

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ЖЕЛУДОЧКОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ/ВЫСОКОСАХАРОЗНОЙ ДИЕТЕ

© 2024 г. И. В. Кубасов, А. В. Степанов*, Ю. А. Филиппов, О. Ю. Карнишкина, А. А. Панов, М. Г. Добрецов

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

* e-mail: botanik2407@gmail.com

Поступила в редакцию 30.09.2024 г.

После доработки 25.10.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Крысы, содержащиеся на высокожировой/высокосахарозной диете (ВЖСД) в течение 10–12 недель, демонстрировали развитие гипергликемии и признаки висцерального ожирения. Субэпикардальные миоциты левого желудочка (ЛЖ) сердец этих крыс отличались от контроля существенно увеличенной фракцией внеклеточных потенциалов действия (вПД) сердца, характеризующихся выраженной фазой следовой гиперполяризации (СГ) и ускоренным спадом вПД. Локальная доставка в зону регистрации вПД апамина (блокатора Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов низкой проводимости (IK_{Ca} , SK-каналы) в концентрации 500 нМ в составе раствора внутри пипетки сопровождалась подавлением фазы СГ и продолжением спада вПД. Полученные данные предполагают, что потребление ВЖСД ведет к увеличению экспрессии и/или активности SK-каналов и, как результат, к развитию СГ и укорочению вПД эпикардальных кардиомиоцитов ЛЖ сердца крыс.

Ключевые слова: крыса, кардиомиоцит, высокожировая/высокосахарозная диета, кардиомиопатия, внеклеточный потенциал действия, SK-каналы

DOI: 10.31857/S0044452924070056, **EDN:** KKCCFH

ВВЕДЕНИЕ

Изменения в электровозбудимой мембране кардиомиоцитов лежат в основе процессов ремоделирования электрогенеза при системных сердечных заболеваниях различной этиологии, в том числе и при ряде хронических метаболических расстройств, таких как сахарный диабет (СД). В наших исследованиях с использованием метода внеклеточной регистрации ПД (вПД) микроэлектродами с малым диаметром кончика (2–5 мкм), позволяющим регистрировать активности как поверхностной мембраны, так и мембраны t-трубочек кардиомиоцитов в составе изолированного сердца, было показано, что в стрептозотоциновой модели сахарного диабета 1-го типа (СТЗ-СД1) большинство вПД кардиомиоцитов желудочков сердца, в отличие от контроля, сопровождается выраженной фазой следовой гиперполяризации (СГ) [1]. При дальнейшем рассмотрении вопроса природы этой фазы было установлено, что значительная роль в ее формировании принадлежит апамин-чувствительным Ca^{2+} -активируемым K^{+} -каналам низкой проводимости (IK_{Ca} , SK-каналы) [2]. Функциональное значение этих изменений в миокарде при развитии

СД1 остается неясным. Однако другим не менее важным и малоизученным вопросом являются изменения в электрогенезе поверхностной мембраны и в t-трубочках кардиомиоцитов при развитии наиболее распространенных в современном обществе метаболических заболеваний и расстройств с высокой степенью риска развития сердечно-сосудистых заболеваний – СД второго типа (СД2) и преддиабета 2 типа / метаболического синдрома (МС). Так, СД2 составляет не менее 90% от всех диагностированных случаев СД. Также высока и встречаемость лиц из группы риска развития СД2 – людей с МС [3–5]. Существует множество определений МС, однако, как правило, все они включают нарушения метаболизма глюкозы (преддиабет), липидного обмена, ожирение и гипертензию [5–7].

Учитывая вышесказанное, целью данной работы было исследовать наличие изменений в профилях вПД различных отделов мембраны кардиомиоцитов субэпикарда желудочков изолированного сердца крыс с МС с использованием метода внеклеточной регистрации и возможное участие в этих изменениях SK-каналов. Для индукции МС использовали хорошо апробированную другими исследовательскими

группами модель содержания крыс на высокожировой/высокосахарозной диете (ВЖСД) [7–10].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар весом 260–410 г и возрастом 3–4 месяца. Всего в работе было использовано 10 контрольных и 9 крыс на ВЖСД. Крыс содержали в виварии ИЭФБ РАН в индивидуальных клетках. Животные контрольной группы (К) имели на протяжении всего эксперимента (10–12 недель) свободный доступ к питьевой воде и сухому корму (ЛБК-120, Тосненский комбикормовый завод, Россия; 2,7 ккал/г). Крысам ВЖСД-группы, помимо питьевой воды и сухого корма, был предоставлен доступ к поилкам со сладкой водой, подслащенной сахаром (30% сахара; 3,7 ккал/г сахара), а также кормушкам со свиным жиром (Baytler, Уфа; 8,9 ккал/г). Вес крыс и потребляемое количество воды, подслащенной воды, корма и жира измерялись на протяжении 10 недель эксперимента с интервалом в 2–3 дня. Кроме того, в конце эксперимента после 15 часов голодания проводился тест на толерантность к глюкозе (ГТТ). В ГТТ измеряли уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены неанестезированных крыс, до и на 15, 30, 60 и 120 минутах после внутривенного введения животному 2 г/кг глюкозы (глюкометр “One Touch Ultra”, США). В терминальных экспериментах (10–12 недель диеты) был определен уровень случайной глюкозы, и затем животные были наркотизированы введением смеси золетила (40 мг/кг веса животного; Virbac, Франция) и ксиланита (10 мг/кг веса животного; Нита-Фарм, Россия) с последующими определением масс тела и абдоминального жира и изоляцией сердца для электрофизиологических экспериментов.

Электрофизиологические исследования проводились на изолированных сердцах крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии сердца аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа: сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой для микроэлектродной регистрации [11]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) раствор Тироде со следующим составом (в мМ): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 5,6 глюкоза; pH 7.4. Эксперименты проводили с подогревом перфузирующего раствора до 36–37°C (in-line heater TC-324C, Wagner Instruments, USA). Скорость перфузии коронарной системы сердца составляла 5–7 мл/мин. В таких условиях изолированные сердца поддерживали устойчивый электрогенез в течение 2–3 часов. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) с диаметром кончика 5 мкм производили с использованием пуллера (P-1000, Sutter Instruments, USA)

из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм (BF150-86-10, Sutter Instruments, USA). Микроэлектроды заполняли раствором Тироде (РТ) или, в части экспериментов, раствором Тироде с добавлением селективного блокатора SK-каналов апамина (Tocris, США) в концентрации 500 нМ (РТА) [12]. Сопротивление кончика заполненных микроэлектродов составляло около 2 МОм. Сократительная активность сердца блокировалась добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутандион монооксида (BDM, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 мМ. Микроэлектрод, заполненный РТ или РТА, подводили к произвольно выбранным участкам поверхности ЛЖ исследуемых сердец контрольной и экспериментальной групп при помощи микроманипулятора Sensapex (Финляндия). При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода с поверхностью кардиомиоцита регистрировались авторитмические (частота в диапазоне 0.3–0.5 Гц, рис. 1а) систолические вПД субэпикардиальных миоцитов, которые усиливались с помощью усилителя AM-1500 (National Instruments, США) и оцифровывались с частотой 10 кГц с использованием аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США). В среднем в каждом эксперименте с использованием микроэлектродов, заполненных РТ, выполнялась непрерывная регистрация от 10–15 мест отведения вПД в течение 1–2 минут в каждом из участков регистрации. В 3–4 контрольных и экспериментальных сердцах последние 2–4 из этих регистраций проводились с использованием микроэлектродов, заполненных РТА, и длились не менее 30 минут, необходимых для полного развития блокирующего эффекта апамина в точке регистрации. Оцифрованные сигналы анализировались с помощью программного пакета WinWCP 5 (SIPBS, Великобритания). Сигналы разделялись на две группы: вПД1, характеризующиеся наличием одного негативного пика (P1; рис. 1б), и вПД2, характеризующиеся наличием двух негативных пиков (P1 и P2) или одним негативным пиком с выраженным изломом на его спаде (рис. 1с). Примерно 35% вПД1 и вПД2 завершались позитивной фазой СГ (after-hyperpolarization, АНР; рис. 1б–с, штриховые линии). Перед анализом сигналы были нормированы к амплитуде первого пика вПД (P1), после чего для вПД1 измеряли T_{90} (время спада на 90% от абсолютной амплитуды негативного пика) и $A_{АНР}$ (относительная пиковая амплитуда позитивной фазы СГ). Для вПД2 измеряли T_{90} (время спада на 90% от абсолютной амплитуды первого негативного пика сигнала), $A_{АНР}$ и $A_{P2/P1}$ (относительная амплитуда 2-го пика вПД2; в долях от амплитуды первого негативного пика сигнала). Если сигнал не имел выраженной фазы СГ, амплитуда этой фазы

считалась равной нулю (рис.1b-с, сплошные линии). Измеренные величины были усреднены для всех вПД1 и вПД2, зарегистрированных в каждом исследованном сердце, и затем использованы для сравнения между К- и ВЖСД-группами животных. Перед сравнением распределения данных проверяли на нормальность (тест Шапиро-Уилка) и в соответствии с результатами этой проверки различия между значениями в контрольной и экспериментальной группах оценивали как достоверные при $p < 0.05$, используя соответствующий параметрический или непараметрический тест. Для выявления потенциальных внутригрупповых взаимоотношений между измеренными параметрами использовался линейный регрессионный анализ. Статистический анализ данных проводился с использованием программы GraphPad Prism 9.0, (GraphPad Software, США). Представленные в тексте результаты приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики контрольных и ВЖСД-крыс. На начало эксперимента контрольные и ВЖСД-крысы не отличались по весу (325 ± 11 и 323 ± 10 г.) ни по уровню случайной глюкозы (6.2 ± 0.2 и 6.1 ± 0.1 мМ). На протяжении 10 недель эксперимента крысы со свободным доступом к подслащенной воде и жиру потребляли существенно меньше сухого корма, чем контрольные животные (3.4 ± 0.3 и 6.8 ± 0.5 г/день/100 г веса крысы), но статистически значимо больше калорий (28.3 ± 0.8 и 18.3 ± 1.3 г/день/100 г веса крысы). Характеристики животных, измеренные в конце эксперимента (10 – 12 недель диеты) представлены в таблице 1.

Характеристики вПД кардиомиоцитов контрольных крыс. На рис. 1 представлены фрагменты не-

Таблица 1. Характеристики животных на конец эксперимента

Параметр (единица измерения)	Контрольная группа (10 крыс)	ВЖСД группа (9 крыс)
Прирост в весе (г за 10 недель)	73 ± 7	95 ± 11
Глюкоза натощак (мМ)	5.3 ± 0.2	$6.4 \pm 0.2^*$
Случайная глюкоза (мМ)	6.1 ± 0.2	$6.9 \pm 0.1^{\#}$
ГТТ, площадь под кривой (мМ*мин)	1216 ± 73	1383 ± 122
Абдоминальный жир, г/100 г веса тела	0.82 ± 0.08	$1.79 \pm 0.24^*$

* – t -критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – U -критерий Манна – Уитни, $p < 0.05$

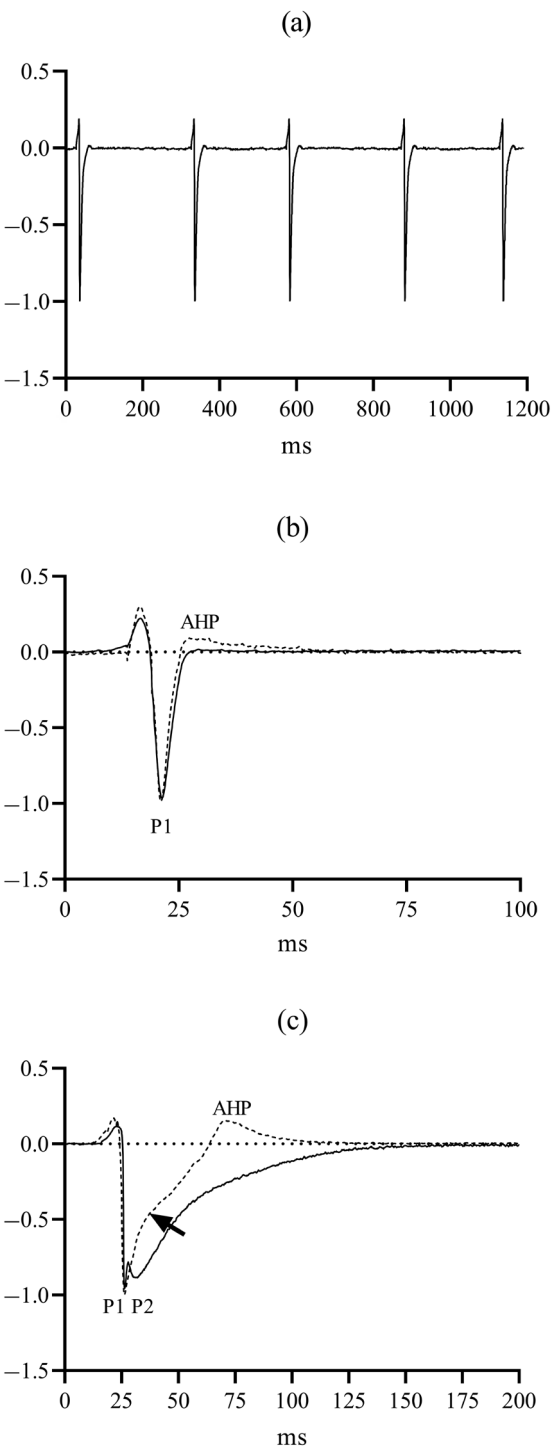


Рис. 1. Репрезентативные примеры непрерывной записи авторитмических вПД1 (а) и примеры индивидуальных профилей нормализованных вПД1 (b) и вПД2 (с) кардиомиоцитов сердец контрольных крыс. Профили индивидуальных вПД были нормализованы к величине их первого негативного пика (P1). P2 – метка второго негативного пика вПД2. Штриховыми линиями представлены примеры сигналов, сопровождающихся фазой СГ (afterhyperpolarization, AHP). Обратите внимание, что вПД2, указанный штриховой линией, хотя и не имеет отчетливого второго негативного пика, характеризуется выраженным изломом на спаде своего единственного негативного пика (стрелка) и, поэтому тоже классифицирован, как вПД2.

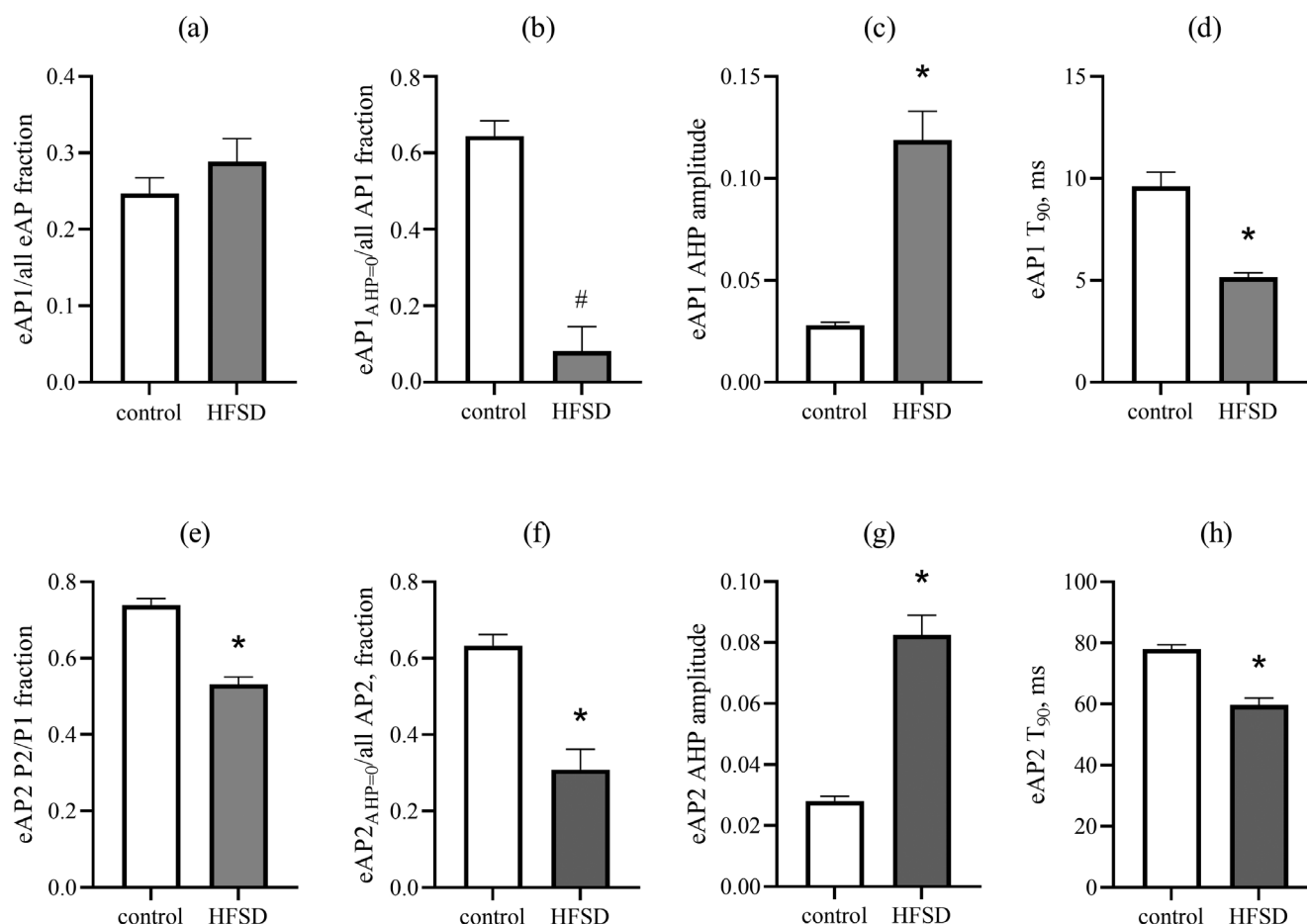


Рис. 2. Усредненные характеристики вПД субэпикарда ЛЖ сердец контрольных (10 сердец, белые столбцы) и ВЖСД (9 сердец, серые столбцы) крыс. (а) – Доля вПД1 (eAP1) по отношению к всем зарегистрированным вПД. (б) – Доля вПД1 без СГ (eAP1_{AHP=0}) по отношению ко всем зарегистрированным вПД1. (с) – Амплитуда СГ вПД1. (д) – T₉₀ вПД1. (е) – соотношение P2/P1 в вПД2 (eAP2). (ф) – Доля вПД2 без СГ (eAP2_{AHP=0}) по отношению ко всем зарегистрированным вПД2. (г) – Амплитуда СГ вПД2. (h) – T₉₀ вПД2. * – *t*-критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – *U*-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

прерывной записи типичных авторитмических вПД1 субэпикардиальных кардиомиоцитов (а) и примеры развернутых во времени профилей вПД1 и вПД2 (б, с) зарегистрированных в разных участках сердца контрольной крысы. В среднем вПД1 встречались относительно редко ($26 \pm 2.0\%$; 10 сердец). Остальные примерно 75% зарегистрированных сигналов были классифицированы как вПД2. Средние значения T₉₀ вПД1 и вПД2 в ЛЖ контрольных крыс составляли 9.6 ± 0.7 мс и 78.0 ± 1.4 мс соответственно. Примерно 35% как вПД1, так и вПД2 ($35.6 \pm 4\%$ вПД1 и $36.7 \pm 3\%$ вПД2) завершались отчетливо выраженной фазой СГ. Относительные амплитуды этой фазы, как и частота встречаемости СГ, не различались между типами вПД ($2.8 \pm 1\%$ для вПД1 и $2.8 \pm 1\%$ для вПД2). Хотя пиковая амплитуда СГ составляла всего несколько процентов от амплитуды первого негативного пика вПД, эта величина достоверно отличалась от нуля или ба-

зовой линии сигнала. Относительная амплитуда 2-го пика вПД2 контрольных крыс A_{P2/P1} составляла 0.74 ± 0.02 .

Характеристики вПД кардиомиоцитов ВЖСД-крыс. У крыс, содержащихся на ВЖСД, наблюдалось существенное ремоделирование профилей вПД (рис. 2).

Хотя частота встречаемости вПД1 (и, соответственно, частота встречаемости вПД2) не отличалась между контрольными и ВЖСД сердцами (рис. 2а), доля вПД1 без СГ была достоверно снижена (рис. 2б), амплитуда СГ вПД1 достоверно увеличена (рис. 2с) и длительность вПД1 достоверно укорочена (рис. 2д) в сердцах ВЖСД-животных по сравнению с аналогичными параметрами контрольных крыс. Что касается вПД2 сигналов, по сравнению с контролем, в ВЖСД-группе амплитуда второго негативного пика была снижена (рис. 2е) и, как и у вПД1, доля вПД2 без СГ была достоверно

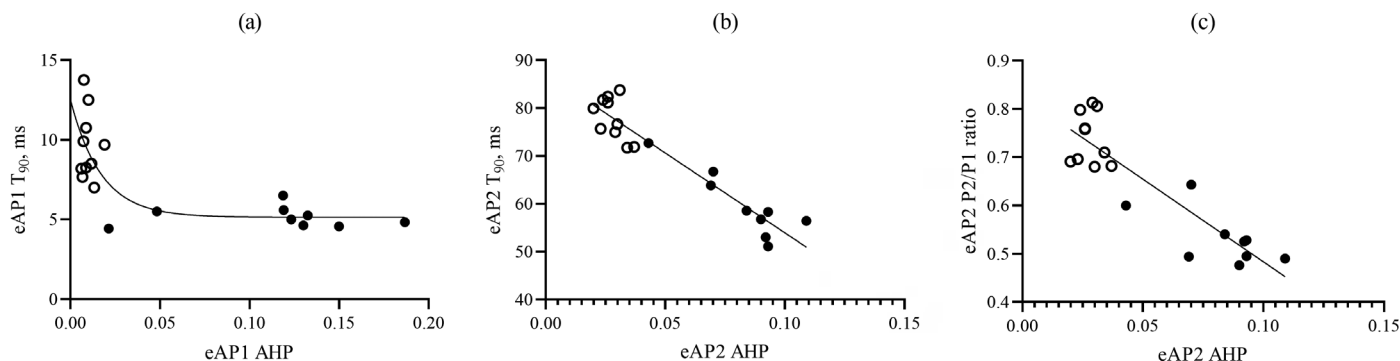


Рис. 3. Взаимоотношения характеристик вПД субэпикарда ЛЖ индивидуальных сердец контрольных (белые символы, $n = 10$) и ВЖСД (черные символы, $n = 9$) крыс. Каждый символ представляет среднюю по всем вПД1 ($n = 4 - 12$) или вПД2 ($n = 14 - 46$) регистрациям данного типа сигнала, осуществленным в данном сердце. (а) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ вПД1 (eAP1 ANP) и T_{90} вПД1 (eAP1 T_{90}) сигналов. Линия — примерная линия соответствия. (б) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ вПД2 (eAP2 ANP) и T_{90} вПД2 (eAP2 T_{90}) сигналов. Линия — результат регрессионного анализа всех данных (контроль и ВЖСД). Параметры линии регрессии: $y = -333.4 \cdot x + 87.28$; $R^2 = 0.903$. (с) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ и P2/P1 (eAP2 P2/P1 ratio) вПД2 сигналов. Линия — результат регрессионного анализа всех данных (контроль и ВЖСД). Параметры линии регрессии: $y = -3.427 \cdot x + 0.8259$; $R^2 = 0.801$.

ниже (рис. 2f), амплитуда СГ достоверно увеличена (рис. 2g) и длительность вПД2 достоверно снижена (рис. 2h).

Результаты регрессионного анализа данных. Регрессионный анализ не выявил строгой связи между амплитудой СГ и T_{90} во всех вПД1 (рис. 3а). Однако выраженные линейные отношения были выявлены между пиковой амплитудой СГ и T_{90} , а также между пиковой амплитудой СГ и величиной соотношения P2/P1 во всех вПД2 регистрациях (рис. 3б, с).

Однако корреляций между параметрами вПД1/вПД2 с другими измеренными характеристиками (глюкоза натошак, случайная глюкозы, площадь ГТТ, масса абдоминального жира) показано не было (данные не приведены).

Влияние локальной доставки апамина на профили вПД. Поскольку в наших предыдущих исследованиях было показано, что при СТЗ-СД1 появление фазы СГ связано с увеличением экспрессии/активности SK-каналов [2], нами было предпринято исследование влияния апамина на кардиомиоциты ЛЖ контрольных и ВЖСД крыс.

Из графиков, представленных на рисунке 4, видно, что длительная (30 мин) регистрация вПД с использованием микропипетки, заполненной РТА, не была связана с существенными изменениями профилей вПД, в которых фаза СГ не была выражена в начале регистрации (рис. 4а, б). Однако профили вПД1 и вПД2, исходно характеризующиеся наличием фазы СГ, демонстрировали прогрессивное подавление этой фазы вплоть до полного ее исчезновения к 30-й минуте регистрации (рис. 4с, д).

Более того, подавление СГ апамином при регистрации (разница между амплитудой СГ в начале и

на 30-й минуте регистрации) линейно зависело от исходной амплитуды СГ как для вПД1, так и для вПД2 сигналов (рис 5а, б). Причем параметры линейной регрессии были очень схожи для этих двух типов сигналов: для вПД1 — $y = -0,8115 \cdot x + 0,001224$ ($R^2 = 0.952$) и для вПД2 — $y = -0,8101 \cdot x - 0,0002779$ ($R^2 = 0.902$).

Применение апамина не приводило к достоверным изменениям параметров вПД в группе контрольных животных (4 крысы). Величина T_{90} вПД1 и относительная амплитуда СГ на начало регистрации (11.19 ± 0.23 мс и 0.7 ± 0.1 % соответственно) и после 30-минутной аппликации апамина (11.47 ± 0.94 мс и 0.4 ± 0.1 % соответственно) достоверно не различались (парный t-критерий Стьюдента, $p > 0.05$). Аналогичные результаты были получены и для вПД2: T_{90} вПД2, относительная амплитуда СГ и отношение P2/P1 на начало (81.98 ± 4.20 мс, 1.2 ± 0.7 % и 0.76 ± 0.11 соответственно) и после 30-минутной аппликации апамина (82.33 ± 3.68 мс, 0.3 ± 0.1 % и 0.71 ± 0.02 соответственно) также достоверно не различались (парный t-критерий Стьюдента, $p > 0.05$).

В среднем в пределах ВЖСД-группы локальная доставка апамина к месту регистрации в течение 30 минут вела к увеличению T_{90} вПД1 на 54% (рис. 6а) и уменьшению относительной амплитуды СГ на 81% (рис. 6б). В тех же экспериментах T_{90} вПД2 также возрастала на 22% (рис. 6с), амплитуда СГ снижалась на 85% (рис. 6д) и соотношение P2/P1 увеличивалось на 42% (от 0.52 ± 0.04 до 0.74 ± 0.04 ; парный t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$). Однако анализ индивидуальных измерений, наподобие того, что был приведен на рисунке 5, не выявил суще-

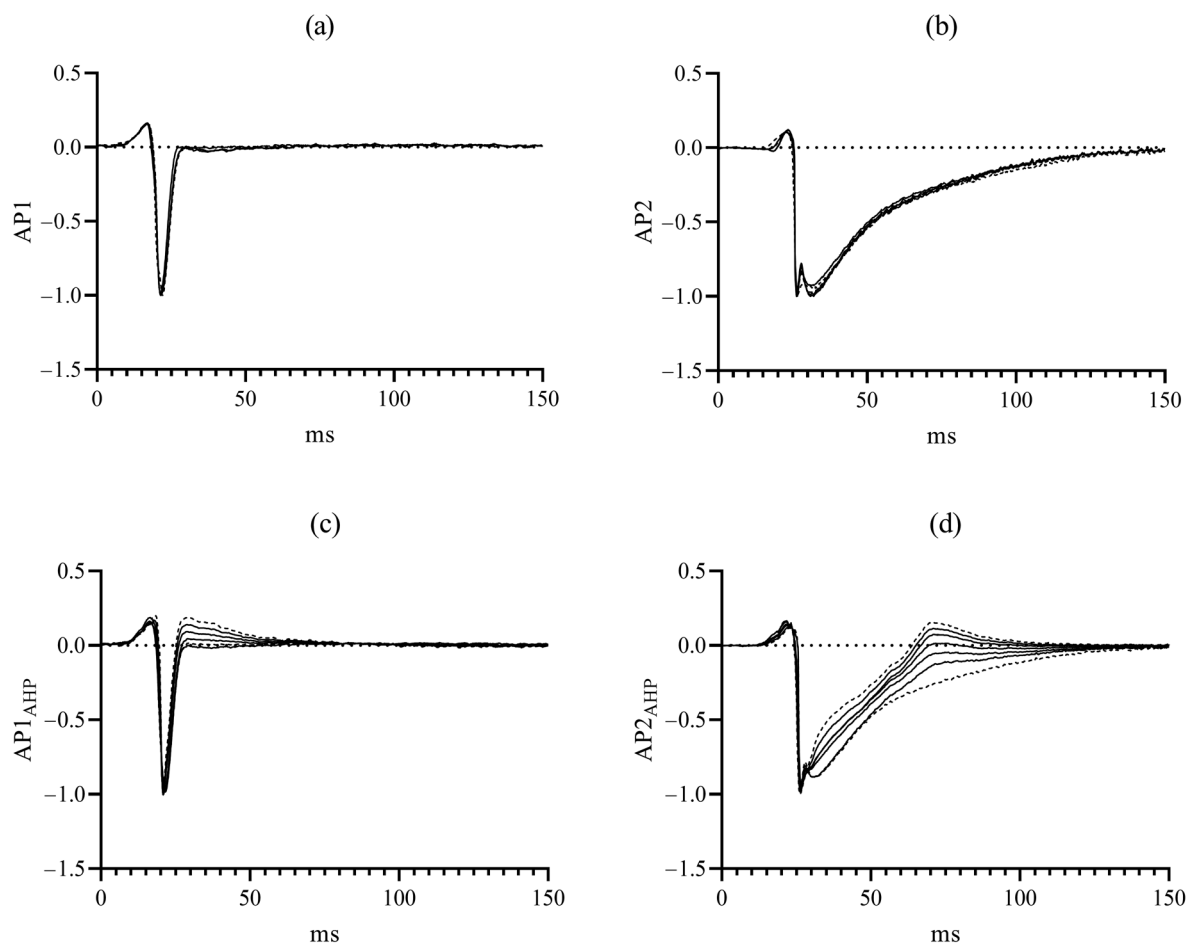


Рис. 4. Примеры изменений профилей нормализованных вПД1 и вПД2, без СГ (а, б) и с выраженной СГ (с, д) во время непрерывной регистрации с использованием микропипетки, содержащей апамин. На каждом из графиков интервал между показанными треками вПД 5-10 мин. Треки сигналов, зарегистрированных сразу после первого контакта пипетки с миоцитом и через 30 мин регистрации, показаны штриховыми линиями.

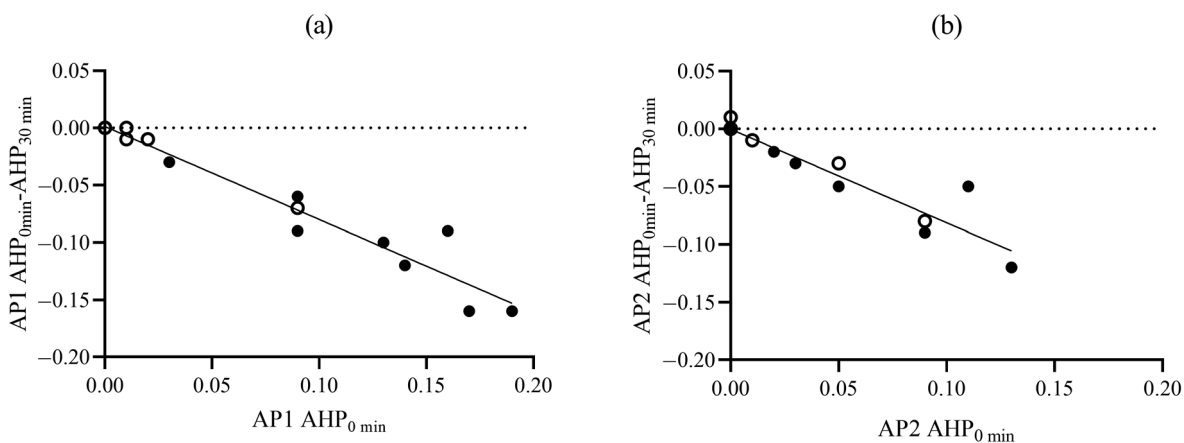


Рис. 5. Подавление СГ вПД1 (а) и вПД2 (б) в течение 30-минутной регистрации микропипеткой с РТА в зависимости от исходной амплитуды СГ регистрируемого сигнала. На рисунках каждый символ представляет индивидуальную регистрацию от кардиомиоцита ЛЖ сердец контрольных (белые символы; (а) – 3 крысы, 9 измерений; (б) – 4 крысы, 12 измерений) или ВЖСД (черные символы; (а) – 3 крысы, 8 измерений; (б) – 4 крысы, 9 измерений) крыс. Сплошные линии – линии регрессии, рассчитанные для всех (контрольных и ВЖСД) данных, представленных на рисунке. Параметры регрессионных линий представлены в тексте.

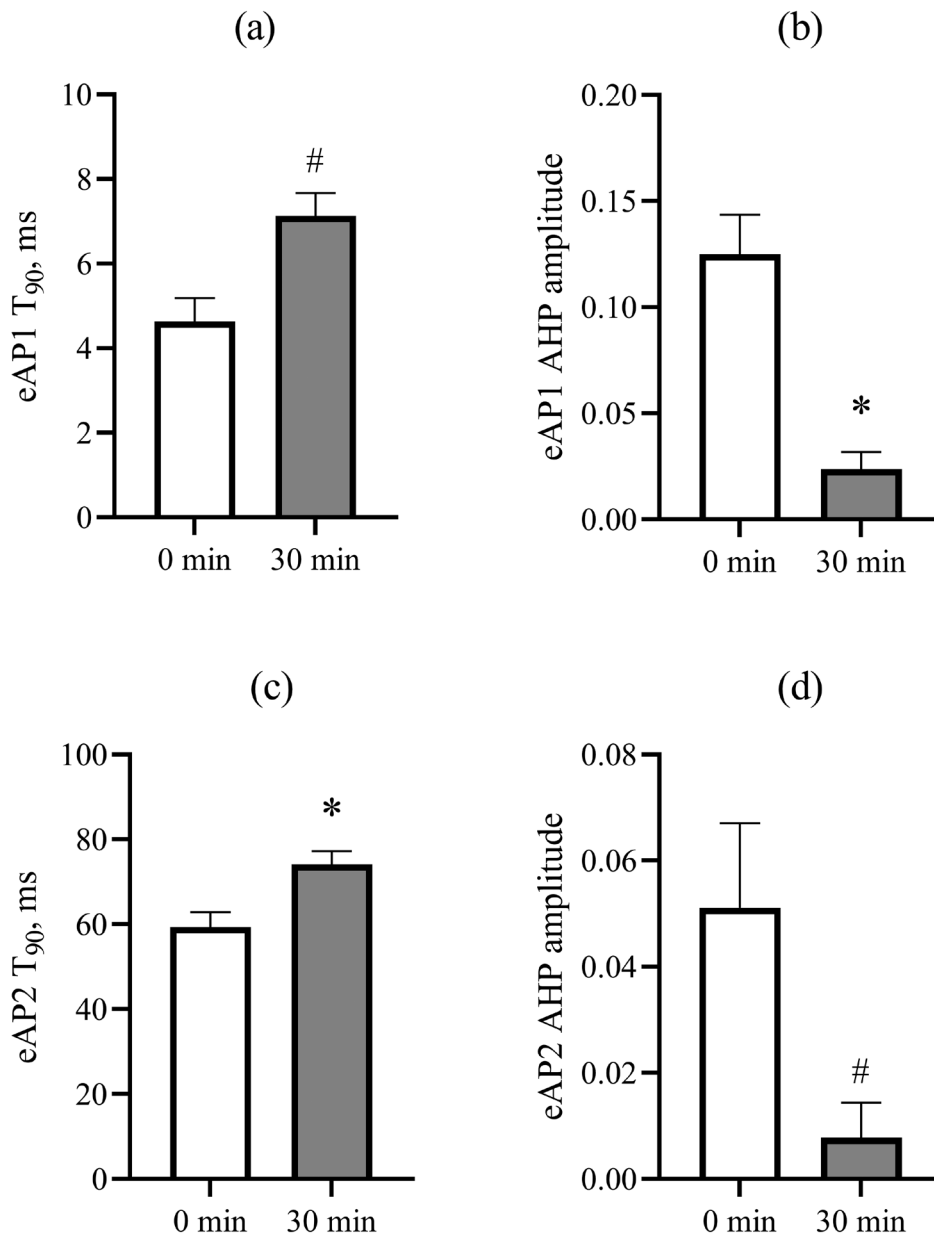


Рис. 6. Параметры ВПД1 и ВПД2 ВЖСД-крыс в начале регистрации и через 30 минут после начала аппликации амина: (а) – T_{90} ВПД1; (б) – амплитуда СГ ВПД1; (с) – T_{90} ВПД2; (д) – амплитуда СГ ВПД2. (а, б) – 3 крысы, 8 измерений; (с, д) – 4 крысы, 9 измерений). * – парный t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – парный критерий Уилкоксона, $p < 0.05$.

ственных взаимосвязей между эффектом амина на СГ и T_{90} или величины R2/P1 регистрируемых ВПД1 или ВПД2 (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СД2 и годами предшествующие ему МС и нарушения в метаболизме глюкозы являются наиболее распространенными в мире метаболическими расстройствами и известными факторами риска

аритмии, кардиомиопатии и развития сердечной недостаточности (СН) [13]. Патогенез сердечных осложнений СД2, МС и преддиабета не до конца ясен [13, 14].

Насколько нам известно, данная работа представляет собой первое исследование электрогенеза кардиомиоцитов ЛЖ сердца ВЖСД крыс с помощью внеклеточной регистрации ПД с использованием электродов с узким кончиком. Основным результатом наших исследований является наблю-

дение увеличения размера фазы СГ вПД и увеличение частоты встречаемости вПД с СГ после 10-12 недель ВЖСД. Кроме того, наши данные однозначно указывают на активность SK-каналов как на причину появления/усиления фазы следовой гиперполяризации вПД.

ВЖСД — хорошо апробированная другими исследовательскими группами модель преддиабета/метаболического синдрома [7–10]. Из исследованных в нашей работе характеристик (таблица 1), увеличение уровня глюкозы натощак и случайной глюкозы, а также накопление абдоминального жира однозначно указывают на развитие нарушений в метаболизме глюкозы и жиров у ВЖСД-крыс, что является признаками МС [7].

Как и ранее [11, 15], в этой работе в субэпикардиальных кардиомиоцитах было идентифицировано два основных типа вПД. Ранее были представлены аргументы в пользу того, что вПД1 регистрируется в тех случаях, когда кончик регистрирующего микроэлектрода (при условии его малого размера) оказался помещенным в зону клетки свободную от выходов t-трубочек, характеризующуюся высокой плотностью натриевых каналов (первый и единственный негативный пик) и низкой плотностью кальциевых каналов (отсутствие признаков второго негативного пика). В то же время, наличие под электродом выходов t-трубочек и доступа к Т-системе кардиомиоцита, мембрана которой насыщена Ca^{2+} -каналами, является условием регистрации вПД2 (сигнала с двумя негативными пиками или выраженным изломом на спаде первого пика) [11, 15]. Питание ВЖСД не сопровождалось изменением соотношения вПД1 и вПД2 (рис. 2а), большинство регистрируемых сигналов относилось к классу вПД2, что согласуется с большей вероятностью случайного позиционирования кончика микроэлектрода в участке мембраны с выходом одной или нескольких t-трубочек на поверхность кардиомиоцита и предполагает, что Т-система кардиомиоцитов ВЖСД-крыс не претерпевает существенных структурных изменений. Последнее наблюдение резко контрастирует с тем, что мы наблюдали ранее в экспериментах с сердцами крыс с СТЗ-СД1, где доля вПД2 снижалась [2]. Возможно, это было связано с нарушением регулярности Т-системы кардиомиоцитов при развитии СД1 [16], которое, по всей видимости, не наблюдалось в нашей модели МС. Однако это предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

Как и в нашем предыдущем исследовании на модели СТЗ-СД1 [2], основной эффект ВЖСД на вПД в данном исследовании состоял в увеличении позднего выходящего тока, определяющего амплитуду фазы СГ и, соответственно, профили вПД

(рис. 2). Так, длительность спада и соотношение негативных пиков вПД2 демонстрировало линейную зависимость от амплитуды СГ (рис. 3). В экспериментах с локальной доставкой апамина, блокатора SK-каналов, к сайтам регистрации вПД без СГ (рис. 1, 4а, б) не наблюдались изменения формы сигнала на протяжении 30 минут непрерывной регистрации. Однако при регистрации вПД с СГ в подобных условиях (рис. 4с, д) наблюдались прогрессивные снижение амплитуды СГ и продление спада вПД. Более того, изменение в амплитуде СГ в экспериментах с апамином линейно зависели от исходной амплитуды СГ как для вПД1, так и для вПД2 (рис. 5а, б). Вместе эти данные указывают на SK-каналы как источник тока, определяющего фазу СГ. Несмотря на тесную функциональную взаимосвязь SK-каналов с кальциевыми каналами L-типа и, соответственно связь SK-каналов с Т-системой [17], наши данные (сходство линий регрессии, описывающих зависимости подавления СГ на 30-й минуте регистрации вПД1 и вПД2 от исходной амплитуды СГ (рис. 5а, б) указывают на возможное присутствие данных каналов на поверхностной мембране кардиомиоцитов.

Тем не менее, вопрос о роли увеличения активности/экспрессии SK-каналов в кардиомиоцитах желудочков сердца при СД остается открытым. Насколько нам известно, роль сердечных SK-каналов была исследована только в одной работе на мышинной модели СТЗ-СД1 [18] и в двух работах, использующих крысиные модели СД2 [19, 20]. Однако все эти исследования были ограничены анализом SK-каналов предсердий, в которых активность этих каналов была подавлена. Полученные нами данные предполагают увеличение активности/экспрессии SK-каналов как при СД1 [2], так и при МС (данное исследование), однако эти изменения были диаметрально противоположны имеющимся данным для предсердий. Возможно, это увеличение активности, как было недавно показано в исследованиях сердца кролика, играет защитную функцию, увеличивая реполяризационный резерв клеток миокарда [21]. Хотя в более ранних исследованиях увеличение активности SK-каналов в кардиомиоцитах эпикарда желудочков сердца крыс с острым инфарктом миокарда приводило к развитию желудочковой аритмии сердца [22].

Изменение длительности ПД может быть причиной возникновения аритмий. SK-каналы в норме активируются во время систолической фазы сердечного цикла, когда концентрация Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцита увеличивается. Патологическое удлинение ПД приводит к более значительному повышению концентрации Ca^{2+} и усиливает активацию SK-каналов [23], что помогает сокра-

тить длительность ПД [24]. Этот механизм представляет собой систему отрицательной обратной связи и помогает предотвратить чрезмерное удлинение ПД. Кроме того, спонтанный выброс Ca^{2+} саркоплазматического ретикулума также может активировать SK-каналы [25]. Это ослабляет постдеполяризацию, вызванную спонтанными кальциевыми волнами. Таким образом, повышение активности SK-каналов при сердечных патологиях может иметь антиаритмический эффект [24].

Важно отметить, что применяемый в наших экспериментах BDM может модулировать некоторые ионные токи [26, 27]. Вероятность возможного влияния BDM обсуждалась в нашей ранее опубликованной статье [28]. Если кратко, в проведенных экспериментах BDM добавлялся во все растворы (РТ и РТА), поэтому описанные изменения профилей ВПД в группе ВЖСД-крыс по сравнению с контролем вряд ли могут быть отнесены к неспецифическим эффектам BDM.

В заключение, представленные здесь данные позволяют предположить, что ВЖСД ассоциируется с увеличением активности/экспрессии SK-каналов в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крысы. Подтверждение этого предположения, а также изучение механизмов и выявление функционального значения предполагаемых изменений требует дальнейших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в строгом соответствии с правилами, разработанными и утвержденными локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (Протокол № 1-23/2023 от 24.01.2023), а также согласно правилам и требованиям, предусмотренным директивой 1986 г. Европейского парламента (European Communities Council Directive, 1986) и изложенным в “Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00260).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов, анализ данных и написание манускрипта (И.В.К. и М.Г.Д.), экспериментальная работа (И.В.К., Ю.А.Ф., А.В.С., А.А.П., О.Ю.К.), окончательное редактирование и под-

готовка манускрипта к подаче (И.В.К., Ю.А.Ф., О.Ю.К., А.В.С. и М.Г.Д.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kubasov IV, Chistyakova OV, Sukhov IB, Panov AA, Dobretsov MG (2020) Functional changes in the T-system of cardiomyocytes of the isolated rat heart during development of streptozotocin-induced diabetes. *Russ J Physiol* 106:1266–1277. <https://doi.org/10.31857/s0869813920100052>
2. 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. *J Evol Biochem Physiol* 57:1511–1521. <https://doi.org/10.1134/s0022093021060272>
3. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, Mokrysheva NG (2023) Diabetes Mellitus in the Russian Federation: Dynamics of Epidemiological Indicators According To the Federal Register of Diabetes Mellitus for the Period 2010–2022. *Diabetes Mellit* 26:104–123. <https://doi.org/10.14341/DM13035>
4. American Diabetes Association (2023) Standards of Care in Diabetes. *Diabetes Care* 46:S1–S291
5. Saklayen MG (2018) The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 20:1–8. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
6. Dobrowolski P, Prejbisz A, Kuryłowicz A, Baska A, Burchardt P, Chlebus K, Dzida G, Jankowski P, Jaroszewicz J, Jaworski P, Kamiński K, Kapłon-Cieślicka A, Kłoczek M, Kukla M, Mamcarz A, Mastalerz-Migas A, Narkiewicz K, Ostrowska L, Śliż D, Tarnowski W, Wolf J, Wyleżół M, Zdrojewski T, Banach M, Januszewicz A, Bogdański P (2022) Metabolic syndrome – a new definition and management guidelines. *Arch Med Sci* 18:1133–1156. <https://doi.org/10.5114/aoms/152921>
7. Rodríguez-Correa E, González-Pérez I, Clavel-Pérez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K (2020) Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes* 10:. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
8. Peris-Sampedro F, Mounib M, Schéle E, Edvardsson CE, Stoltenberg I, Adan RAH, Dickson SL (2019) Impact of Free-Choice Diets High in Fat and Different Sugars on Metabolic Outcome and Anxiety-Like Behavior in Rats. *Obesity* 27:409–419. <https://doi.org/10.1002/oby.22381>
9. Ahmed H, Hannan JL, Apolzan JW, Osikoya O, Cushen SC, Romero SA, Gouloupoulou S (2019) A free-choice high-fat, high-sucrose diet induces hyperphagia, obesity, and cardiovascular dysfunction in female cycling and pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 316:R472–R485. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00391.2018>
10. La Fleur SE, Luijendijk MCM, Van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RAH (2011) A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsive-

- ness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes* 35:595–604.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2010.164>
11. Kubasov IV, Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Gyorke S (2018) Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Front Physiol* 9:1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
 12. Kuzmenkov AI, Peigneur S, Nasburg JA, Mineev KS, Nikolaev MV, Pinheiro-Junior EL, Arseniev AS, Wulff H, Tytgat J, Vassilevski AA (2022) Apamin structure and pharmacology revisited. *Front Pharmacol* 13:977440.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.977440>
 13. Seferović PM, Petrie MC, Filippatos GS, Anker SD, Rosano G, Bauersachs J, Paulus WJ, Komajda M, Cosentino F, de Boer RA, Farmakis D, Doehner W, Lambrinou E, Lopatin Y, Piepoli MF, Theodorakis MJ, Wiggers H, Lekakis J, Mebazaa A, Mamas MA, Tschöpe C, Hoes AW, Seferović JP, Logue J, McDonagh T, Riley JP, Milinković I, Polovina M, van Veldhuisen DJ, Lainscak M, Maggioni AP, Ruschitzka F, McMurray JJV (2018) Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 20:853–872.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.1170>
 14. Fontes-Carvalho R, Ladeiras-Lopes R, Bettencourt P, Leite-Moreira A, Azevedo A (2015) Diastolic dysfunction in the diabetic continuum: Association with insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 14:1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12933-014-0168-x>
 15. Kubasov IV, Stepanov AV, Györke S (2017) Action potential heterogeneity as revealed by extracellular microelectrode recording from the surface of the isolated rat heart. *J Evol Biochem Physiol* 53:515–518.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017060102>
 16. Kubasov IV, Bobkov DE, Stepanov AV, Sukhov IB, Chistyakova OV, Dobretsov MG (2020) Evaluation of the t-system of rat cardiomyocytes during early stages of streptozotocin-induced diabetes. *Российский Физиологический Журнал Им И М Сеченова* 106:1098–1108.
<https://doi.org/10.31857/s0869813920090046>
 17. Zhang X-D, Thai PN, Lieu DK, Chiamvimonvat N (2021) Cardiac small-conductance calcium-activated potassium channels in health and disease. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 473:477–489.
<https://doi.org/10.1007/s00424-021-02535-0>
 18. Yi F, Ling TY, Lu T, Wang XL, Li J, Claycomb WC, Shen WK, Lee HC (2015) Down-regulation of the small conductance calcium-activated potassium channels in diabetic mouse atria. *J Biol Chem* 290:7016–7026.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607952>
 19. Fu X, Pan Y, Cao Q, Li B, Wang S, Du H, Duan N, Li X (2018) Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 18:1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5>
 20. Liu CH, Hua N, Fu X, Pan YL, Li B, Li XD (2018) Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 18:1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0950-x>
 21. Kanaporis G, Blatter LA (2023) Activation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels suppresses Ca^{2+} transient and action potential alternans in ventricular myocytes. *J Physiol* 601:51–67.
<https://doi.org/10.1113/JP283870>
 22. Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 304:118–130.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011>
 23. Chang P-C, Hsieh Y-C, Hsueh C-H, Weiss JN, Lin S-F, Chen P-S (2013) Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. *Heart Rhythm* 10:1516–1524.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.07.003>
 24. Chang P-C, Chen P-S (2015) SK Channels and Ventricular Arrhythmias in Heart Failure. *Trends Cardiovasc Med* 25:508.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.01.010>
 25. Terentyev D, Rochira JA, Terentyeva R, Roder K, Koren G, Li W (2014) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release is both necessary and sufficient for SK channel activation in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306:H738–746.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00621.2013>
 26. Coulombe A, Lefevre IA, Deroubaix E, Thuringer D, Coraboeuf E (1990) Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22:921–932.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90123-j](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90123-j)
 27. Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ohkubo S, Ono T, Watano T, Shigekawa M, Kimura J (2001) Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 132:1317.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703926>
 28. Stepanov AV, Dobretsov MG, Filippov YuA, Kubasov IV (2024) Influence of Apamin on the Extracellularly Recorded Action Potentials Profiles of Subepicardial Cardiomyocytes of the Rat Heart in Myocardial Infarction. *J Evol Biochem Physiol* 60:1317–1327.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024040057>

EXTRACELLULAR ACTION POTENTIALS OF VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES IN THE HEART ISOLATED FROM RATS KEPT ON A HIGH-FAT/HIGH-SUCROSE DIET

I. V. Kubasov, A. V. Stepanov[#], Yu. A. Filippov, O. Yu. Karnishkina, A. A. Panov, and M. G. Dobretsov

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

** e-mail: botanik2407@gmail.com*

Rats kept on a high-fat/high-sucrose diet (HFSD) for 10–12 weeks demonstrated the development of hyperglycemia and signs of visceral obesity. Compared to the control, extracellular action potentials (eAP) of subepicardial myocytes of the left ventricle (LV) of HFSD rats characterized by a significantly increased fraction of signals with a pronounced afterhyperpolarization (AHP) phase and an accelerated decline. Local delivery of apamin (a blocker of low-conductivity Ca^{2+} -dependent K^+ channels (IKCa, SK channels) to the eAP registration site at a concentration of 500 nM in the solution inside the pipette was accompanied by suppression of the AHP phase and prolongation of the eAP decline. The obtained data suggest that HFSD leads to an increase in the expression and/or activity of SK channels and, as a result, to the development of AHP and shortening of eAP in epicardial cardiomyocytes of the LV of the rat heart.

Keywords: rat, cardiomyocyte, high-fat/high-sucrose diet, cardiomyopathy, extracellular action potential, SK channels