТИИ
СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА**

© 2020 г. **И. В. Кубасов^{1,*}, О. В. Чистякова¹, И. Б. Сухов¹,
А. А. Панов¹, М. Г. Добрецов¹**

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

**E-mail: kubasov_igor@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 05.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

С использованием метода внеклеточной микроэлектродной регистрации (loose patch метод) были исследованы левые желудочки изолированных сердец контрольных крыс ($n = 7$) и крыс, инъецированных стрептозотоцином в дозе 30–45 мг/кг массы тела (СТЗ крысы, $n = 21$). Через 4 нед. после инъекции стрептозотоцина сахарный диабет развился у 3-х крыс (СТЗ-СД крысы; содержание случайной глюкозы в крови больше 11 мМ). Оставшиеся 18 крыс сохранили нормогликемию (СТЗ-НГ; уровень случайной глюкозы в крови меньше 11 мМ). Было показано, что в сердцах как контрольных, так и СТЗ крыс регистрируются два типа внеклеточно регистрируемых потенциалов действия: сигналы, представленные одним или двумя негативными пиками (ПД1 и ПД2 соответственно). Временные характеристики ПД1 были сходны во всех исследованных группах животных. Однако время полуспада ПД2, регистрируемых от СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс, статистически значимо превышали аналогичные значения ПД2 контрольных животных. В 28% СТЗ-НГ и 67% СТЗ-СД сердец крыс дополнительно регистрировались аномальные потенциалы действия 3-го типа (ПД3). Их характерной особенностью была затянутая во времени и сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из трех-четырёх пиков, и присутствие выраженной фазы следовой гиперполяризации. Появление ПД3 было связано с уменьшением числа регистрируемых ПД2 (с 80–85% до 55–60%). Встречаемость ПД1 оставалась постоянной (15–20%), вне зависимости от присутствия или отсутствия ПД3. Предположительно, наблюдаемые электрофизиологические изменения связаны с ремоделированием Т-системы вентрикулярных кардиомиоцитов СТЗ животных. Вне зависимости от справедливости данного предположения, представляется важным, что начало изменений в электрогенезе кардиомиоцитов фиксируется не только у СТЗ-СД крыс, но и у СТЗ-НГ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови, что соответствует стадии раннего предиабета.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, предиабет, диабетическая кардиомиопатия, кардиомиоцит, потенциал действия, Т-система

DOI: 10.31857/S0869813920100052

Сахарный диабет (СД) является самым распространенным метаболическим заболеванием в мире, а диабетическая кардиомиопатия – ведущей причиной сердечной недостаточности и высокой смертности среди пациентов с СД [1–3]. Риск сер-

дечной недостаточности начинает нарастать с самых ранних стадий СД, что, основываясь на имеющихся данных литературы, может быть связано со структурно-функциональными изменениями в Т-системе кардиомиоцитов. Т-система представляет собой сеть поперечных инвагинаций поверхностной мембраны миоцита внутрь клетки (t-трубочки), обеспечивающих синхронность и мощность мышечного сокращения. Так, существует множество подтверждений того, что структурные (дилатация t-трубочек и закрытие их выходов на поверхность клетки) и функциональные (изменение в активности специфических для t-трубочек ионных каналов и транспортеров) нарушения в Т-системе представляют универсальную и раннюю стадию патогенеза кардиомиопатий различной этиологии, в том числе и диабетической [4–11]. По крайней мере по двум причинам вопрос о действительной роли перестроек в Т-системе кардиомиоцитов в развитии диабетической кардиомиопатии остается открытым. Во-первых, это связано со сложностями функциональных исследований (изучение активности ионных каналов и транспортеров мембраны t-трубочек) в этом компартменте кардиомиоцита. Рутинно используемые электрофизиологические регистрации с помощью крупных внеклеточных электродов и внутриклеточные регистрации характеризуют интегральную электрическую активность агломератов клеток или всей цитоплазматической мембраны клетки соответственно без возможности дискриминации электрогенных механизмов, локализованных в поверхностной мембране и в мембране Т-системы кардиомиоцита. Кроме того, эксперименты с внутриклеточной регистрацией токов или потенциалов обычно проводятся на изолированных из нормального окружения клетках сердца, что еще более ограничивает интерпретацию результатов этих исследований. Оптико-флуоресцентные исследования с использованием потенциалчувствительных мембранных красителей также требуют изоляции клеток и трудоемки [12]. Во-вторых, хотя клинические данные строго указывают на то, что патогенез диабетической кардиомиопатии начинается на доклинических стадиях СД (предиабет) [11, 13], кардиология этих стадий практически не изучена на соответствующих животных моделях.

С учетом вышесказанного, основная фундаментальная задача предлагаемого исследования состояла в получении данных о функциональных изменениях в t-трубочках кардиомиоцитов в составе изолированного сердца крысы на ранних (1 мес.) сроках стрептозотоцинового диабета и предиабета (последний был определен как состояние нормогликемии или умеренной гликемии, уровень случайной глюкозы на момент начала экспериментов не достигающий 11 мМ). Для дискриминационного анализа электрогенеза поверхностной мембраны и мембраны t-трубочек кардиомиоцитов использовался апробированный нами ранее метод внеклеточной регистрации потенциалов действия (ПД) с использованием стеклянных электродов с тонким кончиком (loose patch метод). Ранее в данной методике с использованием фармакологических и оптико-флуоресцентных методов, а также компьютерно-графического моделирования было выявлено 2 типа внеклеточно регистрируемых ПД в желудочках крысы. ПД 1-го типа (быстрые однопиковые ответы) регистрировались в участках мембраны кардиомиоцитов, не содержащих выходов устьев t-трубочек и формировались, в основном, за счет натриевых токов. ПД 2-го типа представляли собой ответы с двумя выраженными пиками, формируемыми как натриевыми токами наружной мембраны, так и кальциевыми токами мембраны тубулярного компартмента [12, 14]. В соответствии с этим выбранный метод позволяет достаточно просто охарактеризовать и выполнить первичный анализ изменений в электрогенезе t-трубочек по форме ПД2.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего было исследовано 28 крыс (самцы линии Вистар, масса 230–430 г, возраст 3–6 мес.). Из них 21-й особи случайно выбранных крыс был инъецирован панкреатический токсин – стрептозотозин (СТЗ, СТЗ группа), растворенный в цитратном буфере (рН 6.0, интраперитонеально в дозе 30–45 мг/кг массы тела), а оставшиеся 7 животных получили инъекцию эквивалентного объема буфера (контроль). Диабетический статус животных определялся на основании измерений в крови уровня случайной глюкозы (СГ), определяемого независимо от времени предыдущего приема пищи в последний, 28-й день эксперимента. Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания).

Электрофизиологические эксперименты проводили на левых желудочках (ЛЖ) изолированных сердец крыс в условиях сохраненного синусового ритма, при постоянной перфузии аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа. Животных анестезировали с помощью раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего сердце извлекали и помещали на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой микроэлектродной регистрации [12]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный раствор Тироде следующего состава (в мМ): 140 NaCl, 4.5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 глюкоза, рН 7.2–7.4. Устранение сократительных ответов сердца обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФ-азы 2,3-бутандион монооксида в концентрации 20 мМ. В течение эксперимента температуру перфузирующего раствора поддерживали на постоянном уровне (36–37°C) с помощью автоматического контроллера TC-324 (Warner Instruments, США). Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществляли через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору.

Для изготовления микроэлектродов с наружным диаметром кончика ~5.0 мкм использовали боросиликатные стеклянные капилляры BF150-86-10 и программируемый пуллер (модель P-1000, Sutter Instruments, США). Сопротивление кончика микроэлектрода, заполненного раствором Тироде, составляло около 2 МОм. Микроэлектрод, подключенный к входу усилителя АМ-1500 (National Instruments, США), подводили к поверхности сердца при помощи микроманипулятора Sepsarex (Финляндия). Запись данных, хранение и обработку производили при помощи аналого-цифрового преобразователя NIUSB-6211 (National Instruments, США) и программного пакета Clampfit и Origin-7.5. При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода с поверхностью желудочка сердца регистрировали авторитмические систолические внеклеточные ПД с частотой в диапазоне 0.3–1 Гц. Длительность непрерывной регистрации ответов от конкретного сайта по времени могла составлять более часа. После регистрации 10–20-ти последовательных внеклеточных ПД кардиомиоцитов от данного сайта кончик микропипетки перемещали с шагом 50–100 мкм в соседний сайт данного локуса поверхности желудочка. Размер каждого локуса составлял ~500 × 500 мкм. В среднем в каждом эксперименте выполнялось картирование 5–10 локусов с аналогичным числом регистрируемых сайтов в пределах исследуемого локуса. Длительность восходящей фазы (Тв) сигналов измерялась от базовой линии до вершины их первого негативного (и в случае простых сигналов единственного) пика. Параметры реполяризации сложных сигналов (Т50 и Т90), содержащих два или более негативных пиков, всегда были измерены в отношении последнего из этих пиков. Соответственно на всех рисунках представлены ПД, нормализованные к амплитуде их негативного пика или последнего из негативных пиков. Схема измерения и типичные примеры записей нормализованных внеклеточных ПД, полученных от различных сайтов в одном из

локусов левого желудочка контрольного сердца, представлены на рис. 1. Полученные данные проверяли на нормальность распределения (критерий Шапиро–Уилка). Последующий статистический анализ проводили в соответствии с результатами этой проверки, используя параметрические или непараметрические тесты. Статистически значимыми считали различия данных при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

До начала эксперимента для всех 28 исследованных животных средняя величина содержания случайной глюкозы ($СГ_0$) в крови составляла 5.4 ± 0.1 мМ. $СГ_{28}$, глюкоза, измеренная на последний, 28-й день эксперимента в контрольной группе животных не отличалась от $СГ_0$, составляя в среднем 5.4 ± 0.2 мМ ($n = 7$). Используя 11.1 мМ $СГ$ как нижний предел для определения СД, только 3 из 21 СТЗ крысы (14%) развили СД и были отнесены к группе СТЗ-СД крыс. Остальные СТЗ крысы составляли группу, в которой $СГ_{28}$ колебалась в пределах значений, характерных для нормогликемии и умеренной гипергликемии (5.6–7.1 мМ, нижний и верхний 95%-ный доверительный интервалы). Эти животные были отнесены к группе СТЗ-нормогликемичных крыс (СТЗ-НГ). Средние значения $СГ_{28}$ СТЗ-СД и СТЗ-НГ крыс составляли 22 ± 4 ($n = 3$) и 6.4 ± 0.4 мМ ($n = 18$) соответственно. Только СТЗ-СД группа достоверно отличалась от контроля по этому параметру (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки для множественных сравнений; величины $СГ_{28}$ были нормально распределены в контрольной и СТЗ-НГ группах, и их нормальное распределение было предположено для маленькой по объему СТЗ-СД выборки).

В электрофизиологических экспериментах внеклеточные ПД, регистрируемые от вентрикулярных кардиомиоцитов сердца контрольных крыс, представляли собой сигналы двух типов. Первый тип сигналов (ПД1 сигнал, характеризующийся наличием одного быстрого негативного пика), встречался относительно редко (рис. 1В, а, левый трек, 15% регистраций). Значительно чаще регистрировались ПД 2-го типа (ПД2, 85% регистраций), которые характеризовались наличием двух выраженных негативных пиков: первого – быстрого, и второго – сильно варьирующего от сайта к сайту как по амплитуде, так и по длительности пика (рис. 1А, b, c).

Как и в контрольных экспериментах, в большинстве экспериментов на сердцах СТЗ животных, выполненных через 1 мес. после инъекции СТЗ (25 крыс), единственными регистрируемыми сигналами были ПД1 и ПД2. Временные характеристики ПД1 (время развития до пика или длительность восходящей фазы, T_w), время реполяризации до 50 (T_{50}) и 90 (T_{90}) % от пика к базовой линии и процент встречаемости этих сигналов не различались между контрольными, СТЗ-НГ, и СТЗ-СД животными. Процентное соотношение регистрируемых ПД1 и ПД2 также было сходно между этими группами животных. Интересно, что длительность реполяризации ПД2 у СТЗ-НГ (T_{50}) и СТЗ-СД (T_{50} и T_{90}) были достоверно больше, чем соответствующие характеристики ПД2 контрольных крыс (табл. 1).

В ярко выраженном различии с контрольными крысами у части СТЗ-НГ и еще чаще у СТЗ-СД крыс, наряду с описанными выше ПД1 и ПД2 (рис. 2А, В) регистрировались также аномальные внеклеточные ПД, характерной особенностью которых была затянутая во времени и сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из трех–четырёх пиков – ПД 3-го типа (ПД3, рис. 2С).

Такие аномальные ПД3 были зарегистрированы у 5-ти из 18-ти исследованных СТЗ-НГ крыс и у двух из трех исследованных сердец СТЗ-СД животных (28 и 67% соответственно), но ни в одном из сердец контрольных крыс (табл. 2).

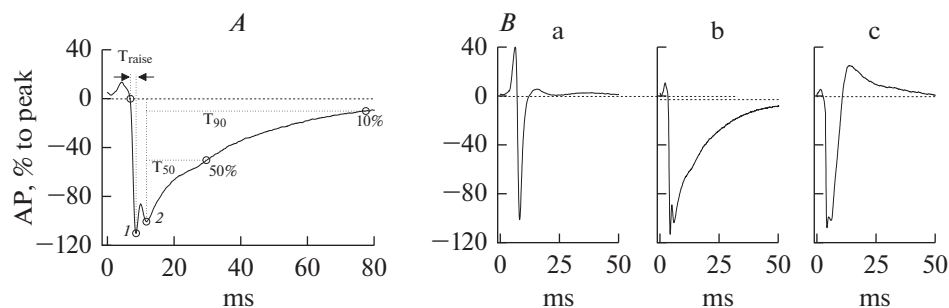


Рис. 1. Иллюстрация измерения временных параметров внеклеточных ПД (A) и примеры вариации формы ПД (B, a–c), зарегистрированных в разных сайтах одного локуса левого желудочка одного сердца контрольной крысы.

Схема измерения временных параметров ПД (A) дана на примере сигнала с двумя негативными пиками (метки 1 и 2). Длительность восходящей фазы сигнала измерена от начала первого негативного пика сигнала (точка пересечения сигнала с базовой линией – горизонтальная штриховая линия) до вершины этого пика (T_{raise}). Полуспад (T₅₀) и спад сигнала до 10% (T₉₀) от исходной величины рассчитаны по отношению к пиковой величине второго (последнего для данного ПД) негативного пика сигнала.

Fig. 1. Measurement of temporal characteristics of extracellular AP (A) and examples of variability of AP waveforms (B, a–c) recorded from different sites within a given locus of the left ventricle of given control rat heart. Schematic representation of measurement of temporal characteristics of AP (A) is given using AP waveform having two distinct negative peaks (labels 1 and 2). Duration of the signal raising time (T_{raise}) is determined as the time from the onset (intersection with the baseline- horizontal dashed line) to the top of the signal waveform's first negative peak. Times to the 50% (T₅₀) and 90% (T₉₀) decay are measured with respect to the second (and last for the given AP) negative peak of the signal waveform.

Кроме того, сравнение значений, приведенных в табл. 1 и 2, показывает, что появление ПД3 в регистрациях в сердцах СТЗ-НГ и СТЗ-СД происходит в основном за счет сокращения доли регистрируемых в этих сердцах ПД2 (с 80–84% до 54–58%), тогда как фракция ПД1 остается практически неизменной (15–20%). Обращает также на себя внимание и то, что T₅₀ ПД2 и ПД3 во всех рассмотренных группах СТЗ-НГ и СТЗ-СД всегда достоверно превышает T₅₀ ПД2 контрольных животных (9.4 ± 0.4) в 1.5–2 раза, а T₉₀ в большинстве групп животных либо превышает, либо достоверно не отличается от соответствующего параметра в контроле. Однако это не так в случае с T₉₀ ПД3 СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс. По сравнению с T₉₀ у ПД2 контрольных крыс T₉₀ ПД3 СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс короче примерно на 30 и 50% соответственно (в последнем случае различия статистически достоверны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Патогенез диабетической кардиомиопатии остается малоизучен. Развившиеся хроническую гипергликемию после инъекции панкреатического токсина СТЗ грызуны представляют собой классическую модель первого типа (инсулин-зависимого СД), позволяя изучать многие осложнения диабета этого типа [15]. В том числе эти животные развивают и многие признаки диабетической кардиомиопатии, включая нарушения в электрической активности кардиомиоцитов [16]. В этом отношении абсолютно новым результатом нашей работы представляется документация изменений в электрогенезе кардиомиоцитов не только у СТЗ-СД крыс, но и у

Таблица 1. Параметры ПД1 и ПД2, регистрируемых в экспериментах, где наблюдались только эти два типа сигналов

Table 1. Parameters of AP1 and AP2 recorded in experiments in which no other types of signals were observed

Отношение числа животных, где единственными регистрируемыми сигналами были ПД1 и ПД2, к общему количеству животных в исследуемой группе Number of experiments in which AP1 and AP2 were the only recorded signals/total number of animals studied within given group	ПД1 % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP1 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms	ПД2 [§] % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP2 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms
Контроль 7/7 крыс, 340 регистраций ПД Control 7/7 rats 340 AP recordings	16% Тв 2.4 ± 0.3 Т ₅₀ 3.9 ± 0.2 Т ₉₀ 7.7 ± 0.2	84% Тв 4.1 ± 0.2 Т ₅₀ 9.4 ± 0.4 Т ₉₀ 31.6 ± 1.3
СТЗ-НГ 13/18 крыс, 261 регистраций ПД STZ-NG 13/18 rats 261 AP recordings	18% Тв 2.9 ± 0.3 Т ₅₀ 3.8 ± 0.2 Т ₉₀ 7.0 ± 0.2	82% Тв 4.6 ± 0.3 Т ₅₀ 12.1 ± 0.7* Т ₉₀ 34.1 ± 1.8
СТЗ-СД 1/3 крыса 53 регистраций ПД STZ-DM 1/3 rats 53 AP recordings	20% Тв 2.9 ± 0.7 Т ₅₀ 4.0 ± 0.5 Т ₉₀ 6.7 ± 0.5	80% Тв 5.4 ± 0.8 Т ₅₀ 18.5 ± 2.2* Т ₉₀ 48.9 ± 6.2*

* – достоверность отличия средних значений по выборке от контроля (дисперсионный анализ Крускала и Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений);

[§] – параметры реполяризации сложных сигналов (Т₅₀ и Т₉₀), содержащих два или более негативных пиков всегда измерены в отношении последнего из этих пиков.

* – indicate statistically significant difference of the group mean value from control (Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by the Dunn’s multiple comparisons test);

[§] – characteristics of repolarization (Т₅₀ и Т₉₀) of signals having two or more negative peaks are measured with respect of the last of these peaks.

СТЗ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови – состояние, которое соответствует стадии предиабета [15].

Внеклеточные ПД кардиомиоцитов регистрировали в этой работе с использованием стеклянных электродов с тонким (5 мкм) кончиком. В соответствии с нашими предыдущими исследованиями с использованием этого метода [12], в сердцах контрольных животных регистрировались сигналы двух, различных по количеству негативных пиков, типов ПД: ПД1 и ПД2. Все имеющиеся данные, касающиеся техники внеклеточной регистрации, структурной организации Т-системы кардиомиоцитов желудочков сердца и распределения различных ионных каналов и электрогенных транспортеров в поверхностной мембране и в мембране Т-системы кардиомиоцита (см. детали в [12]), свидетельствуют в пользу того, что тип внеклеточно регистрируемых ПД (в наших условиях) определяется, в основном, позицией кончика регистрирующего электрода на поверхности кардиомиоцита по отношению к позиции выходов (устьев) t-трубочек. А именно, ПД1 регистрируются в тех случаях, когда электрод был помещен в локус клетки, не содержащий устьев t-трубочек, и, соответственно, его основной негативный пик формируется токами, генерируемыми электрогенными механизмами поверхностной мембраны клетки: в основ-

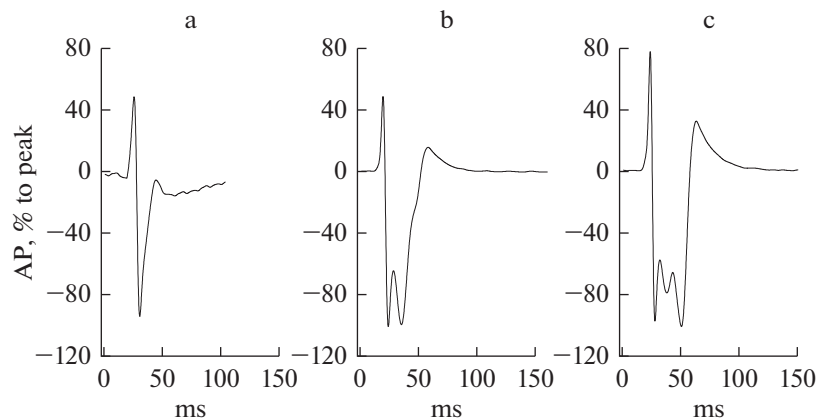


Рис. 2. Примеры индивидуальных записей ПД 1-го (А), 2-го (В) и 3-го (С) типов, полученных от различных сайтов в пределах одного локуса на поверхности левого желудочка СТЗ-НГ крысы.

Fig. 2. Examples of individual recordings of type 1 (A), 2 (B) and 3 (C) AP waveforms obtained in different sites within a single locus on the surface of left ventricle of STZ-NG rat.

ном, натриевым и калиевым токами через соответствующие потенциал-чувствительные каналы. В том же случае, если кончик регистрирующей пипетки перекрыл территорию поверхности миоцита, содержащую одно или более устьев *t*-трубочек, регистрируется более сложный ПД2 сигнал, в котором присутствие второго негативного пика отражает активность электрогенных механизмов, локализованных в мембране Т-системы кардиомиоцита. Это в первую очередь Ca^{2+} -каналы L-типа, Na^{+} – Ca^{2+} -обменник и некоторые подтипы K^{+} -каналов [17, 18]. В связи с этой интерпретацией интересно, что, согласно полученным результатам, именно временные характеристики ПД2, но не ПД1, оказываются измененными в кардиомиоцитах сердец СТЗ-СД и СТЗ-НГ крыс. Так, сбалансированная активность электрогенных механизмов именно Т-системы представляется более чувствительной к диабетическому и/или преддиабетическому состоянию крысы, чем поверхностной мембраны кардиомиоцитов. Работа каких конкретно ионных механизмов претерпевает изменения, приводя к продлению спада ПД2, остается еще выяснить. Однако подобный феномен наблюдался и в исследованиях с внутриклеточной регистрацией ПД кардиомиоцитов, изолированных из сердец крыс с 1–4-х недельным СТЗ-СД. В этих исследованиях затягивание спада внутриклеточно регистрируемых ПД было отнесено к инсулиновой недостаточности и связанным с ней подавлению выходящих калиевых токов задержанного выпрямления: I_{to} (transient outward), I_{ss} (steady-state) и I_K (fast and slow delayed rectifiers) [19–22]. Все эти токи принимают участие в регуляции длительности плато ПД и реполяризации кардиомиоцита. Интересно также, что существуют свидетельства преимущественной локализации каналов, ответственных за эти токи в Т-системе кардиомиоцита [17, 18]. Этот механизм хорошо подходит и для объяснения наших данных – затягивание спада ПД2 при отсутствии изменения во временных параметрах ПД1, зависимость которых от электрогенеза Т-системы должна быть минимальна. Важной находкой нашего исследования является регистрация в сердцах СТЗ-НГ и еще чаще в сердцах СТЗ-СД крыс аномальных внеклеточных ПД, которые никогда не встречаются в исследованиях контрольных сердец (ПД-3-го типа, рис. 2). Характерной особенностью ПД3 является сложная негативная фаза, представляющая собой агломерат из по крайней мере

Таблица 2. Параметры ПД, регистрируемых в экспериментах, в которых в дополнение к ПД1 и ПД2 встречался также и ПД3-тип сигналов
Table 2. Parameters of APs, recorded in experiments, in addition to AP1 and AP2, type 3 waveform-signals (AP3) could be recorded

Эксперименты с регистрацией ПД1, ПД2 и ПД3 типа сигналов Experiments in which all three types of APs were recorded/total number of animals per group	ПД1 % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP1 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms	ПД2 [§] % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP2 % of total number of recording and temporal signal characteristics, ms	ПД3 [§] % к общему числу регистраций и временные параметры, мс AP3 % of total number of recordings and temporal signal characteristics, ms
СТЗ-НГ 5/18 крыс 134 регистрации ПД STZ-NG 5/18 rats 134 AP recordings	21% Тв 2.7 ± 0.4 Т ₅₀ 3.2 ± 0.4 Т ₉₀ 7.9 ± 0.3	54% Тв 3.9 ± 0.4 Т ₅₀ 15.1 ± 1.0* Т ₉₀ 32.2 ± 1.9	25% Тв 2.2 ± 0.2* Т ₅₀ 15.1 ± 1.3* Т ₉₀ 22.5 ± 1.3
СТЗ-СД 2/3 крыс 141 регистрация ПД STZ-DM 2/3 rats 141 AP recordings	15% Тв 2.8 ± 0.6 Т ₅₀ 3.9 ± 0.4 Т ₉₀ 6.8 ± 0.5	58% Тв 4.3 ± 0.4 Т ₅₀ 16.8 ± 1.3* Т ₉₀ 37.1 ± 3.5	27% Тв 2.9 ± 0.3 Т ₅₀ 10.1 ± 0.8 Т ₉₀ 15.7 ± 1.2*

* – достоверность отличия средних значений по выборке от контроля (см. табл. 1). Параметры ПД3 сравнены с соответствующими параметрами ПД2 контрольных крыс (дисперсионный анализ Крускала и Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений);

§ – параметры реполяризации сложных сигналов (Т₅₀ и Т₉₀), содержащих два или более негативных пиков, всегда измерены в отношении последнего из этих пиков.

* – indicate statistically significant difference between given group and control AP2 group mean values (see Table 1; Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by the Dunn’s multiple comparisons test);

§ – characteristics of repolarization (Т₅₀ и Т₉₀) of signals having two or more negative peaks are measured with respect of the last of these peaks.

трех выраженных пиков, и постоянное присутствие отчетливой позитивной фазы пост-гиперполяризации, ведущей, в частности, к укорочению Т₉₀ ПД3 сигналов. Появление ПД3 в регистрациях в сердцах СТЗ-НГ и СТЗ-СД крыс сопровождается сокращением доли регистрируемых в этих сердцах ПД 2-го типа (с 80–86 до 25–27%), тогда как фракция ПД1 остается практически неизменной (14–21%). Это означает, что число выходов устьев t-трубочек на поверхность кардиомиоцита на данном этапе развития диабета (1 мес.) не меняется. Однако дезорганизация тубулярной системы может начинаться с нижележащих отделов t-трубочек и отражается в появлении характерных аномальных ПД 3-го типа, не встречающихся в контроле. При этом значительная часть подобных изменений наблюдается и у нормогликемических крыс (СТЗ-НГ группа), когда СД не развился до клинических значений. Такую группу можно охарактеризовать как предиабетическую. Как альтернативный вариант, приведенные факты могут указывать и на то, что функциональные изменения тубулярной мембраны могут опережать структурные. Исходя из этого, есть основания полагать, что ПД 3-го типа представляют собой трансформацию ПД 2-го типа и, соответственно, результат дальнейшего ремоделирования Т-системы кардиомиоцитов. Появление дополнительного негативного пика при предполагаемой трансформации ПД2 в ПД3 очень напоминает феномен так называемой ранней пост-деполяризации (early afterdepolarization, EAD) или вторичной деполяризации, непосредственно предшествующей окончательной реполяризации клетки при ряде сердечных патологий. По мнению многих авторов, этот клеточный феномен является результатом реактивации Ca²⁺-каналов кардиомиоцитов и пред-

вестником развития желудочковой тахикардии. Подавление выходящего K^+ -тока с последующим замедлением реполяризации клетки вполне может создать все необходимые условия для возникновения таких регенеративных волн Ca^{2+} -тока [23, 24].

Другой феномен, электрогенез которого требует отдельного анализа – это следовая гиперполяризация, которая выражена в части ПД2 нормальных кардиомиоцитов (рис. 1В, С) и универсально присутствует во всех ПД2 и ПД3 в СТЗ группах (рис. 2). Эту фазу обычно связывают с активацией K^+ -каналов и, хотя и в меньшей мере, с активацией других механизмов следовой гиперполяризации, таких как активность хлорных каналов, электрогенный транспорт ионов Na , K -АТФазой или натрий-кальциевым обменником (в реверсированной модальности) [23]. Что касается роли калиевых каналов, здесь надо учесть два момента. Первое, как обсуждалось выше, по крайней мере три типа калиевой проводимости подавлены в сердцах грызунов с экспериментальным диабетом: I_{to} , I_{ss} и I_K (fast and slow delayed rectifiers) [19–22]. Второе, в нормальных условиях мембранный потенциал покоя и потенциал реверсии для K^+ кардиомиоцитов очень близки друг к другу и, по крайней мере в отношении к кардиомиоцитам сердца крысы, кратковременный (1–4 нед.) СД не изменяет этого баланса [19, 25]. Таким образом, какое-либо существенное участие активации K^+ -проводимости в формировании следовой гиперполяризации представляется маловероятным. Одновременно с этим показано, что у диабетических крыс дополнительно экспрессируются медленные Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы с малой проводимостью (SK) [26]. SK экспрессируются в сердце в виде 3-х изоформ – SK1, SK2, SK3 [27]. Ток через эти каналы (IKCa) не зависит от напряжения, активируется внутриклеточным Ca^{2+} (0.6–0.7 мМ) [28] и избирательно блокируется апамином – белком, входящим в состав пчелиного яда [29]. Значение и роль SK в реполяризации остаются недостаточно изученными, а имеющиеся данные – противоречивыми. Например, IKCa в вентрикулярных миоцитах укорачивает реполяризацию и способствует перифарктной аритмии у крыс [30]. И наоборот, блокада IKCa способствует желудочковой аритмии с сердечной недостаточностью как у человека, так и у ряда животных моделей [31], включая кролика [32]. Из оставшихся возможностей гиперактивация АТФ-зависимого K^+ канала, связанная с истощением клеточных запасов АТФ, также представляется как заслуживающая внимательного рассмотрения.

Следует отметить, однако, что приведенные выше данные были получены в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах, что ставит вопрос о селективном отборе во время процедуры изоляции наиболее “здоровых”, включая способность к поддержанию нормальных ионных градиентов, клеток. Действительно, СТЗ-диабет ведет к практически двукратному снижению выживаемости вентрикулярных миоцитов крысы при их энзиматической изоляции [33]. Вне сомнения, с этой точки зрения эксперименты на препарате интактного сердца более представительны, чем эксперименты, использующие культуру клеток.

В заключение, полученные результаты демонстрируют, что краткосрочный СД 1-го типа приводит к увеличению длительности внеклеточных ПД2 и появлению аномальных ПД3, регистрируемых от эпикардиальных миоцитов сердца крыс. Более того, подобные электрофизиологические отклонения обнаруживаются уже в исследованиях сердец СТЗ животных с нормальным или умеренно повышенным уровнем глюкозы в крови. Последнее предполагает, что патогенез сердечных осложнений СД может начинаться во время предиабета, и хроническая гипергликемия не является единственным этиологическим фактором этих осложнений. Роль преходящей гипергликемии и/или умеренной инсулиновой недостаточности требует дальнейшего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-015-00139 при частичной поддержке государственного задания № 075-00776-19-02.

СБЛЮДЕНИЕ 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. Дедов И.И., Александров А.А. Диабетическое сердце: *causa magna*. Сердце: журн. для практикующих врачей. 3(1): 5–8. 2004. [Dedov I.I., Alexandrov A.A. Diabetic Heart: *causa magna*. Heart: J. Pract. Physicians. 3(1): 5–8. 2004 (In Russ)].
2. Калашников В.Ю., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Бондаренко И.З., Шестакова М.В., Дедов И.И. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом, по данным федерального регистра Российской Федерации (2013–2016 гг.). Сахарный диабет. 22(2): 105–114. 2019. [Kalashnikov V.Y., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Isakov M.A., Bondarenko I.Z., Shestakova M.V., Dedov I.I. Epidemiology of cardiovascular diseases among patients with Diabetes Mellitus according to the Federal Diabetes Register of the Russian Federation (2013–2016). Diabetes Mellitus. 22(2): 105–114. 2019. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/DM10167>
3. Малишевская А.С. Сахарный диабет 1 типа и сердечная недостаточность. Мед. наука и образование Урала. 19(2): 172–177. 2018. [Malishevskaya A.S. Type 1 Diabetes Mellitus and cardiac failure. Med. Sci. and Education of Ural. 19(2): 172–177. 2018 (In Russ)].
4. Celentano A., Vaccaro O., Tammaro P., Galderisi M., Crivaro M., Oliviero M., Imperatore G., Palmieri V., Iovino V., Riccardi G., de Divitiis O. Early abnormalities of cardiac function in non-insulin-dependent diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. Am. J. Cardiol. 76: 1173–1176. 1995.
5. Ren J., Sowers J.R., Walsh M.F., Brown R.A. Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H1708–H1714. 2000.
6. Belke D.D., Swanson E.A., Dillmann W.H. Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic db/db Mouse Heart. Diabetes 53: 3201–3208. 2004.
7. Giunti S., Bruno G., Veglio M., Gruden G., Webb D.J., Livingstone S., Chaturvedi N., Fuller J.H., Perin P.C. Electrocardiographic Left Ventricular Hypertrophy in Type 1 Diabetes. Diabetes Care. 28: 2255–2257. 2005.
8. Kralik P.M., Ye G., Metreveli N.S., Shem X., Epstein P.N. Cardiomyocyte dysfunction in models of type 1 and type 2 diabetes. Cardiovasc. Toxicol. 5: 285–292. 2005.
9. Castagno D., Baird-Gunning J., Jhund P.S., Biondi-Zoccai G., MacDonald M.R., Petrie M.C., Gaita F., McMurray J.J. Intensive glycemic control has no impact on the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: evidence from a 37,229 patient meta-analysis. Am. Heart J. 162: 938–948. 2011.
10. Nunes S., Soares E., Fernandes J., Viana S., Carvalho E., Pereira F.C., Reis F. Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: Brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. Cardiovasc. Diabetol. 12: 1–11. 2013.
11. Tadic M., Celic V., Cuspidi C., Ilic S., Pencic B., Radojkovic J., Ivanovic B., Stanislavljevic D., Kocacabay G., Marjanovic T. Right heart mechanics in untreated normotensive patients with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A two- and three-dimensional echocardiographic study. J. Am. Soc. Echocardiogr. 28: 317–327. 2015.
12. Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P.B., Terpilowski M.A., Dobretsov M., Gyorke S. Subcellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat. Front. Physiol. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
13. Huang Y., Cai X., Mai W., Li M., Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. Bmj. 5953. 2016.
14. Kubasov I.V., Dobretsov M. Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. J. Physiol. 590: 937–944. 2012.
15. Dobretsov M., Backonja M., Romanovsky D., Stimers J.R. Animal Models of Diabetic Neuropathic Pain. In: Animal Models of Pain. Eds: Chao Ma, Jun-Ming Zhang. Springer. Series: Neuromethods. 49. 147–170. 2010.

16. Singh RM., Waqar T., Howarth F.C., Adeghate E., Bidasee K., Singh J. Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. *Heart Fail. Rev.* 23: 37–54. 2018.
17. Brette F., Orchard C. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 92: 1182–1192. 2003.
18. Hong T.T., Shaw R.M. Cardiac T-tubule microanatomy and function. *Physiol. Rev.* 97: 227–252. 2017.
19. Jourdon P., Feuvray D. Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J. Physiol.* 470: 411–429. 1993.
20. Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K^+ currents in rat heart: role of insulin. *J. Physiol.* 507(2): 485–496. 1998.
21. Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D. Insulin stimulation of rat ventricular K^+ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. *J. Physiol.* 514(3): 735–745. 1999.
22. Casis O., Gallego M., Iriarte M., Sanchez-Chapula J.A. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia.* 43: 101–109. 2000.
23. Grunnet M. Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? *Acta Physiol.* 198 (Suppl. 676): 1–53. 2010.
24. McMillan B., Gavaghan D.J., Mirams G.R. Early afterdepolarization tendency as a simulated pro-arrhythmic risk indicator. *Toxicol. Res.* 6: 912–921. 2017.
<https://doi.org/10.1039/c7tx00141j>
25. Nygren A., Olson M.L., Chen K.Y., Emmett T., Kargacin G., Shimoni Y. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat: reduced conduction reserve. *J. Physiol.* 580(2): 543–560. 2007.
26. Xi F., Yilong P., Qian C., Bin L., Shuo W., Hongjiao D., Na D., Xiaodong L. Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. *BMC Cardiovasc. Disorders.* 2018.
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5>
27. Tuteja D., Xu D., Timofeyev V., Lu L., Sharma D., Zhang Z., Xu Y., Nie L., Va'zquez A.E., Young J.N., Glatzer K. A., Chiamvimonvat N. Differential expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H2714–H2723. 2005.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00534.2005>
28. Wei A.D., Gutman G.A., Aldrich R., Chandry K.G., Grissmer W.H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57: 463–472. 2005.
<https://doi.org/10.1124/pr.57.4>
29. Grunnet M., Jensen B.S., Olesen S.P., Klaerke D.A. Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Pflugers Arch.* 441: 544–550. 2001.
30. Gui L., Bao Z., Jia Y., Qin X., Cheng Z.J., Zhu J., Chen Q.H. Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304: H118–H130. 2013.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011>
31. Chang P.C., Turke I., Lopshire J.C., Masroor S., Nguyen B.L., Tao W., Rubart M., Chen P.S., Chen Z., Ai T. Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J. Am. Heart Assoc.* 2: e004713. 2013.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004713>
32. Chua S.K., Chang P.C., Maruyama M., Turker I., Shinohara T., Shen M.J., Chen Z., Shen C., Rubart-von der Lohe M., Lopshire J.C., Ogawa M., Weiss J.N., Lin S.F., Ai T., Chen P.S. Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ. Res.* 108: 971–979. 2011.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238386>
33. Bracken N.K., Woodall A.J., Howarth F.C., Singh J. Voltage-dependence of contraction in streptozotocin-induced diabetic myocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 261: 235–243. 2004.

Functional Changes in the T-System of Cardiomyocytes of the Isolated Rat Heart during Development of Streptozotocin-Induced Diabetes

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

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

*e-mail: kubasov_igor@mail.ru

Left ventricles (LV) of isolated hearts of the control rats ($n = 7$) and rats injected with streptozotocin (STZ; $n = 21$) were studied on the four-week post-injection term using 5- μ m tip (O.D.) glass extracellular microelectrodes. STZ-rats that maintained hypergly-

emia by the time of the study (random glucose > 11 mM; $n = 3$) were designated as diabetic animals (diabetes mellitus group; STZ-DM). Remaining STZ-rats ($n = 18$) were designated as normoglycemic rats (STZ-NG group). In control and in STZ-rat hearts two main types of sinus rhythm action potentials (AP) of epicardial ventricular myocytes could be recorded: signals characterized by a single (AP1) or double negative peaks (AP2). Respective time parameters of AP1 (rise time, and 50 and 90% decay times (T_{50} and T_{90})) not differed between studied groups of rats. However, T_{50} of AP2 of LV myocytes of STZ-NG and STZ-DM rats were statistically significantly longer than T_{50} of AP2 recorded in control rat hearts. Furthermore, in 28% of STZ-NG and in 67% of STZ-DM rat hearts additional type of AP (AP3) featuring a complex, multi-peak negative phase and prominent positive phase of after-hyperpolarization were recorded. Appearance of AP3 was associated with a proportional decrease in the relative frequency of AP2 recordings (from 80–85% to 55–60% of all recordings). Frequency of AP1 recordings remained stable, 15–20% in all experiments in all groups of rats. Tentatively, observed in this study modulation in electrical activity of ventricular myocytes of STZ-rat hearts results from structure-functional changes in organization of the T-system of these myocytes. Regardless of validity of this suggestion, it is important that changes in electrogenesis of cardiomyocytes develop fast (1 month) not only in STZ-DM rats, but also in hearts of STZ-rats with normal or moderately increased blood glucose levels, which may be considered as the state equivalent to the state of early prediabetes.

Keywords: type I diabetes mellitus, prediabetes, diabetic cardiomyopathy, cardiomyocytes, action potentials, T-system

ЦИТИРОВАТЬ:

Кубасов И.В., Чистякова О.В., Сухов И.Б., Панов А.А., Добрецов М.Г. Изменения внеклеточно регистрируемых потенциалов действия изолированного сердца крысы при развитии стрептозотоцинового диабета. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(10): 1266–1277. DOI: 10.31857/S0869813920100052

TO CITE THIS ARTICLE:

Kubasov I.V., Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Panov A.A., Dobretsov M.G. Functional Changes in the T-System of Cardiomyocytes of the Isolated Rat Heart during Development of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Russian Journal of Physiology.* 106(10): 1266–1277. DOI: 10.31857/S0869813920100052