



ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА Na^+/K^+ -АТФАЗУ И КОМПОНЕНТЫ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ В КАРДИОМИОЦИТАХ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

И.Б. Сухов*, О.В. Чистякова

ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН
194223, Российская Федерация, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

В условиях сахарного диабета 1-го типа (СД1) часто развиваются тяжёлые формы сердечно-сосудистой патологии. Для коррекции функций сердечно-сосудистой системы могут быть использованы подходы, ослабляющие провоспалительные и антиапоптотические сигналы вовлечённых в патологическую гипертрофию кардиомиоцитов и повышающие активность кардиопротекторных путей в них. Поскольку при СД1 ослабляется инсулиновая система мозга, вовлечённая в контроль сердечно-сосудистой системы и функций кардиомиоцитов, то одним из таких подходов является применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ). Целью работы было изучить влияние ИВИ на экспрессию генов, кодирующих компоненты инсулиновой системы и Ca^{2+} -транспортирующей системы, а также активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах крыс со стрептозотоциновым СД1. ИВИ устранял возникающее при СД1 разобщение молекулярных механизмов, участвующих в электромеханическом сопряжении в кардиомиоцитах крыс. Это указывает на перспективность дальнейших исследований ИВИ как препарата, потенциально способного восстанавливать функции миокарда при СД1.

Ключевые слова: сердце, сахарный диабет, диабетическая кардиомиопатия, Na^+/K^+ -АТФаза, интраназально введённый инсулин, крыса

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: средства государственного бюджета Минобрнауки России по госзаданию 075-00886-20-01 (направление АААА-А18-118012290427) с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

Благодарности: авторы выражают благодарность профессору МГУ Ольге Сергеевне Тарасовой за обсуждение идей статьи.

Для цитирования: Сухов И.Б., Чистякова О.В. Влияние интраназально вводимого инсулина на Na^+/K^+ -АТФазу и компоненты Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах у крыс с сахарным диабетом 1-го типа. *Биомедицина*. 2022;18(2):52–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>

Поступила 07.04.2022

Принята после доработки 22.04.2022

Опубликована 10.06.2022

IMPACT OF INTRANASAL INSULIN ADMINISTRATION ON Na⁺/K⁺-ATPASE AND Ca²⁺-TRANSPORTING SYSTEM COMPONENTS IN RAT CARDIOMYOCYTES WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Ivan B. Sukhov*, Oksana V. Chistyakova

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences
194223, Russian Federation, Saint-Petersburg, Thorez Ave., 44*

Cardiovascular pathology is the main cause of morbidity among patients with diabetes mellitus. The development of a specific therapy aimed at either blunting the protein signals involved in pathological cardiomyocyte hypertrophy or upregulating the expression of cardioprotective pathways can support new strategies for treating diabetes-induced cardiac dysfunctions. The aim of the work was to study the impact of intranasal insulin administration (IIA) on the expression of genes encoding insulin-dependent signaling proteins and components of the Ca²⁺-transporting system, as well as on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in cardiomyocytes on the model of experimental type 1 diabetes mellitus (DM1) in rats. It was shown that IIA eliminates the uncoupling of molecular mechanisms involved in electromechanical coupling in rat cardiomyocytes that occurs under the conditions of mild DM1. This allowed us to recommend IIA as a therapeutic approach to the prevention and treatment of structural and functional myocardial disorders caused by diabetes.

Keywords: heart, diabetes mellitus, diabetic cardiomyopathy, Na⁺/K⁺-ATPase, intranasally administered insulin, rat

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: State budget funds of the Ministry of Science and Higher Education assignment No. 075-00886-20-01 (direction AAAA-A18-118012290427) using the equipment of the Center for Collective Use of the IEPHB RAS.

Acknowledgment: The authors express their appreciation to Olga Sergeevna Tarasova, Prof. of Moscow State University, for discussing the ideas presented in the article.

For citation: Sukhov I.B., Chistyakova O.V. Impact of Intranasal Insulin Administration On Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-Transporting System Components in Rat Cardiomyocytes with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2022;18(2):52–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>

Submitted 07.04.2022

Revised 22.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Сердечно-сосудистая патология является основной причиной заболеваемости среди пациентов с сахарным диабетом 1-го (СД1) и 2-го типов. Патофизиология диабетического повреждения сердца сложна и многофакторна и включает метаболические нарушения, такие как сбой доставки и утилизации глюкозы кардиомиоцитами; повышенное окисление свободных жирных кислот, блокирующее окислительное фосфорилирование продуктов обмена глюкозы

и подавляющее гликолиз; а также аномалии кальциевого обмена и нарушения чувствительности миофибрилл кардиомиоцитов к Ca²⁺, что становится причиной внутриклеточной перегрузки Ca²⁺ и приводит к нарушению расслабления миокарда [7]. В процесс сопряжения возбуждения и сокращения миокарда вовлечён целый комплекс белков, регулирующих уровень внутриклеточного Ca²⁺. Саркоплазматическая Ca²⁺-АТФаза (SERCA), кодируемая специфичным для миокарда геном *Atp2a2*,

выводит Ca^{2+} из цитозоля, способствуя расслаблению кардиомиоцитов. К основным элементам регуляции кальциевой динамики в клетке относят рианодиновые рецепторы RyR , которые, будучи гомотетрамерами, располагаются на мембране саркоплазматического ретикулума и представляют особый тип хемоактивируемых Ca^{2+} -каналов. Специфичными для миокарда являются RyR2 , активация (открытие) которых и, соответственно, высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума происходит даже при небольшом повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцита. Одними из ранних механизмов сердечной патологии могут являться структурно-функциональная перестройка в T-системе кардиомиоцитов, представляющей инвагинацию плазматической мембраны t-трубочек внутрь миоцита. Изоформа Na^+/K^+ -АТФазы (КФ 3.6.3.9), содержащая $\alpha 2$ -субъединицу, представлена на мембране кардиомиоцита в t-трубочках с большей плотностью, где контролирует градиент ионов Na^+ , что косвенно влияет на работу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, регулирующего концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} и сократимость кардиомиоцитов [3, 15]. С другой стороны, потеря инотропного эффекта в диабетическом миокарде вызвана изменениями в механизмах трансдукции сигнала, включающих гормональные рецепторы и депрессии при фосфорилировании различных мембранных и внутриклеточных белков.

В настоящее время ведётся разработка фармакологических подходов, направленных либо на ослабление сигналов, вовлечённых в патологическую гипертрофию кардиомиоцитов, либо на усиление кардиопротекторных путей, в частности на инсулин-зависимый путь фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗ-К)/протеинкиназы Б (Akt).

Цель работы — изучить влияние 10-дневного интраназального введения ин-

сулина (ИВИ) на экспрессию генов, кодирующих инсулин-зависимые сигнальные белки и элементы Ca^{2+} -транспортирующей системы, а также на активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах крыс в условиях стрептозотоцинового СД1.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утверждёнными этическим комитетом ИЭФБ РАН, и согласно требованиям Директивы Европейского парламента (1986 г.). СД1 индуцировали у самцов крыс Wistar в возрасте 2,5 мес. внутривенной инъекцией стрептозотоцина (СТЗ) («Sigma», США) в дозе 35 мг/кг, вторую инъекцию проводили через 15 дней после первой в дозе 30 мг/кг (группа СД1, n=7). Контрольным животным вводили 0,1 М цитратный буфер (pH 4,5) (группа К, n=7). Через 1,5 мес. после второй инъекции СТЗ и на протяжении последующих 10 дней часть животных получала ИВИ в дозе 0,5 МЕ на крысу (группа СД1+Инс, n=7). Уровень глюкозы при контроле развития СД1 и в конце эксперимента (через 10 недель после первого введения СТЗ) измеряли натощак в крови, взятой из хвостовой вены, используя тест-полоски One Touch Ultra (США) и глюкометр Life Scan («Johnson&Johnson», Дания). Уровень гликированного гемоглобина (HbA1C) в крови определяли в конце эксперимента с помощью набора A1CNow+ Professional («Polymer Technology Systems», США). Уровень инсулина измеряли в конце эксперимента в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с помощью набора Rat Insulin ELISA («Merckodia AB», Швеция). Крыс содержали в виварии по 5 особей в клетке, при 12/12 ч режиме дня, со свободным доступом к пище и воде, и выводили из эксперимента декапитацией после обезболивания путём в/б введения хлоралгидрата (400 мг/кг).

Определение уровня экспрессии генов

Для проведения количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, совмещённой с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), тотальную РНК выделяли из тканей сердца с помощью коммерческого набора «Реагент ExtractRNA» («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Готовые образцы РНК тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля наличия чётко различимых пятен, соответствующих рибосомальной РНК 18S и 28S, что свидетельствует об отсутствии деградации препаратов РНК. Далее образец, содержащий 1 мг РНК, обратно транскрибировали с помощью коммерческого набора MMLV RT («Евроген», Россия), используя Random Primer 10 в соответствии с протоколом производителя. Предварительно все образцы РНК обрабатывали DNase I, RNase-free («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) для очистки препарата от содержащихся в нём молекул ДНК. ПЦР амплификацию проводили в среде (объём 25 мкл), содержащей 10 нг продукта ОТ-ПЦР, 0,4 мкМ прямого и обратного праймера, и реагент qPCRMix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System («Life Technologies» (ABI), «Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Для проведения ПЦР использовали температурный режим: (1) предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин; (2) трёхэтапная амплификация и количественный анализ, содержащий 38 циклов: 95°C в течение 30 с, температура отжига (подбиралась индивидуально) в течение 30 с, и 72°C — в течение 30 с; (3) кривая плавления: 95°C в течение 15 с, 60°C — в течение 1 мин, разогрев образца до 95°C с детекцией каждый 1% времени нагрева, выдерживание в течение 30 с, охлаждение до 60°C в течение 15 с. Анализ кривой

плавления показал наличие одного пика и отсутствие димеров праймеров в каждой реакции, содержащий образец. Время отжига рассчитывали с помощью онлайн-программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В предварительных исследованиях продукты ПЦР тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля получения ампликона соответствующего размера.

Определение Na^+/K^+ -АТФазной активности

АТФазную активность определяли в микросомальной фракции мембран кардиомиоцитов, выделенных из левых желудочков сердец методом дифференциального центрифугирования [5]. При определении общей АТФазной активности пробы, содержащие 40–45 мкг белка, инкубировали 10 мин при 37°C в среде: 20 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА, 1 мМ Na_2ATP [5]. Na^+/K^+ -АТФазную активность оценивали по содержанию неорганического фосфата по методу Фиске – Суббароу. Na^+/K^+ -АТФазную активность рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg^{2+} -зависимую, определяемую в присутствии 1 мМ уабаина — специфического ингибитора α -изоформ Na^+/K^+ -АТФазы.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программ «GraphPad Prism 7 software» («GraphPad Software», США), по методу ANOVA с post hoc тестом Тьюки для параметрических данных и тестом Данна для непараметрических. Параметрические данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$, непараметрические — с указанием медианы и 25%/75% перцентилей. Корреляции по Пирсону (для параметрических данных) и Спирману (для непараметрических данных) считали высокой степени при $r > 0,7$. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Таблица. Метаболические и биохимические показатели экспериментальных животных ($M \pm S.E.M.$)
Table. Metabolic and biochemical parameters of experimental animals

Группа	Масса, г			Глюкоза, ммоль/л	Инсулин, нг/мл	HbA _{1c} , %
	до введения СТЗ	через 10 недель после введения СТЗ	прирост массы			
Контроль	221±5	307±5	86,4±3,3	5,6±0,1	1,3±0,1	4,2±0,2
СД1	220±7	285±8	65,3±6,5*	12,2±0,9*	0,8±0,2*	6,1±0,6
СД1+Инс	226±8	307±14	81,3±6,7	8,8±1,0*	1,0±0,1	6,3±0,5

Примечание: * — статистически значимые различия данных в сравнении с группой Контроль при $p < 0,05$.
Note: * — statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

Результаты исследований

Метаболические и биохимические показатели у экспериментальных животных

У диабетических крыс прирост массы тела был в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной группой ($p=0,03$), а животные, получавшие ИВИ, по массе не отличались от контрольных ($p=0,76$) (табл.). В конце эксперимента (на 75-й день) у всех диабетических крыс наблюдалась гипергликемия (табл.). Уровень инсулина в крови интактных диабетических животных был ниже в ~1,5 раза по сравнению

с контрольной группой ($p=0,03$), а ИВИ полностью его восстанавливало ($p=0,184$). Содержание гликированного гемоглобина в крови у животных всех исследованных групп не различалось.

Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы и уровня экспрессии гена *Atp1a2*

В миокарде диабетических крыс выявлено значительное возрастание активности Na^+/K^+ -АТФазы по сравнению с контрольными животными (рис. 1), при этом уровень экспрессии гена *Atp1a2*, кодирующего $\alpha 2$ -субъединицу Na^+/K^+ -АТФазы,

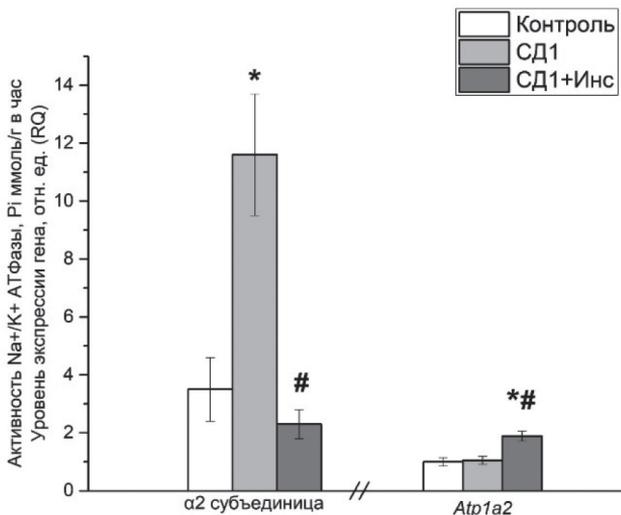


Рис. 1. Уровень активности и экспрессии гена $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы ($M \pm S.E.M.$).

Примечание: * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль; # — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой СД1.

Fig. 1. Level of activity and expression of the $\alpha 2$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase gene ($M \pm S.E.M.$).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group. # - statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the DM1 group.

не менялся. При ИВИ у диабетических животных активность Na^+/K^+ -АТФазы снижалась до контрольных значений, а уровень экспрессии *Atp1a2* возрастал, превышая значения у интактных животных в 1,6–1,7 раза. Корреляционный анализ данных экспрессии гена *Atp1a2* и генов ключевых компонентов инсулинового сигнального пути в кардиомиоцитах левого желудочка крыс выявил определённые закономерности. Так, в группе СД1 между уровнем экспрессии генов *Atp1a2* и *Akt* выявлена высокая степень отрицательной корреляции ($r=-0,92$; $p=0,025$), которая, на первый взгляд, неочевидна, т. к. уровень экспрессии *Atp1a2* при СД не менялся. Важно отметить, что после ИВИ экспрессия двух генов стимулируется, но выявленная при диабете отрицательная корреляция пропадает.

Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих инсулинзависимые сигнальные белки и элементы Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах крыс

В левом желудочке диабетических крыс уровень экспрессии гена *Insr*, кодирующего рецептор инсулина, возрастал почти в два раза по сравнению с контрольными животными ($p=0,0374$), и это соотношение сохранялось после ИВИ (рис. 2). Уровень экспрессии гена *Akt*, кодирующего ПКБ, при диабете снижался на 25% ($p=0,0056$) (рис. 2), а ИВИ стимулировало экспрессию гена до значений выше контрольных больше чем на 30% ($p=0,004$). Характерной особенностью диабетических животных являлась высокая степень отрицательной корреляции между уровнем экспрессии генов *Insr* и *Akt* ($r=-0,965$; $p=0,035$). Экспрессия гена

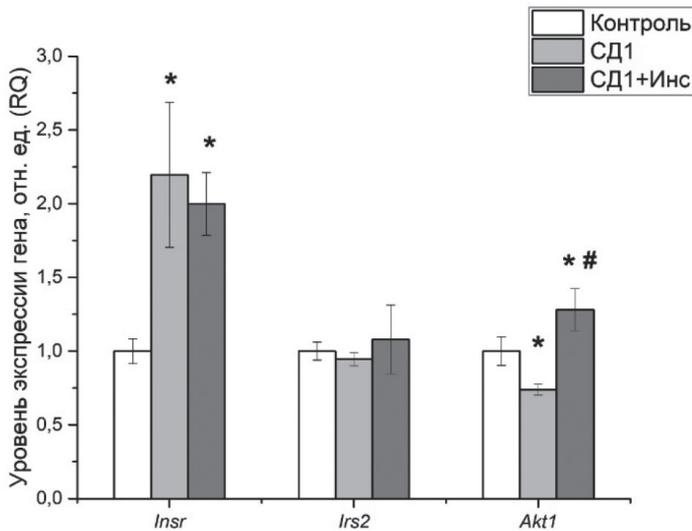


Рис. 2. Уровень экспрессии генов ключевых компонентов инсулинового сигнального пути в кардиомиоцитах левого желудочка крыс ($M \pm S.E.M$).

Примечание: * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль; # — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой СД1.

Fig. 2. Gene expression level for the key components of the insulin signaling pathway in rat left ventricular cardiomyocytes ($M \pm S.E.M$).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0,05$ compared to the control group. # - statistically significant differences at $p < 0,05$ compared to the DM1 group.

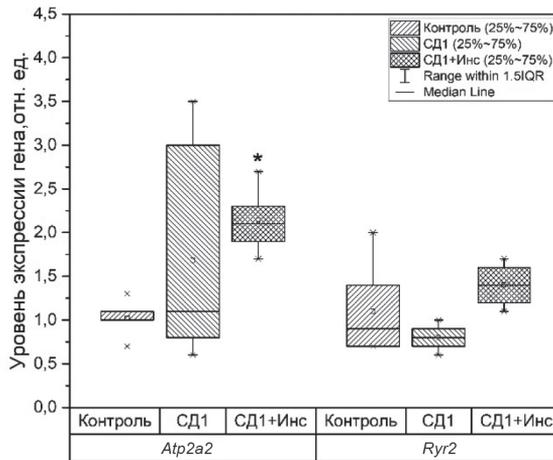


Рис. 3. Уровень экспрессии генов, кодирующих компоненты Ca^{2+} -транспортирующей системы.

Примечание: данные представлены с указанием медианы (median line) и 25%/75% перцентилей. * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль.

Fig. 3. Expression level of genes encoding Ca^{2+} -transporting system components.

Note: the data are presented with the median line and 25%/75% percentiles. * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group.

Irs2 не различалась у контрольных и диабетических животных и не изменялась после ИВИ (рис. 2).

Оценка уровня экспрессии гена *Atp2a2*, кодирующего саркоплазматическую Ca^{2+} АТФазу (SERCA) в сердце у диабетических крыс, выявила ненормальный характер распределения данного параметра. После ИВИ экспрессия *Atp2a2* возросла приблизительно в два раза по сравнению с контролем. Экспрессия гена *Ryr2*, кодирующего риадиноновый рецептор, во всех экспериментальных группах не различалась (рис. 3).

Обсуждение результатов

Анализ метаболических и биохимических показателей показал, что после повторного введения средних доз СТЗ у крыс развился мягкий СД1, что следует из снижения массы тела, частичной (снижение на 38%) инсулиновой недостаточности и сохранения нормального уровня $HbA1C$. Таким образом, кардиомиоциты диабетических крыс продолжительное время функционируют

в условиях умеренного дефицита инсулина в кровотоке при умеренной гипергликемии.

Как показали результаты работы, в миокарде крыс в условиях мягкого СД1 ключевые компоненты инсулиновой сигнальной системы на уровне экспрессии генов претерпевают компенсаторные изменения. Выявленное в миокарде диабетических крыс увеличение экспрессии гена *Insr* можно оценивать как компенсаторный ответ на снижение стимуляции рецепторов инсулина (снижение уровня инсулина в кровотоке), который сохраняется и после ИВИ. В целом, пролонгированное, в течение 10 дней, ИВИ оказало нормализующее действие на состояние крыс с мягко выраженным СД1. Для понимая вероятных причин такого влияния стоит отметить более ранние работы. Так, при введении инсулина экспериментальным животным путём инъекции в желудочки головного мозга было обнаружено действие гормона на периферические ткани, в частности печень. Этот эффект объяснялся влиянием гормона в аркуатных ядрах гипоталамуса на АТФ-

зависимые K^+ -каналы [19]. Ингибирование этих каналов путём нокаута субъединицы SUR1, равно как и хирургическая перерезка печёночной ветви X черепно-мозгового нерва (*nervus vagus*), полностью снимало центральное действие инсулина, что приводит к снижению в два раза поглощения глюкозы тканями и доказывает центральное влияние инсулина на активность *n. vagus*. В случае же интраназального введения инсулин обнаруживается в достаточной концентрации в структурах головного мозга, в частности в гипоталамусе, а также в крови, печени и почках [14]. Это даёт основание предполагать стимуляцию *n. vagus* при ИВИ крысам и в нашей работе.

К настоящему времени накоплены данные, что стимуляция *n. vagus* оказывает протекторное влияние на сердце [16]. Так, в работах [10, 18] показано, что длительное протекторное влияние ацетилхолина на сердце могут опосредовать М3-холинорецепторы. Вероятно, такое влияние можно называть трофическим, что впервые описано в работах Л.А. Орбели, как адаптационно-трофическое влияние вегетативной нервной системы. В ряде работ говорится о неспецифическом влиянии стимуляции *n. vagus* на сердце, в частности через уменьшение продукции провоспалительных цитокинов [2, 17]. Центральное влияние инсулина на активность *n. vagus* показано как *in vivo* [13], так и *in vitro* [4]. Ранее мы также показали, что ИВИ нормализует активность аденилатциклазной сигнальной системы в миокарде и тканях репродуктивной системы самок крыс с СД 2-го типа [22, 23]. Стоит отметить особенность модели и методов изучения Na^+/K^+ -АТФазы в представленной работе. Ранее мы показали, что при остром СД1 у крыс в условиях 5-кратного увеличения уровня глюкозы и 2,5-кратного увеличения уровня гликозилированного гемоглобина (при введении высоких доз СТЗ) функциональная активность Na^+/K^+ -АТФазы в сердечной мышце у крыс

подавляется [1]. В данной работе условия создания модели СД1 позволили оценить эффекты, непосредственно связанные с инсулиновым дефицитом, исключив негативное влияние гипергликемии, а также нарушения жирового обмена, провоспалительных цитокинов и др. негативные факторы некомпенсированного СД1.

Обсуждая реализацию эффекта ИВИ в кардиомиоцитах на молекулярном уровне, стоит отметить, что ранее показано регулирующее действие инсулина на Na^+/K^+ -АТФазу в сердце [6, 11, 21]. В данной работе мы показали, что изменение на уровне экспрессии генов ключевых компонентов инсулиновой сигнальной системы и снижение уровня периферического инсулина при СД1 приводят к увеличению количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы на плазматической мембране кардиомиоцитов, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу. Согласно данным литературы, в условиях гипергликемии в кардиомиоцитах происходит перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы между эндоплазматическим пулом, где запасаются компоненты Na^+/K^+ -АТФазы, и плазматической мембраной [25]. Также показано, что инсулин регулирует это перераспределение, стимулируя транслокацию $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц фермента в плазматическую мембрану через ФИ-3-киназный путь, а в условиях СД транслокация изоформы $\alpha 2$ оказывается более уязвимой к снижению инсулинового сигнала [21]. Аналогичный эффект — возрастание активности Na^+/K^+ -АТФазы — у диабетических крыс также выявлен в других тканях, в частности в печени и в почках [12]. Увеличение как $\alpha 1$, так и $\alpha 2$ Na^+/K^+ -АТФазы показано в кардиомиоцитах крысы и в условиях 9-недельной диеты с водой, содержащей 10% фруктозы [20].

Полученные нами данные позволяют заключить, что ПКБ/Akt, опосредующая действие ФИ-3-К, оказывает ингибирующее действие на перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц и их синтез *de novo*. Уве-

личение же на плазматической мембране более чем в три раза количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу, может приводить к нарушению работы t-трубочек, поскольку в них имеет предпочтительную локализацию именно $\alpha 2$ [8, 9]. Вероятно, это может существенно влиять на обмен ионов Ca^{2+} и негативно регулировать сокращение кардиомиоцитов, поскольку экспрессия генов Ca^{2+} АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA), как и рианодиновых каналов, при СД1 не менялась.

На физиологическом уровне ИВИ нормализует уровень инсулина в периферической крови, что в совокупности с возможным центральным влиянием инсулина на активность *n. vagus* (см. выше) нормализует активность Na^+/K^+ -АТФазы. Это указывает на снижение до нормальных значений количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы на плазматической мембране кардиомиоцитов, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу. Поскольку Na^+/K^+ -АТФаза электрогенна, мы предполагаем, что возвращение её количества до контрольных значений стабилизирует работу t-трубочек. Также при ИВИ возрастает уровень экспрессии как гена $\alpha 2$ -субъединицы, так и генов *Akt* и *SERCA*, что можно связать с усилением инсулинового сигнала. По литературным данным, подкожное лечение инсулином диабетических животных в течение двух недель приводит к увеличению в несколько раз уровня экспрессии гена $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, при пониженном уровне белка $\alpha 2$ -субъединицы в сравнении

с контролем [24], что согласуется с нашими данными. Поскольку $\alpha 2$ -субъединица Na^+/K^+ -АТФазы имеет предпочтительную локализацию в t-трубочках [8, 9], снижение её экспрессии может существенно влиять на обмен ионов Ca^{2+} , препятствуя работе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Это, в свою очередь, оказывает действие на сокращения кардиомиоцитов через локальные субклеточные механизмы, что может быть причиной развития кардиомиопатии.

Выводы

1. ИВИ устраняет разобщение молекулярных механизмов, участвующих в электромеханическом сопряжении в кардиомиоцитах крыс при экспериментальном СД1.
2. ИВИ нормализует уровень инсулина в крови крыс при экспериментальном СД1, что наряду с возможным центральным влиянием инсулина на активность *n. vagus* нормализует активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах.
3. Снижение уровня экспрессии $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах при СД1 может препятствовать работе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и являться причиной развития диабетической кардиомиопатии.
4. Протеинкиназа Б (Akt), опосредующая действие ФИ-3-К, оказывает ингибирующее действие на перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы и их синтез *de novo*.
5. ИВИ можно рекомендовать в качестве терапевтического подхода к профилактике и лечению вызванных диабетом нарушений миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Чистякова О.В., Сухов И.Б., Добрецов М.Г., Кубасов И.В. Изучение активности Na^+/K^+ -атфазы в миокарде крыс в экспериментальных условиях преддиабета и сахарного диабета. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2020;56(2):166–168. [Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Dobretsov M.G., Kubasov I.V. Izuchenie aktivnosti Na^+/K^+ -atfazy v miokarde kry's v e'ksperimental'ny'x usloviyax preddiabet
- beta i saxarnogo diabeta [The study of rat myocardial Na^+/K^+ -ATPase activity in experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus]. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii [Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]*. 2020;56(2):166–168. (In Russian). DOI: 10.31857/S0044452920020047.
2. Andersson U., Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*

- 2012;30:313–335. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075015.
3. Berry R.G., Despa S., Fuller W., Bers D.M., Shattock M.J. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. *Cardiovasc. Res.* 2007;73(1):92–100. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.006
 4. Blake C.B., Smith B.N. Insulin reduces excitation in gastric-related neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;303(8):R807–R814. DOI: 10.1152/ajp-regu.00276.2012.
 5. Bublitz M. (ed.). *P-type ATPases: Methods and protocols, methods in molecular biology*. New York: Springer Science+Business Media, 2016;1377.
 6. Chibalin A.V. Regulation of the Na_2K -ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology.* 2007;14(3–4):153–158. DOI: 10.1016/j.pathophys.2007.09.004.
 7. Dallak M., Al-Ani B., Abdel Kader D.H., Eid R.A., Haidara M.A. Insulin suppresses type 1 diabetes mellitus-induced ventricular cardiomyocyte damage associated with the inhibition of biomarkers of inflammation and oxidative stress in rats. *Pharmacology.* 2019;104(3–4):157–165. DOI: 10.1159/000500898.
 8. Despa S., Bers D.M. Functional analysis of Na/K -ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;293(1):C321–C327. DOI: 10.1152/ajpcell.00597.2006.
 9. Despa S., Lingrel J.B., Bers D.M. $\text{Na}(+)/\text{K}(+)$ -ATPase $\alpha 2$ -isoform preferentially modulates Ca^{2+} transients and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 2012;95(4):480–486. DOI: 10.1093/cvr/cvs213.
 10. Hang P., Zhao J., Qi J., Wang Y., Wu J., Du Z. Novel insights into the pervasive role of M(3) muscarinic receptor in cardiac diseases. *Curr. Drug Targets.* 2013;14(3):372–377.
 11. Hansen P.S., Buhagiar K.A., Gray D.F., Rasmussen H.H. Voltage-dependent stimulation of the $\text{Na}(+)/\text{K}(+)$ pump by insulin in rabbit cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000;278(3):C546–C553. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.278.3.C546.
 12. Iannello S., Milazzo P., Belfiore F. Animal and human tissue Na , K -ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am. J. Med. Sci.* 2007;333(1):1–9. DOI: 10.1097/00000441-200701000-00001.
 13. Krowicki Z.K., Nathan N.A., Hornby P.J. Gastric motor and cardiovascular effects of insulin in dorsal vagal complex of the rat. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5):G964–G972. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.275.5.G964.
 14. Lochhead J.J., Thorne R.G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64(7):614–628. DOI: 10.1016/j.addr.2011.11.002.
 15. Louch W.E., Sejersted O.M., Swift F. There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca^{2+} handling. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;2010:503906. DOI: 10.1155/2010/503906.
 16. Machhada A., Hosford P.S., Dyson A., Ackland G.L., Mastitskaya S., Gourine A.V. Optogenetic stimulation of vagal efferent activity preserves left ventricular function in experimental heart failure. *JACC Basic Transl. Sci.* 2020;5(8):799–810. DOI: 10.1016/j.jacpts.2020.06.002.
 17. Olofsson P.S., Rosas-Ballina M., Levine Y.A., Tracey K.J. Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol. Rev.* 2012;248(1):188–204. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x.
 18. Pan Z., Guo Y., Qi H., Fan K., Wang S., Zhao H., Fan Y., Xie J., Guo F., Hou Y., Wang N., Huo R., Zhang Y., Liu Y., Du Z. M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p. *PLoS One.* 2012;7(3):e32571. DOI: 10.1371/journal.pone.0032571.
 19. Pocai A., Lam T.K., Gutierrez-Juarez R., Obici S., Schwartz G.J., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Rossetti L. Hypothalamic $\text{K}(\text{ATP})$ channels control hepatic glucose production. *Nature.* 2005;434(7036):1026–1031. DOI: 10.1038/nature03439.
 20. Romic S., Djordjevic A., Tepavcevic S., Culafic T., Stojiljkovic M., Bursac B., Stanisic J., Kostic M., Gligorovska L., Koricanac G. Effects of a fructose-rich diet and chronic stress on insulin signaling and regulation of glycogen synthase kinase-3 beta and the sodium-potassium pump in the hearts of male rats. *Food Funct.* 2020;11(2):1455–1466. DOI: 10.1039/c9fo02306b.
 21. Rosta K., Tulassay E., Enzsoly A., Ronai K., Szantho A., Pandics T., Fekete A., Mandl P., Ver A. Insulin induced translocation of Na^+/K^+ -ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2009;30(12):1616–1624. DOI: 10.1038/aps.2009.162.
 22. Shpakov A.O., Derkach K.V., Chistyakova O.V., Moiseyuk I.V., Sukhov I.B., Bondareva V.M. Effect of intranasal insulin and serotonin on functional activity of the adenylyl cyclase system in myocardium, ovary, and uterus of rats with prolonged neonatal model of diabetes mellitus. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2013;49(2):153–164. DOI: 10.1134/S0022093013020047.
 23. Shpakov A.O., Chistyakova O.V., Derkach K.V., Moiseyuk I.V., Bondareva V.M. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 2012;7(1):33–47. DOI: 10.2478/s11535-011-0089-6.
 24. Ver A., Szántó I., Bányász T., Csermely P., Végh E., Somogyi J. Changes in the expression of Na^+/K^+ -ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment.

Diabetologia. 1997;40(11):1255–1262. DOI: 10.1007/s001250050818.

25. Yan X., Xun M., Dou X., Wu L., Han Y., Zheng J.
Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase effected high glu-

cose-induced myocardial cell injury through c-Src dependent NADPH oxidase/ROS pathway. *Exp. Cell Res.* 2017;357(2):243–251. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.05.023.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сухов Иван Борисович*, к.б.н., ФГБУН
«Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Ivan B. Sukhov*, Cand. Sci. (Biol.), Sechenov
Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Чистякова Оксана Викторовна, к.б.н., ФГБУН
«Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: chiosana@yandex.ru

Oksana V. Chistyakova, Cand. Sci. (Biol.),
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: chiosana@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author