

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-  
квалификационной работы (диссертации)

**Исследование структурно-функциональных характеристик  
кардиомиоцитов при сердечной недостаточности различной этиологии**

Степанов Андрей Валентинович

06.06.01 Биологические науки  
03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители  
к.б.н. Кубасов Игорь Владимирович  
к.б.н. Байдюк Екатерина Викторовна

Санкт-Петербург  
2022

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

Заболевания органов сердечно-сосудистой системы, среди которых одним из самых распространённых является сердечная недостаточность, служат одной из основных причин смертности в большинстве стран мира. При этом клиническая картина сердечной недостаточности весьма сложна в силу существования множества причин и факторов её развития. Одним из заболеваний, ведущих к сердечной недостаточности, является диабетическая кардиомиопатия.

Сахарный диабет (СД) уже является самым распространённым метаболическим заболеванием в мире, и число клинических случаев СД продолжает расти (Дедов, Шестакова, 2003; Викулова и др., 2018). Причинами СД являются либо дефицит инсулина (СД первого типа) из-за подавления его продукции клетками поджелудочной железы, либо резистентность тканей к действию этого гормона (СД второго типа), что ведет к нарушениям метаболизма сахара и жиров (Балаболкин, 2000). На продвинутых стадиях болезни дефицит инсулина и инсулиновая резистентность представлены как при СД первого, так и второго типов. Клинический диагноз СД ставится, когда уровень глюкозы капиллярной крови превышает 6 ммоль/л (в пробах, взятых натощак) или 11 ммоль/л (в пробах, взятых случайным образом вне зависимости от времени последнего приема пищи или в пробах, взятых через 2 часа после приема 75 г глюкозы в тесте на толерантность к глюкозе (ГТТ)). В конце 1990-х годов было установлено, что риск развития СД резко возрастает в популяции людей с промежуточными уровнями глюкозы в крови (пограничная гипергликемия), и термин «преддиабет» был официально рекомендован для использования в клинической практике. Рекомендованы следующие пределы для диагноза пограничной гипергликемии: 5,6-6,0 ммоль/л для глюкозы натощак и 7,8–11 ммоль/л для случайной глюкозы или 2-х часовой глюкозы в ГТТ. Наконец, следует указать на существование периода раннего преддиабета, который может длиться годами, предшествуя клинически выраженному преддиабету. Во время этой стадии нарушение продукции инсулина еще слишком мало, чтобы привести к нарушению метаболизма глюкозы (ранние стадии СД 1-го типа) или резистентность тканей печени и скелетных мышц к инсулину полностью скомпенсирована увеличенной продукцией инсулина (ранние стадии СД 2-го типа) и, опять же, уровень глюкозы в крови продолжает поддерживаться в пределах нормы: 3,3-5,5 ммоль/л для глюкозы натощак и менее 7,8 ммоль/л для случайной глюкозы (Dobretsov et al., 2010; Tabák et al., 2012). Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) – одно из самых серьезных осложнений СД (Моисеев, Киякбаев, 2013; Александров и др., 2014). На своей терминальной стадии болезнь ведет к сердечной недостаточности (СН) и, как результат, к высокой смертности среди пациентов с СД (Соколов, 2002).

ДКМ определяется как нарушения сократительной функции сердца, развивающиеся на фоне диабета при отсутствии макрососудистых

заболеваний (Hölscher et al., 2016). В среднем 12% пациентов с СД страдают от ДКМ, и частота встречаемости этого заболевания достигает 22% в пациентах с СД старше 64 лет (Trachanas et al., 2014). Несмотря на эти достаточно высокие цифры и опасность заболевания, патогенез ДКМ остается далеким от понимания (Rubler et al., 1972; Kannel et al., 1974; Zarich, Nesto, 1989; Boudina, Abel, 2007; Trachanas et al., 2014; Gilca et al., 2017). Развитие ДКМ сопутствует как первому, так и второму типу СД (Hölscher et al., 2016; Gilca et al., 2017). Основываясь на этом, традиционный взгляд заключается в том, что хроническая гипергликемия и ассоциированные с ней окислительный стресс и воспаление лежат в основе всего патогенного каскада ДКМ (Trachanas et al., 2014; Ward, 2014; Seferović, Paulus, 2015; Lorenzo-Almorós et al., 2017; Maack, 2017). Однако частота наблюдений случаев гипертрофии и дисфункции левого желудочка сердца выше, чем в норме, не только у пациентов с острыми формами СД, но и у пациентов с пограничной гипергликемией – клиническим преддиабетом (Celentano et al., 1995; Grundy, 2012; Nunes et al., 2013; Tadic et al., 2015; Huang et al., 2016), у животных с генетическим (Ren et al., 2000) или вызванным жировой диетой преддиабетом (Nunes et al., 2013), а также у пациентов с хорошо контролируемым СД (Castagno et al., 2011).

Таким образом, гипергликемия определенно не является единственным фактором прогрессии ДКМ. Однако вопрос как о триггерных условиях, так и о причинно-следственных связях между специфическими молекулярными и клеточными событиями, определяющими развитие ДКМ, остается открытым (Александров и др., 2014). В значительной степени проблема связана с тем, что большинство существующих данных о ДКМ относится к пациентам с продвинутыми формами СД и ДКМ (стадия выраженной СН), хотя известно, что обоим заболеваниям предшествует длительный преклинический период (Dobretsov et al., 2010; Tabák et al., 2012; Trachanas et al., 2014).

Помимо этого, сахарный диабет повышает и риск развития инфаркта миокарда (ИМ) – заболевания, связанного с нарушением кровообращения и последующим некрозом и фиброзом вовлеченного участка миокарда и независимого риска фактора сердечной недостаточности. С момента диагноза ИМ, сердечная недостаточность ведет к смерти 9-18% пациентов в течение первых 4 недель, тогда как оставшиеся в живых страдают различными формами сердечной недостаточности. Несмотря на несомненный прогресс в разработке новых видов лечения, потребность в поиске эффективных методов уменьшения повреждения сердечной мышцы после инфаркта остается актуальной проблемой. Сам инфаркт сопровождается гибелью кардиомиоцитов в пределах ишемической зоны миокарда. Парадоксально, но ишемическое повреждение еще более усиливается при восстановлении кровотока в инфарктной зоне (феномен ишемии/реперфузии (ИР)). В настоящее время не существует клинически эффективной терапии для уменьшения ишемического-реперфузионного повреждения. В то время как многие препараты продемонстрировали многообещающее снижение повреждения в доклинических исследованиях, не один из этих препаратов не

продемонстрировал преимущества в крупных клинических испытаниях (Chen, Vunjak-Novakovic, 2018). Таким образом, ишемическое-реперфузионное повреждение представляет собой важную проблему современной медицины, понимание патологических основ которой даст возможность разработать адекватные терапевтические подходы.

### **Цель и задачи исследования**

#### **Цель исследования:**

Установить и охарактеризовать структурно-функциональные изменения кардиомиоцитов на моделях стрептозотоцинового сахарного диабета и преддиабета 1-го типа и на модели ишемии-реперфузии.

#### **Задачи исследования:**

1. Смоделировать поражение миокарда в условиях эксперимента *in vivo* при стрептозотоциновом сахарном диабете и преддиабете 1-го типа и при ишемии-реперфузии у лабораторных крыс.
2. Провести исследование особенностей патогенеза стрептозотоцинового сахарного диабета и преддиабета 1-го типа и ишемического-реперфузионного повреждения.
3. Провести сравнительный анализ основных структурно-функциональных изменений кардиомиоцитов на моделях стрептозотоцинового сахарного диабета и преддиабета 1-го типа и на модели ишемии-реперфузии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Использование стрептозотоциновой модели сахарного диабета первого типа на крысах приводило к устойчивым изменениям в параметрах ЭКГ, проявляющимся, главным образом, в увеличении амплитуды зубца Т у крыс с сахарным диабетом через 4 недели после инъекции стрептозотоцина. У крыс с преддиабетом подобных изменений не выявлено.
2. Применение модели ишемии с последующей реперфузией на крысах также характеризовалось изменениями в параметрах ЭКГ, однако они имели обратный характер по сравнению с моделью сахарного диабета и проявлялись в снижении амплитуды зубца Т на сроке 4 недели после операции.
3. Использование стрептозотоцина для индукции сахарного диабета первого типа приводило к изменению регистрируемых электрофизиологических параметров, а именно: возростала доля потенциалов действия (ПД) с выраженной положительной фазой следовой гиперполяризации, также менялось соотношение частоты встречаемости ПД первого и второго типов.
4. В модели ишемии с последующей реперфузией у крыс так же, как и в модели сахарного диабета, отмечались изменения характеристик

электрофизиологических параметров: увеличивалась доля регистраций ПД с выраженной фазой следовой гепирполяризации, однако изменений в распределении разных типов ПД выявлено не было.

5. В стрептозотоциновой модели сахарного диабета первого типа у крыс было показано изменение в организации Т-тубулярного аппарата кардиомиоцитов, проявляющееся в достоверном изменении плотности расположения т-трубочек.
6. В модели ишемии-реперфузии у крыс структурных изменений Т-тубулярного аппарата выявлено не было.
7. Апробированные в данной работе модель стрептозотоцинового сахарного диабета первого типа и модель ишемии миокарда с последующей реперфузией, несмотря на различия механизмов патогенеза, демонстрировали и общие черты, как, например, схожие изменения некоторых исследованных электрофизиологических параметров.

### **Научная новизна исследования**

На основе анализа внеклеточных потенциалов действия на целом сердце впервые показано наличие двух типов ПД, а также впервые показано изменение соотношения их долей на разных моделях сердечной патологии.

Также впервые продемонстрированы изменения в плотности расположения т-трубочек кардиомиоцитов крыс в модели стрептозотоцинового сахарного диабета уже на стадии преддиабета.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

В исследованиях на модели стрептозотоцинового сахарного диабета первого типа было показано, что изменения в организации Т-тубулярного аппарата начинаются уже на стадии преддиабета. Таким образом, можно заключить, что ремоделирование миокарда со всем спектром негативных последствий может начинаться уже на стадиях, когда уровень случайной глюкозы еще в норме и диагноз сахарный диабет еще не поставлен.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты исследования были представлены и обсуждены на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (24-28 мая 2021 года, г. Пущино) и на IX Российской, с международным участием, конференции по управлению движением, посвященной 95-летию со дня рождения И. Б. Козловской (2-4 июня 2022 года, г. Казань).

### **Публикации**

По теме исследования опубликовано 5 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

## **Материалы и методы**

### **Животные**

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой тела 240–460 граммов (4–5 месяцев на момент начала эксперимента). Во время эксперимента животные содержались в виварии Института в стандартных условиях и при свободном доступе к воде и пище. Эксперименты с животными проводились в строгом соответствии с правилами, разработанными и утвержденными локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (30.12.2015 г.), а также согласно правилам и требованиям, предусмотренным директивой 1986 г. Европейского парламента (European Communities Council Directive, 1986) и изложенными в «Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных» (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

### **Экспериментальная модель сахарного диабета (СД)**

В работе была использована хорошо изученная и охарактеризованная модель стрептозотоцинового СД первого типа у крыс линии «Вистар» (Dobretsov et al., 2010). Токсин стрептозотозин (СТЗ) вводился в дозе 30, 45 и 55 мг/кг веса животного интраперитонеально, и развитие и тяжесть диабета подтверждались измерениями случайной глюкозы и глюкозы натощак в пробах капиллярной крови животных, взятых на 3-й, 7-й, 14-й и 28-й день и в последний день эксперимента (перед забоем животных). Стадия СД определялась индивидуально для каждого животного путём измерения случайной глюкозы и с помощью критериев для определения клинического СД и преддиабета, а именно: стадии установившегося преддиабета и СД определялись как состояния, при которых случайная глюкоза в крови составляла 7,8–11 ммоль/л или превышала 11 ммоль/л соответственно.

### **Экспериментальная модель ишемии-реперфузии**

Операция по коронароокклюзии с последующей реперфузией (ИР) выполнялась на животных, наркотизированных с помощью золетила (10 мг/кг веса) и ксилазином (1,5 мл/кг веса). В ИР-группе животных лигатура накладывалась на ветвь левой коронарной артерии и ослаблялась через 45 минут после окклюзии артерии. У ложнооперированных животных (ЛО-группа) лигатура вокруг левой ветви коронарной артерии размещалась в точности, как и в случае ИР-крыс, но без окклюзии артерии. Для проведения искусственной вентиляции легких с помощью аппарата ИВЛ (Kent Scientific TOPOTM Dual Mode Ventilator; частота дыхания – 50/мин, дыхательный объем в пределах от 1,5 до 3 мл/ 100 г массы) проводилась интубация трахеи с предварительной обработкой гортани 2% раствором лидокаина. Оценка эффективности наложения лигатуры в ходе операции осуществлялась с помощью непрерывной регистрации электрокардиограммы в стандартных отведениях (электрокардиограф для ветеринарии Поли-Спектр -8/В) с отслеживанием скорости и формы подъема сегмента ST в 1 и 2 отведениях. Окклюзия артерии подтверждалась подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда сопровождалась возвращением сегмента ST к изолинии.

Изоляция сердца для исследований проводилась на сроках 24 часа, 2 недели и 4 недели после ИР.

### **Регистрация ЭКГ**

ЭКГ измерения проводились на крысах, обездвиженных с помощью ингаляции изофлурана в начале эксперимента и далее в конце 2-й и 4-й недель опытов в модели СД и в конце 4-й недели в модели ишемии-реперфузии. Ингаляционная анестезия была выбрана в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями для проведения электрокардиографических исследований на крысах (Murakami et al., 2014). Крыс размещали брюхом вниз на термостатируемом столике (температура поверхности 38°C). Ректальная температура тела животного измерялась с помощью термодатчика. Для регистрации ЭКГ использовали подкожные монополярные игольчатые электроды «S50716», которые размещались на конечностях животных подкожно. Регистрацию электрокардиограмм у крыс проводили на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр-8/В» («Нейрософт», Россия) с использованием программного обеспечения «Поли-Спектр.NET» с дополнительным модулем «Поли-Спектр.NET/Ветеринария». Снимали три стандартных I, II, III отведения. Запись электрокардиограммы проводили в течении пяти минут. Для выполнения дополнительного анализа данных, включающего такие возможности, как усреднение нескольких последовательных QRS комплексов и построение гистограмм RR интервалов был использован разработанный нами новый программный модуль, позволяющий открывать и работать с Поли-Спектр файлами (MatLab 2018).

### **Внеклеточная регистрация потенциалов действия**

Все эксперименты проводились на левых желудочках (ЛЖ) изолированных сердец крыс в условиях сохраненного синусового ритма и при постоянной перфузии аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа. Животных анестезировали с помощью раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой микроэлектродной регистрации (Kubasov et al, 2018). Перфузионный раствор представлял собой аэрированный раствор Тироде со следующим составом: 140 мМ/л NaCl, 4.5 мМ/л KCl, 1 мМ/л CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ/л MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ/л HEPES, 10 мМ/л глюкозы, pH 7.40-7.45. Эксперименты проводили при температуре 38°C путём контролируемого подогрева перфузирующего раствора. Изготовление микроэлектродов с диаметром кончика 4.5-5.0 мкм производили с использованием программируемого пуллера (Sutter Instr., Model P-1000, США). Микроэлектрод заполняли раствором Тироде. Сопротивление кончика микроэлектрода составляло около 2 МоМ. Устранение сократительных ответов обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутандион монооксида в концентрации 20 мМ. Микроэлектрод, подключенный к входу усилителя AM-1500 (National Instruments, США), подводили к поверхности сердца при помощи

микроманипулятора NMH-21 (Narishige, Япония). 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 регистрировались авторитмические систолические внеклеточные потенциалы действия (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 последовательных внеклеточных ПД кардиомиоцитов от данного сайта, кончик микропипетки перемещался с шагом 50-100 мкм в соседний сайт данного локуса поверхности желудочка. Размер каждого локуса составлял  $\approx 500 \times 500$  мкм. В среднем в каждом эксперименте выполнялось картирование 5 -10 локусов с аналогичным числом регистрируемых сайтов в пределах исследуемого локуса. Все представленные треки внеклеточных ПД были нормированы к величине амплитуды первого негативного пика.

### **Конфокальная микроскопия, структурные изменения в Т-системе**

Механические сократительные ответы сердца во время проведения этих исследований были блокированы добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутандион монооксида. Для исследований т-трубочек, клетки миокарда были прокрашены флуоресцентным красителем Di-8-ANEPPS (20  $\mu$ M). В исследовании использовался инвертированный лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5, оборудованный резонансным сканнером (8000 Hz) и 20 - 60x (NA = 1.3) объективами (Leica, Germany, Wetzlar) и специальные чашки Петри с тонким (180 микрон) стеклянным дном (ibidi). Для исследования поверхностных кардиомиоцитов под эпикардом изолированное сердце помещалось в чашку Петри левым желудочком в сторону объектива микроскопа.

Для облучения образца использовали аргоновый лазер (488 нм длина волны при 80% мощности). Регистрация флуоресцентных сигналов велась с использованием 493nm-540nm (Fluo-4) и 600nm-690nm (Di-8-ANEPPS) оптических фильтров. Чувствительность PMT детектора подбирались индивидуально для каждого случая, чтобы сигнал находился в пределах линейного диапазона детектора. Диаметр входного зрачка (pinhole) системы составлял 100 микрон. В каждом эксперименте флуоресцентный сигнал регистрировался в нескольких произвольно выбранных полях наблюдения в пределах первого слоя кардиомиоцитов препарата (районах интереса). В отдельных случаях до 50 конфокальных срезов вглубь выбранного района было получено для последующей 3D-реконструкции данного района.

### **Структурные изменения в Т-системе кардиомиоцитов**

В каждом эксперименте снимки 7 – 15 случайно выбранных полей на поверхности препарата сердца, окрашенного Di-8-ANEPPS (205 x 205  $\mu$ m; 5 пикселей/ $\mu$ m) были получены и сохранены на жестком диске компьютера. Каждый из полученных снимков был подвергнут обработке с использованием



программного пакета Fiji – ImageJ (National Institutes of Health, США) для выявления профилей t-трубочек (точек в пределах миоцита с максимальной интенсивностью прокраски). Затем продольная линия (ROI) толщиной в 1  $\mu\text{m}$  была проведена параллельно основной оси посередине миоцита, причём линия проводилась так, что не пересекала ядра клетки, районы клетки в которых t-трубочки отсутствуют.

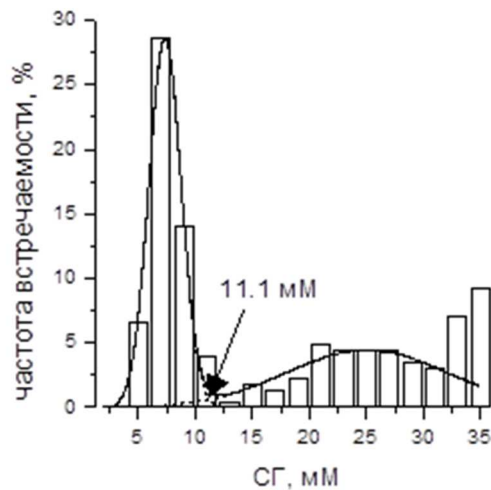
Далее с использованием Fiji – ImageJ «Plot profile» алгоритма и специально написанной для этой цели программы (Microsoft Excel Visual Basic) для каждого миоцита, полностью представленного в пределах данного изображения, вычислялись интервалы между профилями соседних t-трубочек в пределах выбранного ROI и строилось частотное распределение интервалов между соседними трубочками (ИСТ) клетки. Наконец, среднее распределение ИСТ рассчитывалось на основе всех полученных индивидуальных распределений, которое и использовалось для анализа регулярности организации t-трубочек в миоцитах данного препарата (Kubasov et al., 2020).

## **Результаты и обсуждение**

### **Модель СД и преддиабета 1-го типа**

Всего в работе было исследовано 383 крысы (123 контрольных и 260 СТЗ). Выборки контрольных и СТЗ крыс не различались по начальному весу животных:  $331.7 \pm 5.2$  и  $340.8 \pm 3.0$  граммов (контроль и СТЗ крысы, соответственно;  $p = 0.231$ , U-критерий Манна — Уитни). Средний уровень начальной глюкозы, однако, был немного, но статистически значимо выше в СТЗ-группе крыс ( $6.12 \pm 0.05$  мМ), чем в контроле ( $5.87 \pm 0.06$  мМ,  $p = 0.002$ ; t-критерий Стьюдента).

На протяжении 1-4 недель эксперимента случайная глюкоза контрольных животных поддерживалась на низком уровне, достоверно не отличающемся от исходного значения ( $p > 0.05$ ; Kruskal-Wallis /Dunn's post-hoc tests). В отличие от контроля, крысы, получившие инъекцию СТЗ, развили стабильную гипергликемию (ГГ), средний уровень случайной глюкозы, измеренный на 3-й день после инъекции СТЗ, составлял  $17.3 \pm 0.6$  мМ. Анализ распределений значения случайной глюкозы этих животных выявил существование двух подгрупп СТЗ-крыс – животных, развивших умеренную и острую гипергликемию. Удовлетворительная аппроксимация распределения уровней глюкозы СТЗ крыс требовала использования двух независимых кривых Гаусса (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Нормализованное к общему количеству исследованных животных частотное распределение случайной глюкозы (СГ) в экспериментах с СТЗ-крысами. Кривые линии показывают результат аппроксимации распределения суммой двух Гауссовых кривых. Стрелка указывает на точку пересечения линий, аппроксимирующих индивидуальные компоненты распределения.

Использованный нами в экспериментах на крысиных моделях и принятый в клинике как один из диагностических критериев для определения диабета порог в 11 мМ случайной глюкозы (Dobretsov et al., 2010), оказывается очень близок к концентрации глюкозы, при которой пересекаются Гауссовы кривые, описывающие индивидуальные компоненты в общем распределении уровней случайной глюкозы в крови 2-4 недельных СТЗ-крыс (Рис. 1, стрелка 11.1 мМ). Насколько нам известно, эти данные впервые представляют объективное свидетельство в пользу того, что уровень гипергликемии (ГГ), при которой достигается верхний предел скорости обратной фильтрации глюкозы почками человека (Gerich, 2010), является адекватным для диагноза диабета и в крысиной модели СД.

В соответствии с этим, СТЗ-крысы с уровнем случайной глюкозы, превышающим 11 мМ, были классифицированы нами, как диабетические («гипергликемичные», СТЗ-ГГ) крысы. Ожидаемо, частота встречаемости СТЗ-ГГ крыс возрастала в зависимости от использованной дозы СТЗ. Более того, была обнаружена достоверная линейная зависимость между процентной долей СТЗ-ГГ крыс и средним уровнем глюкозы в группах животных, сортированных согласно использованной дозе СТЗ. Все СТЗ-крысы, не развившие гипергликемию (СГ <11 мМ), были определены нами как преддиабетические («нормогликемичные», СТЗ-НГ) крысы.

### **Электрокардиографическое исследование**

Параметрами ЭКГ, которые были проанализированы и сравнены между разными группами животных и на разные дни исследования были величины основных зубцов кардиограммы: P, Q, R, S и T, длительность PQ, RR, QT и QTc (скорректированный в соответствии с ЧСС QT интервал) интервалов,

длительность QRS комплекса, а также частота сердечных сокращений (ЧСС) и несколько характеристик регулярности сердечного ритма: стандартное отклонение RR интервалов от средней (SDRR), процент RR-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущего более чем на 3 мс (pNN3) и стандартные отклонения средних значений ЧСС и RR-интервалов, вычисленных по 1-минутным сегментам записи (SDAvgHR и SDAvgRR, соответственно). Эти параметры были выбраны на основе предыдущих ЭКГ исследований грызунов в том числе в моделях сахарного диабета грызунов (Konopelski, Ufnal, 2016; Морозова и др., 2019).

**В модели СД и предиабета 1-го типа** было исследовано 39 контрольных, 52 СТЗ-НГ и 52 СТЗ-ГГ перед введением СТЗ и на 14-й день эксперимента, из них 26, 46 и 38 животных соответственно были исследованы также и на 28-й день.

Ни по одному из указанных ранее параметров ЭКГ СТЗ-НГ крыс не отличались от ЭКГ контрольных животных. СТЗ-ГГ крысы уже начиная со второй недели эксперимента демонстрировали прогрессивную брадикардию и к четвёртой неделе эксперимента статистически значимое увеличение Т-зубца ЭКГ ( $0.108 \pm 0.006$  мВ против  $0.057 \pm 0.005$  мВ, в контроле,  $p < 0.05$ ). При этом не было замечено никаких признаков аритмии.

Увеличение зубца Т ЭКГ является общим индикатором десинхронизации и замедления реполяризации желудочков сердца (Di Bernardo, Murray, 2000). Множество причин могут быть ответственны за такое развитие событий. В частности, при диабете замедление реполяризации желудочков может быть вызвано гиперкалиемией, нарушением в активности и/или экспрессии  $K^+$ -каналов и нарушениями в контроле внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (Яковенко, 2009; Goldberger et al., 2013; Konopelski & Ufnal, 2016).

Вне зависимости от специфического патогенного механизма, полученные нами данные показывают, что хроническая гипергликемия является, по-видимому, необходимым условием развития детектируемых изменений в параметрах Т-зубца ЭКГ крыс. По крайней мере в исследованных интервалах времени ЭКГ СТЗ-НГ крыс не отличалась по этому параметру от ЭКГ контрольных животных. В тоже время в группе СТЗ-ГГ крыс нарушения в Т-зубце, и значит скорости реполяризации миокарда, начинают развиваться уже после двух недель хронической гипергликемии.

**В модели ишемии-реперфузии** было исследовано 16 животных. ЭКГ были сняты непосредственно перед операцией и через 4 недели после. Основное изменение в ЭКГ относительно исходных данных заключалось в достоверном снижении амплитуды зубца Т ( $0,05 \pm 0,008$  мВ против  $0,12 \pm 0,015$  мВ в контроле,  $p < 0.05$ ). Также отмечалась тенденция к снижению амплитуды зубца R.

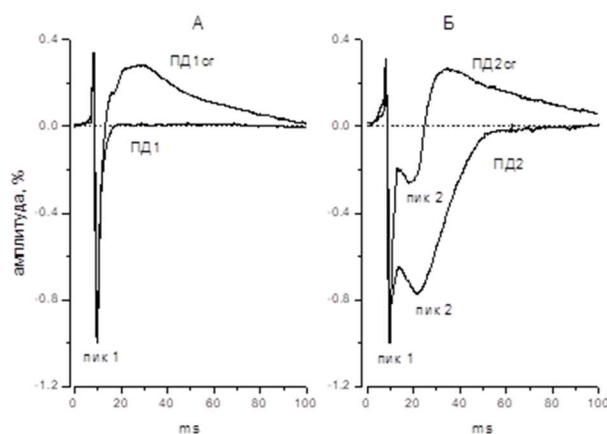
Подобные изменения в ЭКГ связаны, скорее всего, с процессами формирования рубцовой ткани в зоне некроза и с последующим ремоделированием миокарда. Зубцы R и Т отражают процессы деполяризации и реполяризации соответственно. Снижение их амплитуды может быть

результатом «выключения» части миокарда из этих процессов (Синьков, Синькова, 2015).

Аналогичных изменений ЭКГ у ложнооперированных крыс выявлено не было.

### Электрофизиологический анализ внеклеточных ПД желудочков изолированного сердца крысы

Как уже было показано нами ранее, внеклеточные ПД, регистрируемые от субэпикардиальных миоцитов ЛЖ изолированного сердца крысы с использованием микроэлектродов с узким кончиком (наружный диаметр - 5 мкм) формируют две группы сигналов (Kubasov et al, 2018). ПД 1-го типа (ПД1) характеризуются наличием одного быстрого негативного пика, тогда как сигналы 2-го типа (ПД2) характеризуются наличием двух негативных пиков: быстрого первого пика и значительно более медленного и вариабельного как по амплитуде, так и по временным параметрам 2-го пика (Рис. 2).



**Рисунок 2.** Примеры разных типов внеклеточных потенциалов.

А – примеры ПД1 и ПД1сг сигналов;

Б – примеры ПД2 и ПД2сг сигналов.

Первый и второй (когда присутствует) негативные пики сигнала пронумерованы – цифры около соответствующего пика.

Все существующие на текущий момент данные указывают на то, что второй негативный пик ПД2 формируется за счет тока L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, локализованных в Т-системе кардиомиоцита и, соответственно, выраженность этого компонента ПД2 определяется количеством выходов и разветвленностью t-трубочек, находящихся под кончиком внеклеточного микроэлектрода в области отведения. Кинетика спада негативного второго пика ПД определяется не только кинетикой инактивации кальциевого тока, но и активацией других ионных механизмов. Однако, встречались и однопиковые, и двухпиковые ПД, не монотонно спадающие к базовой линии по окончании фазы деполяризации, но завершающиеся выраженной фазой следовой гиперполяризации (ПД1сг и ПД2сг, Рис. 2). Более того, если в

контроле такие ПД наблюдались редко лишь (в примерно 7% от всех ПД регистраций), то в **диабетических и преддиабетических** сердцах количество регистраций ПДсг резко увеличивалось уже начиная со второй недели экспериментов. Наши эксперименты подтвердили существенное увеличение ПДсг пропорции сигналов среди сигналов, регистрируемых от клеток СТЗ-ГГ крыс. Возрастало также и количество ПД1 сигналов при пропорциональном снижении количества ПД2 сигналов. Помимо этого, у СТЗ-ГГ-крыс отмечались изменения кинетики как ПД1, так и ПД2. Соответствующие изменения длительности этих классов ПД носили диаметрально противоположный характер: ПД1 замедлялись (длительность T90 возрастала), тогда как длительность ПД2 была снижена в СТЗ-крысах по сравнению с контролем.

Достоверное увеличение количества ПД1 и снижение количества ПД2 регистраций наблюдались также и в этих экспериментах с сердцами СТЗ-НГ крыс, что соответствует нашей интерпретации этих сигналов и хорошо совпадает с нашими данными, указывающими на снижение плотности t-трубочек на поверхностной мембране кардиомиоцитов ЛЖ уже на преддиабетической стадии (см. далее).

Природа этой фазы следовой гиперполяризации ПД была нами исследована в экспериментах с локальной доставкой блокаторов к месту регистрации различных потенциально вовлеченных ионных механизмов на препаратах сердец СТЗ-ГГ крыс. Мы протестировали блокатор потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов 4-аминопиридина (4-AP), блокатор кальций-активируемых калиевых каналов низкой проводимости (SK каналов) апамин, натрий-кальциевого обменника SN-6, блокатор АТФ-зависимых  $K^+$ -каналов глибенкламид и натрий-калиевой АТФ-азы оубаин. Эксперименты проводились по методике локальной доставки соответствующих блокаторов к сайту регистрации внеклеточных ПД путем их включения в состав заполняющего микроэлектрод раствора. Эффективность действия соответствующего блокатора оценивалась на основе изменения параметров следовой гиперполяризации в течение 30-и минутной непрерывной регистрации внеклеточных ПД от одного и того же сайта. Предварительно нами была исследована динамика изменения профилей внеклеточных ПД миоцитов ЛЖ при их длительной регистрации от одного сайта (30 минут) микроэлектродами, заполненными стандартным внеклеточным раствором. Эти эксперименты показали, что сама по себе непрерывная 30-минутная регистрация с помощью пипетки, заполненной стандартным раствором, не приводит к изменению или амплитудных или временных характеристик внеклеточных сигналов (исследовано 5 сайтов 3-х контрольных крыс и 2-х СТЗ-инъектированных крыс).

В таких же экспериментах с локальной перфузией места регистрации с использованием специфических блокаторов различных электрогенных механизмов, которые могли бы принимать участие в формировании заключительных фаз ПД, только перфузия с апамином (500 нМ), сопровождалась постепенным подавлением фазы следовой гиперполяризации

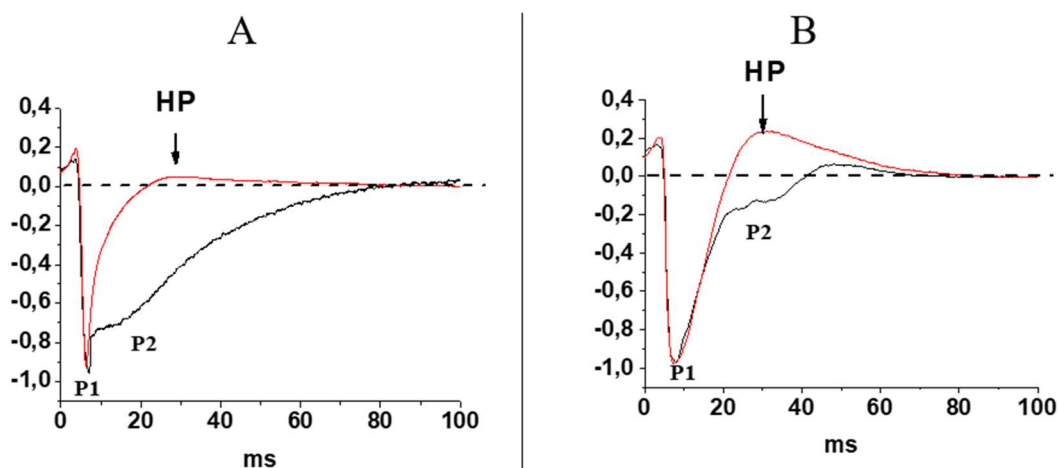
ПД1сг и ПД2сг, но не классических ПД1 или ПД2. Эти данные указывают на то, что фаза следовой гиперполяризации определяется активацией апамин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов низкой проводимости (Grunnet et al., 2001), активность/экспрессия которых стабильно (2-4 недели) увеличена в кардиомиоцитах СТЗ-ГГ крыс. Глибенкламид,  $\text{BaCl}_2$  и убаин не влияли на фазу следовой гиперполяризации или вообще на временные характеристики/форму ПД, что указывает на то, что активности чувствительных к блоку, соответственно, глибенкламидом,  $\text{BaCl}_2$  и убаином АТФ-зависимых  $\text{K}^+$ -каналов,  $\text{K}^+$ -каналов тока обратного выпрямления (IK1) и натрий-калиевой АТФазы не являются принципиальными для формирования волны внеклеточных ПД кардиомиоцитов.

**В модели ишемии-реперфузии** в электрофизиологических экспериментах были исследованы изолированные сердца ЛО-крыс (5 крыс), сердца крыс через 24 часа после ИР (6 крыс), через 2 недели (3 крысы) и через 4 недели (4 крыс) после ИР.

Профили ПД от кардиомиоцитов ЛЖ сердца ЛО-группы крыс представляли собой также сигналы двух типов. Сигналы первого типа (ПД1), характеризующиеся наличием одного быстрого негативного пика, встречались относительно редко ( $15.2 \pm 2.1$  % от всех регистраций, 5 крыс). Значительно чаще регистрировались ПД второго типа (ПД2), 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 ( $85.4 \pm 3.2$  % от всех регистраций, 5 крыс). Средние значения времени спада до 90 % до базовой линии (T90) ПД1 и ПД2 ЛО-крыс составляли  $6.05 \pm 0.65$  и  $41.4 \pm 6.5$  мс, соответственно. Это близко к значениям, полученным нами ранее у контрольных крыс.

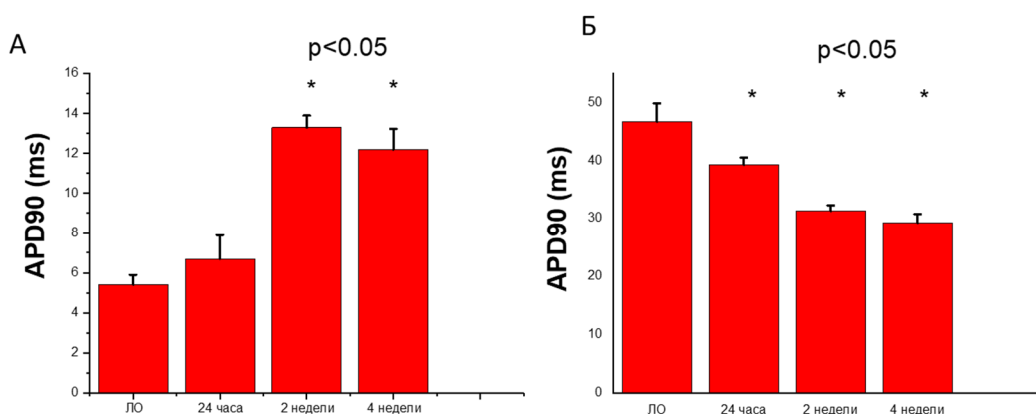
Спустя сутки после ИР наблюдалось достоверные изменения ряда исследуемых параметров ПД1 и ПД2 кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ. Так, у ПД1 после его окончания отчетливо наблюдалось появление позитивной фазы следовой гиперполяризации (СГ) и снижение амплитуды второго пика ПД2 (Рис.3).

Через четыре недели после ИР указанные изменения достигали максимальных значений с одновременным увеличением длительности T90 ПД1. При этом следовая гиперполяризация наблюдалась и у ПД2. Частота встречаемости ПД1 и ПД2 на всех сроках после ИР достоверно не отличалась от значений ЛО-крыс ( $p > 0.05$ ) и составляла в среднем  $17.2 \pm 3.1\%$  и  $83.4 \pm 6.2\%$ .



**Рисунок 3.** Примеры ПД1 (красные треки) и ПД2 (черные треки) кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ крысы через 24 часа (А) и 4 недели (Б) после ИР. НР – следовая гиперполяризация.

Изменения в электрогенезе кардиомиоцитов субэпикарда значительно растянуты во времени. Начиная с 24 часов и до четырёх недель после ИР происходило увеличение длительности Т90 ПД1 ( $5.4 \pm 0.5$  мс,  $6,7 \pm 1,2$  мс,  $13,3 \pm 0,6$  мс и  $12,2 \pm 1,04$  мс у ЛО-крыс, через 24 часа, через 2 недели и 4 недели после ИР соответственно) и амплитуды позитивной фазы СГ. На этом же сроке отмечается выраженная СГ и у ПД2. Так же к четвёртой неделе выявляется достоверное укорочение Т90 ПД2 по сравнению с ЛО-крысами ( $46,7 \pm 3,2$  мс,  $39,3 \pm 1,2$  мс,  $31,3 \pm 1,04$  мс и  $29,3 \pm 1,5$  мс у ЛО-крыс, через 24 часа, через 2 недели и 4 недели после ИР соответственно) (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Динамика Т90 в ПД1 (А) и в ПД2 (Б).

Как отмечалось ранее, с использованием данного метода в сердцах контрольных животных регистрировались сигналы двух, различных по количеству негативных пиков типов ПД: вПД1 и вПД2. 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 (Kubasov et al, 2018) 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) т-трубочек. А именно, ПД1 регистрируются в тех случаях, когда электрод был помещен в локус клетки, не содержащий устьев т-трубочек и, соответственно, его основной негативный пик формируется токами, генерируемыми электрогенными механизмами поверхностной мембраны клетки: в основном, 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 т-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,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа,  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обменник и некоторые подтипы  $\text{K}^{+}$ -каналов (Brette, Orchard, 2017). Работа каких конкретно ионных механизмов претерпевает изменения, приводя к продлению спада вПД1, снижению амплитуды второго пика вПД2 и появлению СГ после ИР, предстоит еще выяснить.

Наши результаты на модели СД, речь о которых шла ранее в этом разделе, показывают, что патогенез СТЗ-СД приводит к активации (возможно, компенсаторно)  $\text{K}^{+}$ -каналов реполяризационного резерва, обеспечивающего появление/усиление фазы следовой гиперполяризации. В частности, такими каналами могут быть апамин-чувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^{+}$ -каналы низкой проводимости (SK каналы) (Кубасов и др., 2021).

Имеющий место в представленных результатах рост следовой гиперполяризации после ИР также может быть связан с экспрессией SK каналов в желудочковых кардиомиоцитах, что подтверждается рядом работ других авторов, выполненных на сердцах человека и ряда животных моделей с сердечной недостаточностью и после инфаркта (Chang et al, 2013; Chua et al, 2011; Gui et al, 2013; Bonilla et al, 2014).

Важным различием в ремоделирования ПД после ИР по сравнению с ДКМ заключается в том, что частота встречаемости ПД1 и ПД2 после ИР не изменялась, тогда как при развитии стрептозотоцинового диабета наблюдалось существенный рост числа регистраций ПД1 и снижение числа регистраций ПД2. Рост числа регистраций ПД1 и снижение числа регистраций ПД2 при СТЗ-СД ассоциирован с дезорганизацией Т-системы кардиомиоцитов и уменьшением плотности устьев т-трубочек на поверхности. Отсутствие таких изменений может свидетельствовать об отсутствии морфологических изменений в этом мембранном компартменте субэпикардальных кардиомиоцитах после ИР. Такие же выводы следуют из анализа распределения и структурных изменений т-трубочек кардиомиоцитов изолированного сердца с использованием конфокальной микроскопии. Что касается существенного увеличения на этом фоне Т90 у ПД1 и снижения



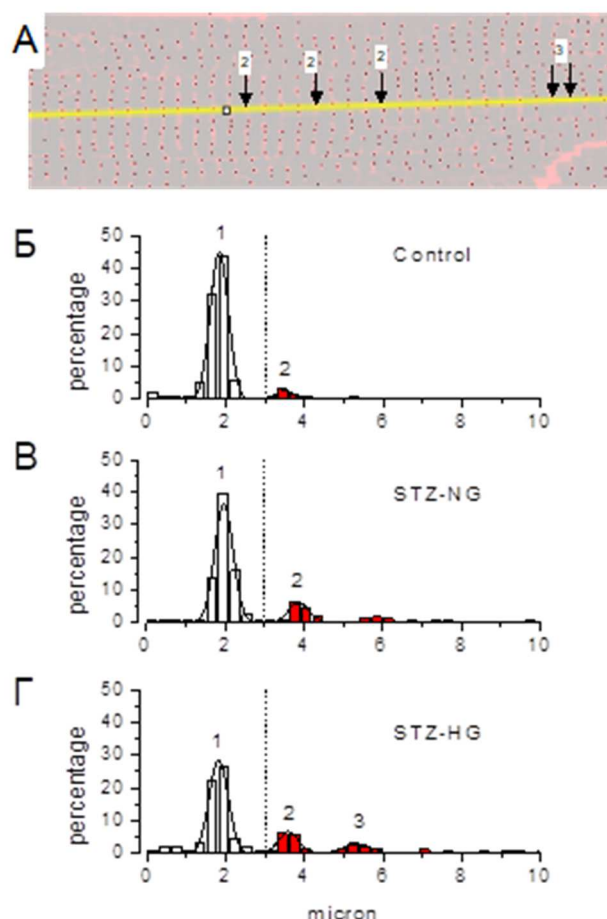
амплитуды второго пика у ПД<sub>2</sub>, можно предположить увеличение доли потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа на поверхностной мембране и снижением этой доли в мембране тубулярного компартмента кардиомиоцитов.

### **Структурные изменения в Т-системе кардиомиоцитов**

Как уже указывалось, форма внеклеточно регистрируемых ПД представляется тесно увязанной с состоянием Т-тубулярного аппарата миоцита и, в частности, со структурной целостностью этой важной для сердечной клетки системы.

Анализ организации Т-тубулярного аппарата производился на основе оценки распределения длин интервалов между соседними трубочками (ИСТ). Интерпретация ИСТ распределений следует из того, что в нормальных кардиомиоцитах т-трубочки организованы в регулярные, параллельные саркомерам сети (Louch et al., 2010; Wei et al., 2010). Так, большинство интервалов между соседними т-трубочками вдоль основной оси миоцита должно группироваться в пределах 1.7 – 2.2 мкм, соответствующих длинам саркомеров изолированных кардиомиоцитов и миоцитов изолированного сердца крысы (Bub et al., 2010; Chen et al., 2015), что и наблюдалось в наших экспериментах. В контроле и на второй неделе СТЗ-НГ или СТЗ-ГГ средний ИСТ находился в пределах 1.84- 2 мкм.

С учетом вышесказанного, при сравнении контрольных и СТЗ-инъецированных животных на данном этапе исследования мы сфокусировали наше внимание на анализе распределения длин ИСТ. На рисунке 5 представлен пример распределения дин ИСТ.



**Рисунок 5.** Анализ и примеры частотных распределений интервалов между соседними т-трубочками (ИСТ) в кардиомиоцитах ЛЖ контрольных, СТЗ-ПД и СТЗ-СД крыс.

А. Показан сегмент кардиомиоцита (наложение исходного рисунка и рисунка, обработанного для выявления профилей т-трубочек – черные пиксели) с продольным линейным районом интереса (желтая линия) шириной в 1 микрон. ИСТ рассчитывались вдоль линии как расстояние между соседними пикселями, находящимися частично или полностью в пределах линии.

Б-Г. Примеры усредненных частотных распределений ИСТ (20-30 клеток на ЛЖ) и их анализа. Последний включал в себя аппроксимацию индивидуальных распределений двумя или, если, необходимо более Гауссовыми кривыми для получения характеристик (площадь и центр) первого и второго пиков распределения, и анализ площади правого хвоста распределения (процент встречаемости ИСТ с длиной более, чем 3  $\mu\text{m}$  (вертикальная штриховая линия и красные столбики гистограммы)).

В экспериментах, направленных на изучение целостности структуры Т-тубулярного аппарата кардиомиоцитов, нами были изучены кардиомиоциты ЛЖ 12 контрольных, 13 СТЗ-ПД и 13 СТЗ-СД крыс. Проведённый анализ распределения длин ИСТ показал, что доля ИСТ, длина которых превышала 3  $\mu\text{m}$  (правый «красный» хвост на гистограммах

распределения, рис. 5 Б-Г), достоверно была выше у СТЗ-НГ и СТЗ-ГГ крыс на четвертой неделе после инъекции СТЗ по сравнению с контролем ( $26.6 \pm 4.6\%$  и  $34.5 \pm 3.3\%$  против  $10.2 \pm 1.1\%$  соответственно,  $p < 0.05$ ). На сроке две недели после инъекции СТЗ достоверных отличий не было.

Что представляется важным и новым – это данные, демонстрирующие, что как диабетическое, так и преддиабетическое состояние животных ассоциировано с дезорганизацией Т-системы в ЛЖ, выраженной в достоверном увеличении количества длинных, более 3  $\mu\text{m}$ , ИСТ в кардиомиоцитах крыс в 4-х недельных экспериментах. Таким образом, нам представляется, что хроническая гипергликемия не является ведущим фактором ранней деструктуризации Т-системы в использованных моделях преддиабета и СД.

В модели **ишемии-реперфузии** анализ распределения длин ИСТ не выявил достоверных отличий через четыре недели после ИР у экспериментальных животных по сравнению с контролем и группой ЛО-крыс. Эти данные отчасти согласуются с данными, полученными при электрофизиологическом исследовании: отсутствие отличий в распределении ПД1 и ПД2 у экспериментальных животных по сравнению с ЛО-крысами. Несмотря на тот факт, что ремоделирование Т-тубулярного аппарата сопровождается многие патологии миокарда, отсутствие достоверных отличий на данном этапе работы в распределении длин ИСТ может быть обусловлено небольшим размером выборки (4 ИР-крысы и 3 ЛО-крысы), а также высокой вариабельностью степени поражения миокарда в модели ИР.

## Выводы

1. Использование стрептозотоциновой модели сахарного диабета первого типа на крысах приводит к устойчивым изменениям в параметрах ЭКГ, которые заключаются в увеличении амплитуды зубца Т у крыс с сахарным диабетом через 4 недели после инъекции СТЗ. У крыс с преддиабетом подобных изменений не выявлено.
2. Применение модели ишемии с последующей реперфузией на крысах также характеризовалось изменениями в параметрах ЭКГ, однако они имели обратный характер по сравнению с моделью сахарного диабета и проявлялись в снижении амплитуды зубца Т на сроке 4 недели после операции.
3. Использование стрептозотоцина для индукции сахарного диабета первого типа приводило к изменению регистрируемых электрофизиологических параметров, а именно: возростала доля потенциалов действия (ПД) с выраженной положительной фазой следовой гиперполяризации, также менялось соотношение частоты встречаемости ПД первого и второго типов. Отмечалась тенденция к изменению временных параметров ПД.

4. В модели ишемии с последующей реперфузией у крыс так же, как и в модели сахарного диабета, отмечались изменения характеристик электрофизиологических параметров: увеличивалась доля регистраций ПД с выраженной фазой следовой гиперполяризации, менялись временные параметры ПД, однако изменений в распределении разных типов ПД выявлено не было.

5. В стрептозотоциновой модели сахарного диабета первого типа у крыс было показано изменение в организации Т-тубулярного аппарата кардиомиоцитов, проявляющееся в достоверном изменении плотности расположения т-трубочек, при этом как диабетическое, так и преддиабетическое состояние животных ассоциировано с дезорганизацией Т-системы в ЛЖ.

6. По сравнению с моделью сахарного диабета, в модели ишемии-реперфузии у крыс структурных изменений Т-тубулярного аппарата выявлено не было.

7. Апробированные в данной работе модель стрептозотоцинового сахарного диабета первого типа и модель ишемии миокарда с последующей реперфузией, несмотря на различия механизмов патогенеза, демонстрировали и общие черты, как, например схожие изменения некоторых исследованных электрофизиологических параметров. Основное отличие заключалось в отсутствии признаков ремоделирования Т-системы, что, скорее всего, объясняло и отсутствие изменений в распределении разных типов ПД.

### **Список публикаций по теме диссертации**

#### *Статьи*

1. И.В. Кубасов, А.В. Степанов, Ш. Дерке. Полиморфизм внеклеточных потенциалов действия в условиях их микроэлектродной регистрации от поверхности изолированного сердца крысы. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2017. 53(6):456-459.

2. I.V. Kubasov, A. Stepanov, D. Bobkov, P.B. Radwanski, M.A. Terpilowski, M. Dobretsov, S. Gyorke. Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. Frontiers in Physiology. 2018. 9(61).

3. Е.В. Байдюк, Д.Е. Бобков, А.В. Степанов, Ш. Дерке, Г.А. Сакута. Митохондриальный аппарат кардиомиоцитов в норме и при патологии: структура, пространственная организация и роль кальция. Цитология. 2017. 59(10):643-653.

4. Kubasov I.V., Bobkov D.E., Stepanov A.V., Sukhov I.B., Chistyakova O.V., Dobretsov M.G. Evaluation of the T-System of Rat Cardiomyocytes during Early

Stages of Streptozotocin-Induced Diabetes. Russian Journal of Physiology. 2020. 106(9): 1098—1108.

5. И.В. Кубасов, А.В. Степанов, А.А. Панов, О.В. Чистякова, И.Б. Сухов, М.Г. Добрецов. Роль калиевых токов в формировании фазы следовой гиперполяризации внеклеточных потенциалов действия венстрикулярных кардиомиоцитов крысы в норме и при стрептозотоциновом сахарном диабете. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2021, том 107, № 12, с. 1–14.

### *Тезисы*

1. D. Bobkov, A. Stepanov, G. Sakuta, I. Kubasov, S. Gyorke. Visualization of disruption of cardiac T-tubule structure in intact myocardium during acute interstitial edema. Сборник тезисов 1-ой школы ADFLIM для молодых ученых, аспирантов и студентов. 2016. — С. 3.

2. М.Г. Добрецов, И.В. Кубасов, И.Б. Сухов, О.В. Чистякова, Е.В. Новикова, Ю.А. Филиппов, А.В. Степанов, А.А. Панов. Анализ изменений электрокардиограммы и структурно-функциональных характеристик кардиомиоцитов сердца крысы на ранних стадиях стрептозотоцинового диабета. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020. 56(7):574

3. А.В. Степанов, И.В. Кубасов, А.А. Панов, О.В. Чистякова, И.Б. Сухов, А.О. Шпаков, М.Г. Добрецов. Стрептозотоциновый диабет 1-го типа у крыс и апамин-чувствительные токи в венстрикулярных кардиомиоцитах. Статьи по материалам Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино. 2021. Т. 1, с. 258- 262.

4. Филиппов Ю.А., Добрецов М.Г., Новикова Е.В., Степанов А.В., Кубасов И.В., Панов А.А., Сухов И.Б., Чистякова О.В. Анализ гомеостаза внутриклеточного кальция и сократимости изолированных кардиомиоцитов крыс с преддиабетом и диабетом 1 типа. ИНТЕГРАТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (8-10 декабря 2021 г.). –Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2021.203 с

5. Новикова Е.В., Степанов А.В., Филиппов Ю.А., Чистякова О.В., Сухов И.Б., Кубасов И.В., Добрецов М.Г. Электрокардиографический анализ работы сердца крысы при изучении сердечной недостаточности различной этиологии. ИНТЕГРАТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (8-10 декабря 2021 г.). –Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2021.203 с.

## Список цитируемой литературы

1. Александров АА., Шацкая ОА., Кухаренко СС. и др. Резистин и диабетическая кардиомиопатия: патогенетические взаимосвязи. *Consilium Medicum*. 2014. Т. 16. № 10. С. 109-116.
2. Балаболкин МИ. *Диабетология*. М.: Медицина, 2000. 672 с.
3. Викулова ОК., Исаков МА., Железнякова АВ. и др. Динамика основных эпидемиологических характеристик сахарного диабета в российской федерации за период 2013-2017 гг. В книге: Сахарный диабет - пандемия XXI века. Сборник тезисов VIII (XXV) Всероссийского диабетологического конгресса с международным участием. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; ОО «Российская ассоциация эндокринологов». 2018. С. 8-9.
4. Дедов ИИ., Шестакова МВ. *Сахарный диабет*. М.: Универсум Паблишинг, 2003. 456 с.
5. Кубасов И.В., А.В. Степанов, А.А. Панов, О.В. Чистякова, И.Б. Сухов, М.Г. Добрецов. Роль калиевых токов в формировании фазы следовой гиперполяризации внеклеточных потенциалов действия вентрикулярных кардиомиоцитов крысы в норме и при стрептозотоциновом сахарном диабете. *РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ* им. И.М. СЕЧЕНОВА, 2021, том 107, № 12, с. 1–14.
6. Моисеев В.С., Киякбаев Г.К. *Кардиомиопатии и миокардиты: руководство*. М.: Гэотар-Медиа. 2013. 352 с.
7. Морозова М.П., Гаврилова С.А., Иванов Е.В., Горбачева А.М., Ржавина Е.М., Ердяков А.К., Джемиллова З.Н., Артемова Е.В., Токмакова А.Ю., Кошелев В.Б., Галстян Г.Р. Динамика variability ритма сердца у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом. *Сахарный диабет*. 2019.22: 44-52
8. Синьков. А.В., Синькова Г.М. *ЭКГ диагностика ишемии и инфаркта миокарда*. ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава. Иркутск: ИГМУ, 2015. 15с.
9. Соколов Е.И. *Диабетическое сердце* М.: Медицина, 2002. 416 с.
10. Яковенко Е.И. ЭКГ-диагностика гипертрофии левого желудочка. *Российский кардиологический журнал*. 2009. 5:79-83.
11. Bonilla I.M., Long V.P. III, Vargas-Pinto P., Wright P., Belevych A., et al. Calcium-Activated Potassium Current Modulates Ventricular Repolarization in Chronic Heart Failure. *PLoS ONE*. 2014. 9(10): e108824.
12. Boudina S., Abel E.D. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007. 115:3213.

13. Brette F., Orchard C. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 2003. 92:1182-1192.
14. Bub G., Camelliti P., Bollensdorff C., Stuckey D. J., Picton G., Burton R. A. B., Clarke K., Kohl P. Measurement and analysis of sarcomere length in rat cardiomyocytes in situ and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010. 298:H1616-H1625.
15. 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.* 2011. 162:938-948.
16. 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.* 1995. 76:1173-1176.
17. Chang P.C., Turker I., Lopshire J.C., Masroor S., Nguyen B.L., et al. Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc.* 2013. 2: e004713.
18. Chen B., Zhang C., Guo A., Song L.-S. In situ single photon confocal imaging of cardiomyocyte T-tubule system from Langendorff-perfused hearts. *Front. Physiol.* 2015. 6:134. doi: 10.3389/fphys.2015.00134
19. Chen T., Vunjak-Novakovic G. In vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen Eng Transl Med.* 2018. 4(3):142-153.
20. Chua S.K., Chang P.C., Maruyama M., Turker I., Shinohara T., et al. Small conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ Res.* 2011. 108: 971–979.
21. Di Bernardo D., Murray A. Explaining the T-wave shape in the ECG. *Nature.* 2000. 403:40
22. Dobretsov M., Backonja M., Romanovsky D., Stimers J.R. Animal models of diabetic neuropathic pain. In: *Animal models of pain* (Ma C, Zhang J-M, eds), pp 147–169 *Neuromethods.* New York: Humana Press. 2010.
23. Gerich J.E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications *Diabet Med.* 2010. 27(2): 136–142.
24. Gilca G.E., Stefanescu G., Badulescu O., Tanase D.M., Bararu I., Ciocoiu M. Diabetic Cardiomyopathy: Current Approach and Potential Diagnostic

and Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*. 2017. Volume 2017, Article ID 1310265

25. Goldberger A.L., Goldberger Z.D., Shvilkin A. *Goldberger's Clinical electrocardiography. A simplified approach*. 8-ed., Elsevier Saunders, Philadelphia. 2013. 233 p.
26. Grundy S.M. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2012. 59:635–643.
27. Grunnet M., Jensen B.S., Olesen S.P., Klaerke D.A. Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Pflugers Arch*. 2001. 441: 544–550.
28. Gui L., Bao Z., Jia Y., Qin X., Cheng Z.J., et al. Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013. 304: H118–H130.
29. Hölscher M.E., Bode C., and Bugger H. Diabetic Cardiomyopathy: Does the Type of Diabetes Matter? *Int J Mol Sci*. 2016 .17(12): 2136.
30. 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. 2016. *Bmj*:i5953.
31. Kannel W.B., Hjortland M., Castelli W.P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974; 34:29.
32. Konopelski P., Ufnal M. Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human Physiol. *Res*. 2016. 65: 717-725.
33. Kubasov I.V., Bobkov D.E., Stepanov A.V., Sukhov I.B., Chistyakova O.V., Dobretsov M.G. Evaluation of the T-System of Rat Cardiomyocytes during Early Stages of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Russian Journal of Physiology*. 2020. 106(9): 1098—1108.
34. Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P.B., Terpilowski M.A., Dobretsov M. and Gyorke S. Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Frontiers in Physiology*. 2018. 9(61).
35. Lorenzo-Almorós A., Tuñón J., Orejas M., Cortés M., Egidio J., Lorenzo. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol*. 2017. 16:1–14
36. Louch W.E., Sejersted O.M., Swift F. There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling. *J Biomed Biotechnol*. 2010. 2010:503906.



37. Maack C. Highlights of basic and translational research in heart failure. *Dialogues Cardiovasc Med.* 2017. 22:14–16.
38. Murakami M., Niwa H., Kushikata T., Watanabe H., Hirota K., Ono K., Ohbad T. *Biol. Pharm. Bull.* 2014. 37(5): 834–839.
39. 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.* 2013. 12:1–11.
40. Ren J., Sowers J.R., Walsh M.F., Brown R. Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000. 279:H1708-14.
41. Rubler S., Dlugash J., Yuceoglu Y.Z., et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972. 30:595.
42. Seferović P.M., Paulus W.J. Clinical diabetic cardiomyopathy: A two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J.* 2015. 36:1718–1727.
43. Tabák A.G., Herder C., Rathmann W., Brunner E.J., and Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for developing diabetes. *Lancet.* 2012. 379: 2279–2290.
44. Tadic M., Celic V., Cuspidi C., Ilic S., Pencic B., Radojkovic J., Ivanovic B., Stanisavljevic D., Kocabay 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.* 2015. 28:317–327.
45. Trachanas K., Sideris S., Aggeli C., Poulidakis E., Gatzoulis K., Tousoulis D., and Kallikazaros I. Diabetic Cardiomyopathy: From Pathophysiology to Treatment. *Hellenic J Cardiol.* 2014. 55: 411-421.
46. Ward M.-L. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. *World J Cardiol.* 2014. 6:577.
47. Wei S., Guo A., Chen B., Kutschke W., Xie Y.P., Zimmerman K., Weiss R.M., Anderson M.E., Cheng H., Song L.S. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res.* 2010. 107:520–531.
48. Zarich S.W., Nesto R.W. Diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 1989. 118:1000.