

На правах рукописи



Седякина Екатерина Николаевна

**ФОРМИРОВАНИЕ АРИТМОГЕННОГО СУБСТРАТА В МИОКАРДЕ
ЖЕЛУДОЧКОВ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

1.5.5. – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Сыктывкар 2025

Работа выполнена в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

Научный руководитель: **Овечкин Алексей Олегович**, кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Ионин Валерий Александрович**, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии с клиникой имени академика Г.Ф. Ланга (г. Санкт-Петербург);

Кузьмин Владислав Стефанович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета «МГУ имени М.В. Ломоносова» (г. Москва).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», г. Екатеринбург.

Защита диссертации состоится «04 » июня 2025 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.038.01 в Федеральном исследовательском центре «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, olga-parshukova@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, д. 24, и на сайте <http://www.physiol.komisc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Паршукова О.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Сахарный диабет (СД) – хроническое заболевание обмена веществ, характеризующееся гипергликемией вследствие абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Распространенность сахарного диабета быстро растет, а его эпидемия уже стала серьезной проблемой для систем здравоохранения во всем мире (Abuelgasim et al., 2021; Седякина и др., 2024).

Сахарный диабет 1 типа – это аутоиммунное заболевание, в основе которого лежит иммуноопосредованная гибель β -клеток поджелудочной железы, приводящая к абсолютной инсулиновой недостаточности (Дедов и др., 2016). Сахарный диабет 2 типа характеризуется наличием инсулинорезистентности и относительным дефицитом инсулиносекреции (Куркин и др., 2022). Несмотря на различие в патогенезе сахарного диабета 1 и 2 типов, общим проявлением этих двух патологий является нарушение утилизации глюкозы в инсулинзависимых тканях и развитие диабетической кардиомиопатии (ДКМ) по идентичным механизмам (Gallego et al., 2014; Braunwald, 2019). Изменение электрической функции является одним из признаков диабетической кардиомиопатии. Независимо от влияния различных сердечно-сосудистых осложнений сахарного диабета, сама диабетическая кардиомиопатия вносит большой вклад в развитие желудочковых аритмий, в том числе желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков (ЖТ/ФЖ).

Диабетическая кардиомиопатия обуславливает высокий риск внезапной сердечной смерти у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с пациентами без сахарного диабета (Zaccardi et al., 2014; Aune et al., 2018).

Экспериментальные исследования часто дают противоречивые результаты относительно аритмических исходов при сахарном диабете. Сообщается, что восприимчивость к аритмиям при сахарном диабете либо повышается (Hekimian et al., 1985; Reno et al., 2017; Popescu et al., 2019), либо снижается (Kusama et al., 1992; Ravingerova et al., 2000). Различия в отношении восприимчивости к аритмиям в вышеупомянутых наблюдениях могут быть связаны с диабетическим ишемическим прекодиционированием (Ravingerova et al., 2000), с особенностями моделей, используемых в экспериментальных исследованиях (разные виды животных, разные способы провокации желудочковых аритмий).

Одна из возможных причин расхождения между экспериментальными данными и клиническими наблюдениями может быть связана с длительностью экспериментального сахарного диабета, которая может существенно влиять на аритмогенез (Pershina et al., 2021). В связи с этим мы решили изучить электрофизиологические свойства миокарда желудочков на органном и клеточном уровнях у животных с различной длительностью сахарного диабета и выявить ассоциированные с диабетической кардиомиопатией

электрофизиологические изменения, связанные с высокой частотой желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков.

При сахарном диабете происходит уменьшение секреции ряда адипокинов, в частности адипонектина, что может иметь значение в формировании диабетической кардиомиопатии. Адипонектин представляет собой важный регулятор обмена глюкозы и жирных кислот (Achari et al., 2017). Известны положительные эффекты адипонектина как антидиабетического, инсулинсенсбилизирующего фактора. Также известно, что он обладает антиатерогенными и противовоспалительными свойствами по отношению к сосудистой системе (Goldstein et al., 2009; Hatzis et al., 2013; Yaeni Kim et al., 2022). Однако, имеются сведения, что адипонектин может оказывать и негативное воздействие на сердечно–сосудистую систему (Barnett et al., 2015). Описано, что у пациентов со стабильной стенокардией с удлинённым интервалом QTc на ЭКГ уровень адипонектина выше, чем у пациентов с нормальным интервалом QTc (Wu et al., 2020).

Для оценки возможного вклада нарушения секреции адипонектина в формировании электрического ремоделирования желудочков при диабетической кардиомиопатии были изучены электрофизиологические эффекты адипонектина при его подкожном введении здоровым животным.

В связи с вышесказанным, **целью данного исследования** являлось изучение электрофизиологических механизмов, повышающих риск развития желудочковых аритмий при диабетической кардиомиопатии.

Задачи:

1) Изучить роль длительности экспериментального сахарного диабета в развитии аритмогенных электрофизиологических изменений миокарда желудочков.

2) Исследовать изменения ионных токов кардиомиоцитов при диабетической кардиомиопатии разной длительности.

3) Определить электрофизиологические и морфологические изменения миокарда, формирующие условия для развития ишемических и реперфузионных желудочковых аритмий при диабетической кардиомиопатии.

4) Оценить влияние адипонектина, как антидиабетического гормона, на электрофизиологические свойства миокарда желудочков.

Научная новизна. Впервые выявлено, что увеличение частоты реперфузионной желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков приходится на период диабетической кардиомиопатии, когда усиливаются деполяризующие токи ионов натрия и кальция (быстрый натриевый ток, кальциевый ток L-типа).

Впервые показано, что под влиянием антидиабетического гормона адипонектина увеличиваются показатели длительности потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов и дисперсии реполяризации желудочков.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Учитывая, что в человеческой популяции сахарный диабет повышает риск внезапной сердечной смерти, создание и изучение аритмогенной модели диабетической кардиомиопатии у животных поможет в дальнейшем исследовании особенностей диабетогенного электрического ремоделирования сердца.

Доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений об электрофизиологических механизмах, повышающих риск развития желудочковых аритмий при диабетической кардиомиопатии.

Изложены условия формирования аритмогенного субстрата, способствующего развитию реперфузионной желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков при диабетической кардиомиопатии, что может позволить разработать новые фармакологические подходы к профилактике и лечению жизнеугрожающих желудочковых аритмий у пациентов с сахарным диабетом.

Изучены изменения ионных токов желудочковых кардиомиоцитов при диабетической кардиомиопатии. Обнаруженная фазность изменений электрофизиологических свойств миокарда желудочков, в зависимости от длительности диабета, позволяет объяснить, почему при сахарном диабете вероятность развития аритмий может быть разной.

Раскрыты ранее не известные электрофизиологические свойства антидиабетического гормона адипонектина.

Методология и методы исследования. В данной работе изучались влияния экспериментального сахарного диабета и адипонектина на электрофизиологические свойства миокарда желудочков. Для решения поставленных задач были использованы электрофизиологические и морфологические методы исследования. К электрофизиологическим относятся картирование электрических потенциалов с поверхности желудочков сердца, а также регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp). Для тестирования проаритмических эффектов СД использовали модель ишемии – реперфузии. Морфологические изменения миокарда оценивали путем гистологического исследования образцов.

Положения, выносимые на защиту:

1) Важным электрофизиологическим механизмом развития реперфузионных желудочковых тахиаритмий у крыс с диабетической кардиомиопатией является усиление деполяризующих токов: быстрого натриевого тока и кальциевого тока L-типа.

2) Адипонектин вызывает увеличение показателей длительности потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов и дисперсии реполяризации желудочков у здоровых крыс.

Апробация результатов. Результаты данной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: VII всероссийской с международным участием школе – конференции по физиологии и патологии кровообращения (г. Москва, Россия, 3–6 февраля, 2020 г); международном конгрессе по электрокардиологии – объединенном съезде 21-го конгресса международного общества холтеровской и неинвазивной электрокардиологии (ISHNE) и 48-го конгресса международного общества электрокардиологии (ISE) (The International Congress on Electrocardiology – joint meeting of the 21th Congress of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology (ISHNE) and the 48th Congress of the International Society of Electrocardiology (ISE), г. Закопане, Польша, 15–17 апреля, 2021 г); российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» памяти члена-корреспондента РАН Владимира Семёновича Мархасина (г. Екатеринбург, Россия, 26–28 мая, 2021 г); IV всероссийской молодежной школе – конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (г. Звенигород, Россия, 15–17 сентября, 2023 г); ежегодной всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2024» и 64-ой сессии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России (г. Москва, Россия, 4–6 июня, 2024 г).

Публикации. По результатам данной научно – исследовательской работы (диссертации) опубликовано 9 печатных работ: 3 статьи в научных журналах, в том числе индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science, Scopus и PubMed и 6 тезисов докладов на всероссийских и международных научных конференциях.

Личный вклад автора. Автор работы Седякина Е.Н. принимала непосредственное участие во всех этапах выполнения данной работы: в разработке плана исследования, получении исходных данных и научных экспериментах, статистической обработке данных, интерпретации экспериментальных данных, написании статей и текста диссертационной работы, апробации результатов исследования.

Степень достоверности данных. Использованы современные методики сбора и обработки исходной информации. Результаты исследования, представленные в работе, получены на сертифицированном оборудовании, при помощи следующих экспериментальных методик: картирование электрических потенциалов с поверхности желудочков сердца, морфологическое исследование сердца, patch-clamp. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по влиянию сахарного диабета на электрофизиологические характеристики миокарда и ионные токи кардиомиоцитов. Полученные данные проанализированы статистическими методами с использованием современного программного обеспечения: Image-Pro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Хьюстон, Техас, США), Clampfit 10.6. (Software Version, 2023 г.), IBM SPSS Statistics 22.0 и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Бостон, США). Обзор литературы

и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников (статьи в научных журналах из наукометрических баз данных, включая Web of Science, Scopus, PubMed).

Внедрение. Полученные результаты используются при реализации дисциплин «Нормальная физиология» и «Патофизиология, клиническая патофизиология» по направлениям подготовки 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 «Педиатрия» в ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина» Минобрнауки России (акт внедрения от 16.01.2025 г.).

Легитимность исследований. Исследования одобрены этическим комитетом ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (заключение от 30 мая 2024 года). Все эксперименты соответствовали Руководству по уходу и использованию лабораторных животных, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (США), 2011 г., а также руководящим принципам Директивы 2010/63/EU Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных, направлениям исследований: п.2 (молекулярная и интегративная организация физиологических функций) и п.4 (закономерности функционирования основных систем организма (кровообращения) при различных состояниях организма).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка использованной литературы. Объем работы составляет 120 страниц машинописного текста, включая 13 рисунков и 18 таблиц. Список цитируемой литературы включает 278 источников, 249 из них зарубежные.

Обзор литературы состоит из двух основных разделов, содержащих сведения о СД, его влиянии на электрофизиологические характеристики миокарда и ионные токи, а также об адипонектине, его структуре и биологических эффектах.

Материалы и методы

Экспериментальный сахарный диабет у кроликов

Опыты проведены на 72 здоровых кроликах (35 самцов, 37 самок) породы шиншилла в возрасте 3–5 месяцев, с массой тела - 2871 (межквартильный интервал (МКИ) 2397 – 3192) г. Исходный уровень глюкозы венозной плазмы составлял 6.1 (5.5 – 6.6) ммоль/л. Для индукции сахарного диабета кроликам однократно вводили аллоксан в дозе 120 мг/кг массы тела внутривенно. Концентрацию глюкозы в венозной плазме измеряли один раз в неделю с помощью глюкометра OneTouch (LifeScan, Швейцария). В последующем у 55 животных развился СД (глюкоза плазмы венозной крови натощак ≥ 7 ммоль/л), а у 17 кроликов СД не развился (уровень глюкозы венозной плазмы натощак < 7.0 ммоль/л, эти животные не

были включены в исследование). После индукции сахарного диабета уровень глюкозы плазмы венозной крови составил 25.6 (18.4 – 30.5) ммоль/л, масса тела - 2842 (2506 – 3203) г.

Контрольную группу составляли 43 здоровых кролика (22 самца и 21 самка) породы шиншилла в возрасте 4–6 месяцев. Уровень глюкозы венозной плазмы составлял 6.0 (5.6 – 6.5) ммоль/л, масса тела - 3050 (2746 – 3288) г.

Всех животных содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном доступе к пище и воде в течение 1–2 месяцев.

Электрофизиологические измерения проводили у 55 кроликов (28 самцов и 27 самок) с СД и 43 (22 самца и 21 самка) контрольных животных. Длительность СД составила от 28 до 76 дней (медиана 42 дня, МКИ 36–54 дня). Для оценки роли длительности сахарного диабета группа СД была дополнительно разделена по медиане 42 дня на группы: СД короткий - 19 кроликов с длительностью диабета 28–41 день и СД длительный - 36 кроликов с длительностью диабета 42–76 дней.

Для электрофизиологического исследования на эпикард желудочка накладывали сетку из 64 отведений (межэлектродное расстояние 3.0 – 5.0 мм). Запись униполярных электрограмм выполняли при спонтанном синусовом ритме с помощью системы картирования (128 каналов; 16 бит; полоса пропускания 0.05–1000 Гц; частота отбора сигнала 4000 Гц). После регистрации электрограмм в исходном состоянии переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии перевязывали для развития ишемии в течение 15 минут с последующим 15 - минутным периодом реперфузии, обеспечиваемым ослаблением лигатуры. Во время ишемии/реперфузии анализировали частоту эпизодов желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков (ЖТ/ФЖ).

Экспериментальный сахарный диабет у крыс

Для индуцирования СД 51 здоровой крысе (линия Вистар, самцы, возраст 9–10 недель, масса тела 249 (202 – 289) г, глюкоза плазмы венозной крови - 4.1 (3.8 – 5.9) ммоль/л) вводили однократно стрептозотцин, растворенный в цитратном буфере с рН = 4, в дозе 60 мг/кг массы тела внутривенно. Концентрацию глюкозы в плазме венозной крови измеряли один раз в неделю с помощью глюкометра OneTouch (LifeScan, Швейцария). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном доступе к пище и воде в течение 1–2 месяцев. В последующем у 40 животных развился сахарный диабет (глюкоза плазмы венозной крови натощак ≥ 7 ммоль/л), у 11 крыс СД не развился (уровень глюкозы венозной плазмы натощак < 7.0 ммоль/л, эти животные не были включены в исследование). После индукции диабета уровень глюкозы плазмы венозной крови составил 29.9 (23.95 – 33.3) ммоль/л, масса тела - 215 (171 – 253) г. Длительность СД составила от 27 до 59 дней (медиана 44 дня, МКИ 32 - 55 дней). Крысы с СД были разделены по медиане 44 дня на 2 группы по продолжительности: СД короткий, с длительностью диабета 27–43 дня и СД длительный, с длительностью диабета 44–59 дней).

Контрольную группу составляли 28 здоровых крыс (линия Вистар, самцы, возраст 14–16 недель, масса тела 281.5 (246.5 – 305.5) г). Уровень глюкозы венозной плазмы составлял 5.7 (5.5 – 6.5) ммоль/л. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном доступе к пище и воде в течение 1–2 месяцев.

В результате последующие эксперименты проведены на 40 крысах с СД (СД короткий – 20 крыс, СД длительный – 20 крыс) и 28 контрольных животных. При этом у 16 крыс из группы короткого СД, 16 крыс из группы длительного СД и 23 контрольных крыс проводили эпикардальное картирование и запись ЭКГ, анализ ЖТ/ФЖ, рассчитывали скорость проведения, определяли длительность потенциала действия и регистрировали ионные токи изолированных кардиомиоцитов желудочков (patch-clamp). У четырех крыс из группы короткого СД, четырех – из группы СД длительного и пяти контрольных крыс проводили только морфологическое исследование сердца.

Для электрофизиологического исследования у анестезированных крыс регистрировали монополярные электрограммы от эпикарда правого (ПЖ) и левого (ЛЖ) желудочка с помощью квадратной матрицы из 64 электродов (8 x 8 отведений, межэлектродный интервал 0.5 мм) используя 128 - канальную систему регистрации. После регистрации электрограмм левую коронарную артерию перевязывали для развития ишемии в течение 5 минут с последующим 5 - минутным периодом реперфузии, обеспечиваемым ослаблением лигатуры. Во время ишемии - реперфузии также проводили запись электрограмм и анализировали эпизоды желудочковой тахикардии и (или) фибрилляции желудочков (ЖТ/ФЖ). Во время всего эксперимента проводили запись ЭКГ в 12 стандартных отведениях.

Адипонектин

Эксперименты проведены на 20 здоровых крысах линии Вистар (самцы, возраст 7 – 9 недель). Всем животным под кожу имплантировали мини – помпу. У 10 животных из 20 помпу предварительно заполняли рекомбинантным адипонектином в дозе 20 микрограмм. Оставшимся 10 крысам выполняли ложное хирургическое вмешательство (группа контроля). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном доступе к пище и воде в течение 7 дней. Исходно обе группы по массе тела не различались [213.5 (193.25 – 243.75) г, против 176 (154.5 – 182.5) г, $p = 0.12$]. По истечении 7 дней крысы с адипонектином имели большую массу тела по сравнению с контролем [217 (210 – 245) г, против 163 (144 – 189.50) г, $p = 0.008$].

Для электрофизиологического исследования крыс анестезировали и извлекали помпу. У животных регистрировали монополярные электрограммы с помощью квадратной матрицы из 64 электродов. Во время всего эксперимента проводили запись ЭКГ в 12 стандартных отведениях.

Регистрация электрограмм желудочков сердца

В каждом эпикардиальном отведении время активации (АТ) и время окончания реполяризации (RT) определяли как минимум dV/dt во время комплекса QRS и максимум dV/dt во время зубца Т соответственно относительно начала комплекса QRS. В качестве суррогата длительности потенциала действия рассчитывали интервал активация - реполяризация (ARI) как разницу между RT и АТ. Дисперсию реполяризации (DOR), необходимое условие для односторонней блокады проведения, принимали за разницу между максимальным и минимальным значениями RT анализируемой зоны или по всему желудочковому миокарду (глобальная DOR). У крыс в анализе использовали средние показатели АТ, RT и ARI по всем отведениям анализируемой зоны (верхушка и основание левого и правого желудочков). У кроликов анализировались аналогичные показатели по всему желудочковому миокарду.

Скорость проведения (CV) измеряли с помощью изохронных карт активации при электростимуляции (400 уд/мин, 2 мА, 2 мс) свободных стенок ЛЖ и ПЖ. CV рассчитывали как расстояние, пройденное через матрицу, деленное на разницу между временем активации в месте стимуляции и самым ранним временем активации на противоположной стороне матрицы.

Морфологические исследования

Восемь крыс из группы СД (4 крысы – СД короткий, 4 крысы – СД длительный) и 5 контрольных крыс анестезировали для последующего изъятия сердца с целью гистологического исследования. Сердце промывали физиологическим раствором. Затем ткани фиксировали 4% параформальдегидом в течение 48 часов, после чего разрезали на срезы толщиной 4 – 5 мкм и заливали в парафин. Форму и расположение волокон в миокарде оценивали с помощью окрашивания гематоксилином эозином, а степень фиброза (количество коллагена) определяли с помощью окрашивания по Ван – Гизону. Срезы оценивали при 400 - кратном увеличении, исключая поля зрения, содержащие сосуды. В каждом образце таким способом оценивали 4 – 5 полей зрения, отвечающих требованиям, для исключения случайной ошибки. При микроскопии срезов объемную фракцию коллагена (CVF) определяли как процент участков красного цвета по отношению ко всему полю с использованием программного обеспечения Image - Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Хьюстон, Техас, США).

Исследование ионных токов кардиомиоцитов желудочков методом patch - clamp.

После электрофизиологического картирования перед изъятием сердца вводили внутривенно гепарин (5000 МЕ/мл), разведенный в 0,9% NaCl. Изолированное сердце промывали в течение 10 минут ретроградной перфузией через аорту по системе Лангендорфа, содержащей аэрированный (95% O₂, 5% CO₂) и модифицированный бескальциевый раствор Тироде. Затем перфузию переводили на раствор Тироде того же состава с добавлением коллагеназы II

типа (0,5 мг/мл, Sigma Aldrich, США), протеазы (0.01 мг/мл, Sigma Aldrich, США) и 20 мкмоль/л CaCl_2 в течение 35 мин для выделения желудочковых кардиомиоцитов. По окончании ферментативной перфузии желудочки разрезали на мелкие кусочки. Клетки отделяли от кусочков фильтрованием через сетку с порами в 200 мкм.

Регистрацию ионных токов проводили в условиях метода patch - clamp (в конфигурации whole – cell) при комнатной температуре (22 – 24°C) с помощью Axopatch 200B (Axon Instrument, Сан-Хосе, Калифорния, США). Желудочковые кардиомиоциты помещали в экспериментальную камеру RC26 (Warner Instrument Corp., Великобритания). Пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (Sutter Instruments, Новато, Калифорния, США) в пуллере НЕКА типа PIP 6 (НЕКА Electronics, Холлистон, Массачусетс, США). Трансмембранные потенциалы измеряли в режиме current-clamp, а ионные токи – voltage clamp. Амплитуды тока нормализовались по емкости клеточной мембраны, которая составляла в среднем 96.3 ± 7.23 пФ.

Программное обеспечение и обработка данных

Для статистического анализа использовали IBM SPSS Statistics 22.0 и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Бостон, Массачусетс, США). Данные представлены в виде медианы и МКИ. Учитывая ненормальное распределение полученных данных использовали непараметрические критерии. Критерий Краскела - Уоллиса использовали для сравнения контрольной группы, групп с коротким и длительным СД. При сравнении контрольной группы с группой СД или группой адипонектина использовали критерий Манна – Уитни (с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса). Для оценки связи продолжительности СД с электрофизиологическими параметрами проводили линейный регрессионный анализ. Индуцируемость ишемических и реперфузионных желудочковых аритмий в контрольной группе и группах с СД сравнивали с помощью критерия χ^2 (с поправкой Йейтса). Логистический регрессионный анализ использовали для оценки связи ЖТ/ФЖ с длительностью СД, концентрацией глюкозы и электрофизиологическими параметрами. Анализ кривой ROC применяли для определения оптимальных точек отсечки для электрофизиологических предикторов ЖТ/ФЖ. Различия считали статистически значимыми ≤ 0.05 .

Результаты исследований

Электрофизиологические особенности миокарда и индуцируемость желудочковых аритмий у кроликов с сахарным диабетом.

У кроликов во время ишемии индуцируемость желудочковых аритмий между группами не различалась (14 из 55 против 7 из 43 в группах СД и контроля соответственно, $p = 0.272$), но количество реперфузионных ЖТ/ФЖ было выше в группе СД (14 из 55) по сравнению с контролем (3 из 43, $p=0.017$). У животных с диабетом как длительность диабета, так и концентрация глюкозы плазмы были

связаны с реперфузионными желудочковыми аритмиями в однофакторном логистическом регрессионном анализе (отношение шансов (ОШ) 1.058, 95% доверительный интервал (ДИ) 1.025 – 1.092, $p < 0.001$; и ОШ 1.119, 95% ДИ 1.045 – 1.198, $p = 0.001$ соответственно). В многофакторном логистическом регрессионном анализе только длительность СД оставалась независимым предиктором реперфузионных желудочковых аритмий (ОШ 1.060, 95% ДИ 1.006 – 1.117, $p = 0.029$).

При сравнении электрофизиологических параметров до ишемии в контрольной группе, а также в группах с коротким и длительным СД выявили, что средние длительности АТ, RT и ARI по всему желудочковому миокарду различались между группами, при этом эти показатели увеличивались только в группе с длительным диабетом (рис. 1).

Среди электрофизиологических параметров длительность СД была связана с АТ (ОШ = 0.152; 95% ДИ 0.049–0.255; $p = 0.005$), RT (ОШ = 1.030; 95% ДИ 0.425–1.635; $p = 0.001$) и ARI (ОШ = 0.900; 95% ДИ 0.315–1.484; $p = 0.003$). При этом удлинение ARI было единственным признаком, предсказывающим развитие реперфузионной ЖТ/ФЖ (ОШ 1.028; 95% ДИ 1.009–1.048; $p = 0.004$).

Электрофизиологическое ремоделирование миокарда при сахарном диабете у крыс.

В миокарде, окрашенном по Ван Гизону, при сахарном диабете выявлено увеличение объема фиброза (коллагена). CVF% в контрольной группе составил 2.76 % (1.93 – 4.33), в группе короткого СД 5.83 % (4.96 – 7.17) и 6.84 % (6.02 – 7.99) в группе длительного СД, $p < 0.001$ (критерий Краскела-Уоллиса).

Крысы из группы короткого СД демонстрировали более высокую встречаемость ЖТ и/или ФЖ по сравнению с крысами из группы длительного СД (44% и 6% соответственно, $p = 0.015$).

На ЭКГ у крыс с СД наблюдалось увеличение интервала RR ($p < 0.001$), QT ($p < 0.001$) и интервала Tpeak – Tend ($p < 0.001$) (критерий Краскела – Уоллиса). Увеличение длительности QRS обнаружилось только в группе короткого диабета ($p = 0.049$, критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса).

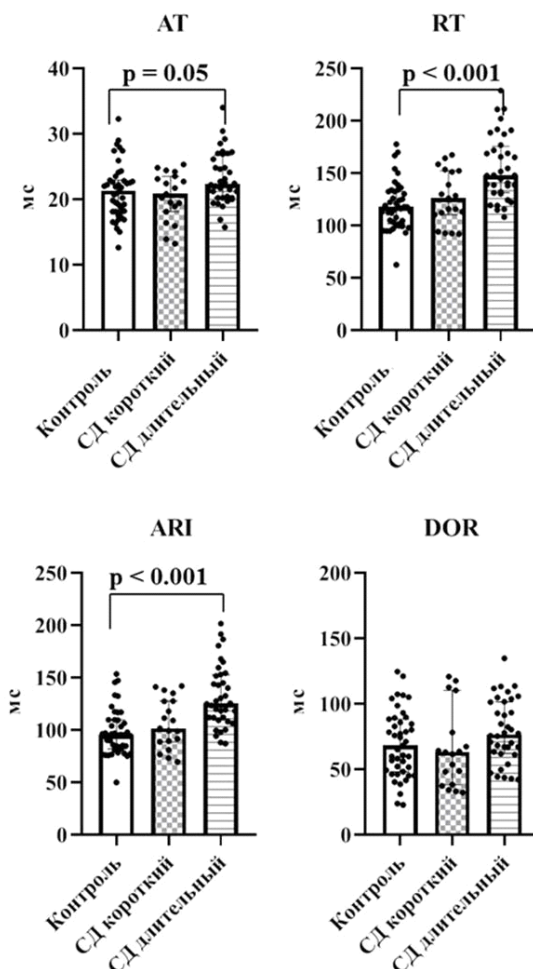


Рисунок 1 - Сравнение исходных значений времени активации (AT), времени окончания реполяризации (RT), интервала активация-реполяризация (ARI) и дисперсии реполяризации (DOR) контрольной группы и групп с коротким и длительным сахарным диабетом у кроликов (критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса).

На верхушке левого желудочка в исходном состоянии (до ишемии - реперфузии) DOR значительно отличалась от контрольной группы только в группе СД короткий. Значения AT, RT и ARI у крыс с любой длительностью диабета были значительно больше, чем в группе контроля (рис. 2).

Верхушка левого желудочка

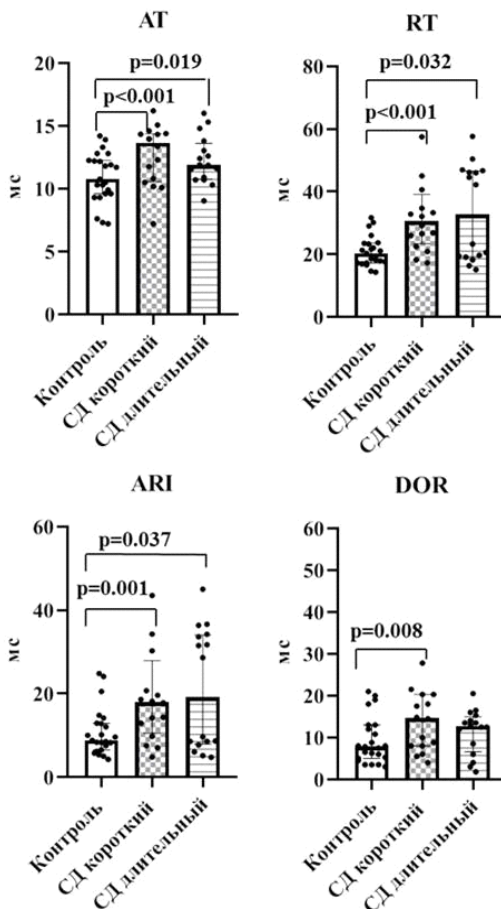


Рисунок 2 - Сравнение исходных значений времени активации (АТ), времени окончания реполяризации (RT), интервала активация-реполяризация (ARI) и дисперсии реполяризации (DOR) верхушки левого желудочка в контрольной группе и в группах крыс с различной продолжительностью СД до коронарной окклюзии (критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса).

В основании левого желудочка АТ увеличивалось только в группе короткого СД. RT и DOR увеличивались у крыс с СД в независимости от стажа. ARI было значимо больше только в группе длительного диабета.

У крыс с диабетом наблюдалось значимое замедление проведения как в левом, так и правом желудочке (рис. 3).

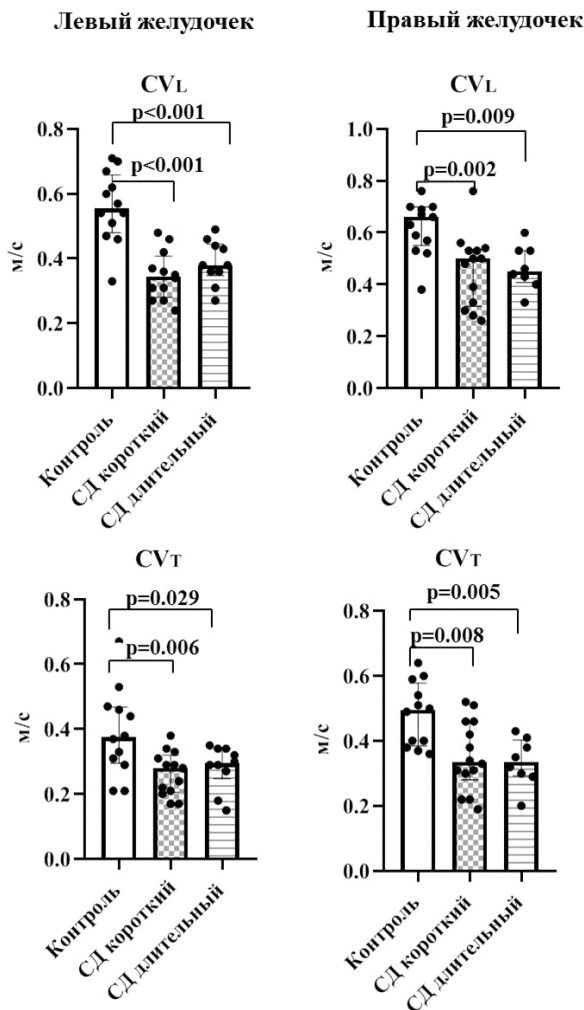
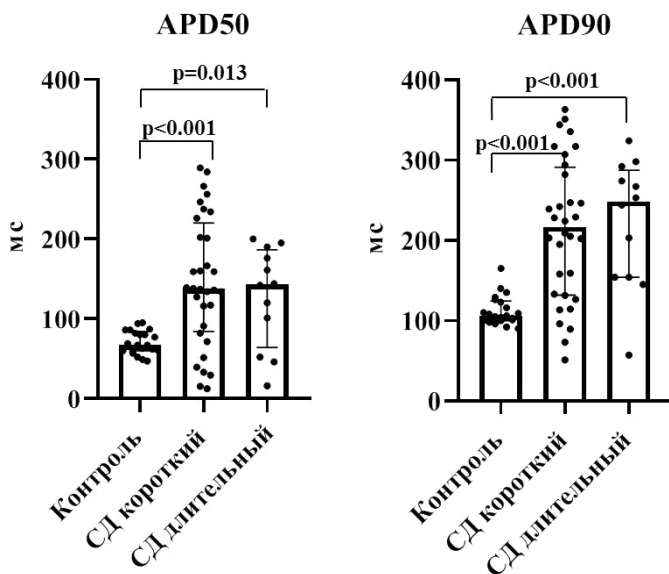


Рисунок 3 - Сравнение скоростей проведения (CV_L – продольная скорость проведения, CV_T – поперечная скорость проведения) в исследуемых группах крыс в левом и правом желудочках, в м/с (критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса).

При сравнении длительности потенциала действия кардиомиоцитов желудочков, полученных в режиме current - clamp, наблюдается значимое увеличение длительности потенциала действия у крыс с сахарным диабетом (рис. 4).

1.



2. **Контроль** **СД короткий** **СД длительный**

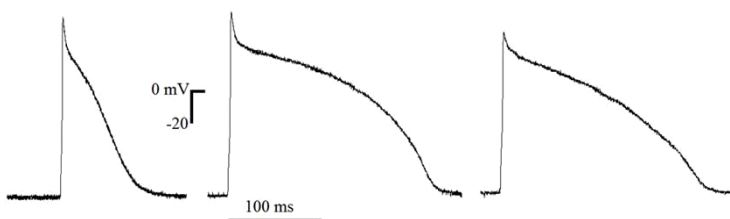


Рисунок 4 - Сравнение длительности потенциала действия кардиомиоцитов желудочков в исследуемых группах крыс на уровне 50 и 90 % реполяризации (APD50 и APD90), оцененная в режиме current – clamp.

1. Значение длительности потенциала действия кардиомиоцитов желудочков в изучаемых группах на уровне 50 и 90 % реполяризации (APD50 и APD90) (критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса).

2. Репрезентативные записи потенциалов действия в исследуемых группах.

Быстрый натриевый ток (I_{Na}) усиливался у крыс с коротким СД по сравнению с контролем. При этом, с увеличением стажа диабета ток I_{Na} снижался и в группе длительного СД был меньше, чем в группе контроля (табл.)

Таблица – Сравнение пикового показателя амплитуды ионных токов изолированных желудочковых кардиомиоцитов исследуемых групп крыс (*- сравнение с контролем, критерий Манна-Уитни с поправкой Йейтса после оценки критерия Краскела-Уоллиса)

мВ / группа	Контроль	СД короткий		СД длительный	
	медиана (МКИ)	медиана (МКИ)	p*	медиана (МКИ)	p*
Быстрый натриевый ток (INa), пА/пФ					
- 30	-71.3 (-58.7)–(-94)	-96.97 (-83.5)–(-114.4)	0.005	-52.6 (-45)–(-62)	0.001
Кальциевый ток L-типа (ICaL), пА/пФ					
0	-6.1 (-4.8)–(-7.7)	-8.5 (-7.1)–(-10.5)	0.001	-6.7 (-4.0)–(-8.7)	0.050
- 10	-3.2 (-2)–(-4.3)	-7.1 (-5.2)–(-9.2)	< 0.001	-6.0 (-1.9)–(-8)	0.001
Транзиторный калиевый ток (Ito), пА/пФ					
-10	2.9 (2.5–4.1)	3.8 (1.6–5.2)	0.811	1.1 (0.7–1.6)	< 0.001
Калиевый ток входящего выпрямления (IK1), пА/пФ					
- 60	1.4 (1.2–1.6)	1.8 (0.9–2.1)	0.313	1.2 (1.0–1.4)	0.323
-120	-12.7 (-11.6)–(-14)	-12.1 (-11)–(-12.5)	0.281	-13.1 (-10.4)–(-16)	0.592

Амплитуда кальциевого тока L – типа усиливалась у крыс с диабетом в независимости от стажа заболевания. Интересно, что зарегистрированные кальциевые токи L - типа, вызванные ступенью деполяризации до 0 мВ, показали, что время инактивации тока было заметно увеличено в кардиомиоцитах крыс с коротким СД, но сокращено в кардиомиоцитах крыс с длительным СД. Постоянные времена затухания тока ICaL были уменьшены в кардиомиоцитах животных с длительным СД по сравнению с коротким СД и контрольной группой.

Транзиторный калиевый ток (Ito) не отличался от контроля при коротком СД. У крыс из группы длительного СД ток Ito был значительно меньше, чем у контрольной группы.

Калиевый ток входящего выпрямления (IK1) в группах с сахарным диабетом не отличался от контрольной группы.

Влияние адипонектина на электрофизиологические характеристики миокарда желудочков.

На ЭКГ интервалы QT ($p = 0.021$) и Tpeak - Tend ($p = 0.009$) были значимо больше у крыс, получавших адипонектин по сравнению с контролем.

Средние значения ARI и RT на вершущке левого желудочка были значимо больше у крыс, получавших адипонектин. При сравнении средних значений AT на вершущке левого желудочка отличий между группами не выявлено ($p = 0.07$) (рис. 5).

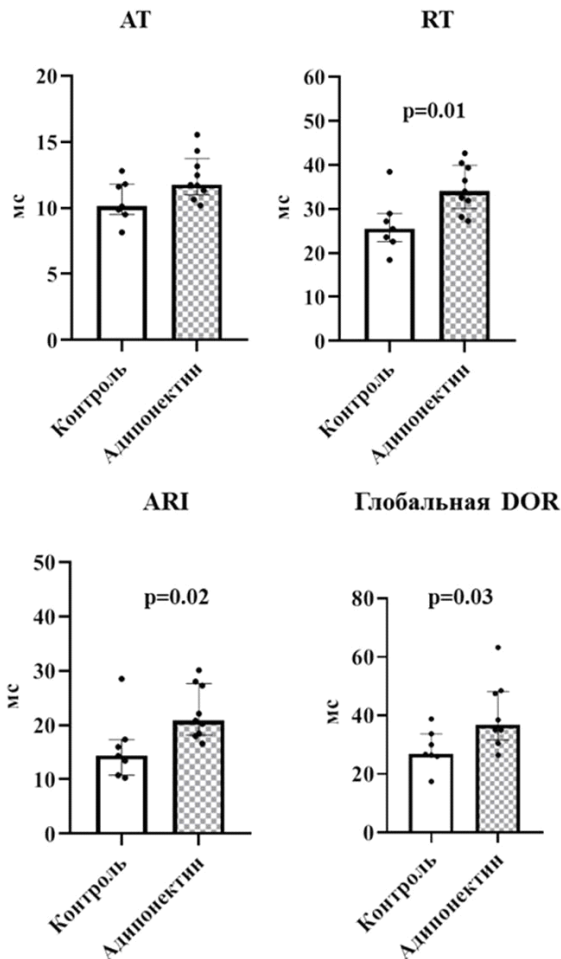


Рисунок 5 - Сравнение исходных значений времени активации (AT), времени окончания реполяризации (RT) и интервала активация-реполяризация (ARI) на вершущке левого желудочка и глобальной дисперсии реполяризации (DOR) у крыс контрольной группы и группы, получавшей адипонектин (критерий Манна – Уитни).

В основании левого желудочка DOR была значимо больше в группе адипонектина ($p = 0.024$), при этом остальные показатели между группами не отличались.

В группе крыс, получавших адипонектин, наблюдалось значимое увеличение глобальной DOR в сравнении с контролем (рис. 5).

При оценке скорости проведения значимой разницы между группами не выявлено.

Заключение

Настоящее исследование показало, что электрическое ремоделирование миокарда желудочков при ДКМ зависит от стажа экспериментального СД. В то время как удлинение потенциала действия и замедление проведения являются основными электрофизиологическими изменениями при СД разного стажа, механизмы этих изменений различны, и это различие связано с восприимчивостью к желудочковым жизнеугрожающим аритмиям. Проаритмический фенотип включает изменения, а именно: фиброз миокарда, увеличение натриевого тока и кальциевого при сохранных калиевых токах (Ito и IK1), которые в совокупности приводят к снижению скорости проведения по миокарду, удлинению потенциала действия кардиомиоцитов и увеличению дисперсии реполяризации левого желудочка.

Адипонектин рассматривается как перспективный защитный агент в контексте метаболических нарушений, происходящих при СД и ожирении. Настоящее исследование показало, что введение адипонектина было связано с удлинением желудочковой реполяризации и увеличением её дисперсии, проявившимся в удлинении интервалов QT и Tpeak-Tend на ЭКГ. Эти эффекты адипонектина аналогичны изменениям, развивающимся при диабетической кардиомиопатии, что позволяет предположить положительные электрофизиологические последствия снижения уровня адипонектина при СД.

ВЫВОДЫ

1) Впервые показано, что при диабетической кардиомиопатии у крыс аритмогенный субстрат, способствующий развитию реперфузионной желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков, формируется за счёт следующих механизмов: усиление деполяризующих токов натрия и кальция при сохраненных калиевых токах, а также увеличение дисперсии реполяризации левого желудочка и замедление скорости проведения, вследствие фиброза миокарда.

2) Формирование аритмогенных электрофизиологических изменений миокарда желудочков при экспериментальной диабетической кардиомиопатии зависит от стажа заболевания. При диабетической кардиомиопатии у кроликов увеличение частоты реперфузионной желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков происходит через 2 месяца, а у крыс спустя месяц от индукции диабета.

3) Впервые выявлено, что изменения ионных токов желудочковых кардиомиоцитов при диабетической кардиомиопатии у крыс имеют динамический характер: от усиления входящих токов натрия и кальция спустя месяц от начала заболевания, до ослабления этих токов и транзиторного выходящего тока калия, при длительности диабета 2 месяца.

4) Впервые показано, что антидиабетический гормон - адипонектин, влияет на электрофизиологические свойства миокарда желудочков, увеличивая показатели продолжительности потенциала действия, длительности и дисперсии реполяризации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах в том числе индексируемых в базах данных Web of Science, PubMed, Scopus:

1. **Pershina, E.** Prolongation of experimental diabetes mellitus increased susceptibility to reperfusion ventricular tachyarrhythmias / **E. Pershina, J. Azarov, M. Vaykshnorayte, O. Bernikova, A. Ovechkin** // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2021. – V. 99. – № 10. – P. 1097 – 1101. **WoS. PubMed. Scopus.**
2. **Sedyakina, E.N.** Adiponectin prolongs repolarization in rat ventricular myocardium / **E.N. Sedyakina, A.S. Tsvetkova, E.A. Polyakova, M.M. Galagudza, D.L. Sonin, J.E. Azarov, A.O. Ovechkin** // Journal of evolutionary biochemistry and physiology. – 2024. – V. 60. – № 5. – P. 1685 – 1692. **WoS. BAK.**
3. **Седакина, Е.Н.** Дисперсия реполяризации как предиктор жизнеугрожающих желудочковых аритмий при экспериментальном сахарном диабете малого стажа / **Е.Н. Седакина, А.С. Цветкова, А.В. Дуркина, М.А. Гонотков, Я.Э. Азаров, А.О. Овечкин** // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2024. – Т. 4. – С. 133 – 145. **BAK.**

Другие публикации в научных изданиях:

1. **Першина Е.Н.** Электрофизиологические особенности миокарда при экспериментальном диабете и их связь с аритмиями в модели ишемии / **Першина Е.Н.**, Берникова О.Г., Вайкшнорайте М.А., Азаров Я.Э., Овечкин А.О. // Материалы VII Всероссийской с международным участием школы – конференции «Физиология и патология кровообращения», Москва, 3-6 февраля 2020 года – М.: РА «ИЛЬФ», 2020. – С. 104 – 105.
2. Ovechkin A.O. Prolonged alloxan diabetes mellitus in rabbits, an experimental model associated with increased susceptibility to reperfusion ventricular tachyarrhythmias / Ovechkin A.O., Vaykshnorayte M.A., Bernikova O.G., **Pershina E.N.**, Azarov J.E. // The FASEB Journal. Special issue: Experimental Biology 2021 Meeting Abstracts, May 2021. – Vol. 35. – P. 1.
3. **Sedyakina E.** Electrical Remodeling and Arrhythmogenicity of Ventricular Myocardium in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus / **Sedyakina E.**, Gonotkov M., Tsvetkova A., Azarov J., Ovechkin A. // IEEE Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB), Novosibirsk, September 2023. – P. 279 – 282.
4. **Седякина Е.Н.** Влияние длительности экспериментального сахарного диабета на электрофизиологическое ремоделирование миокарда желудочков у крыс / **Седякина Е.Н.**, Гонотков М.А., Цветкова А.С., Овечкин А.О. // Материалы четвертой молодежной школы – конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций», Звенигород, 15-17 сентября 2023 г. – М.: Издательство «Наука», 2023. – С. 38 – 40.
5. **Седякина Е.Н.** Адипонектин удлиняет реполяризацию в миокарде желудочков крыс / **Седякина Е.Н.**, Азаров Я.Э., Цветкова А.С., Овечкин А.О. // Кардиологический вестник. Спецвыпуск, 2024. – Т. 19. – С. 36 – 37.
6. **Седякина Е.Н.** Особенности электрического ремоделирования миокарда желудочков при экспериментальном сахарном диабете различной длительности / **Седякина Е.Н.**, Гонотков М.А., Цветкова А.С., Азаров Я.Э., Овечкин А.О. // Кардиологический вестник. Спецвыпуск, 2024. – Т. 19. – С. 37.

Автор благодарит своего научного руководителя
кандидата медицинских наук, доцента
Овечкина Алексея Олеговича
за ценные советы и консультации,
а также всех сотрудников Лаборатории физиологии сердца
Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН
за помощь в проведении исследований и обсуждении данной работы.

Подписано в печать 26.02.2025

Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman. Формат 60х90^{1/16}.

Бум. IQ allround. Отпечатано на ризографе. Усл. печ. л. 1.0.

Тираж 100. Заказ 162.

Информационно-издательский отдел

Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра
«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»
(ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, 167982,

г. Сыктывкар, ул.Первомайская, д.50

