



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15111 (13) U  
(51) МПК  
G09B 23/28 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГІПОПОЛЯРИЗАЦІЙНИХ АРИТМІЙ СЕРЦЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ГІПОПОЛЯРИЗАЦІЇ КАРДІОМІОЦИТІВ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

1

2

(21) u200512011

(22) 14.12.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Мороз Василь Максимович, Липницький Тарас Миколайович, Клекот Олександра Олексіївна

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І.ПИРОГОВА

(57) 1. Спосіб моделювання гіпополяризаційних аритмій серця та визначення ступеня гіпополяризації кардіоміоцитів у експериментальних тварин, що передбачає дослідження калій-індукованої гіпополяризації мембран, який **відрізняється** тим, що у тварин контрольної групи емпірично визначають мінімальну аритмогенну дозу 1,5 % розчину хлориду калію при внутрішньому введенні за 2 с, яка ініціює порушення провідності та ритму серця протягом 3-10 с; розчин досліджуваного препарату вводять в вену, а через 5 хв. в ту же вену протягом 2 с вводять мінімальну аритмогенну дозу хлориду

калію та безперервно реєструють ЕКГ до відновлення регулярного синусового ритму; ступінь гіпополяризації кардіоміоцитів визначають по наявності блокад та порушень ритму серця.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при 1-му ступені гіпополяризації мембран реєструється уповільнення атриовентрикулярної та внутрішньолучночкової провідності (збільшення тривалості інтервалів P-Q та QRS) без порушення ритму серця.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при 2-му ступені гіпополяризації мембран, окрім порушення провідності, з'являються аритмії серця.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при 3-му ступені гіпополяризації виникає тимчасова кардіоплегія.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при 4-му ступені гіпополяризації після внутрішнього введення розчину хлориду калію виникає зупинка серця та смерть експериментальних тварин.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до кардіології, і стосується дослідження патогенезу аритмій серця.

Сучасні уявлення про патогенез аритмій серця значно поповнились в результаті помітного прогресу експериментальної аритмології, досягнутого на протязі останнього десятиріччя. Чисельними експериментальними дослідженнями з використанням мікроелектродної техніки та просторового комп'ютерного моделювання „субстрату аритмій” встановлено, що при захворюваннях серця, які ускладнюються порушеннями ритму, є виражена тенденція до гіпополяризації клітин міокарду. Відомо, що потенціал спокою серцевих клітин обумовлений градієнтом концентрацій іонів  $K^+$  відносно клітинної мембрани та наявністю в цитозолі багатоатомних аніонів, які не проникають через клітинну мембрану, і дорівнює -85- -95мВ. Електричний імпульс синусового вузла (або кардіостимулятора) раптово зменшує негативний рівень потенціалу спокою до -60мВ, що призводить до активації потенціалзалежних натрієвих каналів; в

клітину вривається значна кількість іонів  $Na^+$  що обумовлює деполяризацію кардіоміоцитів та їх збудження (фаза 0 потенціалу дії). Заряд клітини на короткий час змінюється на позитивний (+20 - +30мВ). Але негайно іони  $K^+$  виходять із клітин (фаза 1), оскільки позитивний заряд цитозоля не задержує катіони, і в клітині відновлюється негативний заряд, що характеризує початок реполяризації мембран кардіоміоцитів. При наближенні кривої трансмембранного потенціалу до -35мВ відкриваються потенціал залежні кальцієві канали, що обумовлює потік іонів  $Ca^{2+}$  в кардіоміоцити (фаза 2 ПД) та активне скорочення міоцитів. Відновлення початкового від'ємного заряду в фазі 3 ПД настає внаслідок виходу із клітин іонів  $K^+$  причому кількість позитивних іонів  $K^+$  які виходять в міжклітинну рідину, обумовлює рівень від'ємного заряду потенціалу спокою (-95мВ). Отже, мембранний потенціал спокою (фаза 4) залежить від кількості іонів  $K^+$ , які визначають позитивний потік із цитозолю в міжклітинну рідину та обумовлюють рівень негативного заряду клітинної мембрани.

(13) U

(11) 15111

(19) UA

При реєстрації трансмембранного потенціалу дії окремих кардіоміоцитів при патологічних процесах виявлено, що негативне значення мембранного потенціалу спокою значно менше (гіпополяризація мембран), а ніж в клітинах аналогічних ділянках здорового серця. При зменшенні потенціалу спокою до  $-60\text{mV}$  виникає спонтанна активація натрієвих каналів і з'являються екстрасистоли або пароксизмальна тахікардія по механізму спонтанної діастолічної деполяризації. При зменшенні потенціалу спокою до  $-35\text{mV}$  активуються кальцієві канали, порушується провідність, виникають вогнища reentry.

Сучасні досягнення в розкритті патогенетичних механізмів формування вогнищ аритмогенезу виявились настільки значущими, що рядом видатних вчених оцінені як „бурхливий прорив” в дослідженнях патогенезу аритмій серця.

В експериментах на тваринах встановлено, що гостра ішемія міокарду при оклюзії коронарних артерій призводить до підвищення проникливості плазматичних мембран кардіоміоцитів, внаслідок чого іони  $\text{K}^+$  по концентраційному градієнту проникають із клітин в міжклітинну рідину. Встановлено, що вихід з клітин тільки 1% іонів  $\text{K}^+$  підвищує їх концентрацію в міжклітинній рідині в 2 рази. Таким чином, позаклітинна концентрація іонів  $\text{K}^+$  підвищується, що призводить до зменшення подальшого його виходу із клітин та зменшення негативного рівня потенціалу спокою, оскільки до кінця фази ре-поляризації певна кількість позитивних іонів  $\text{K}^+$  залишається в цитозолі кардіоміоцитів. В залежності від ступеня зменшення мембранного потенціалу спокою виникають  $\text{Na}^+$  або/та  $\text{Ca}^{2+}$  - залежні порушення ритму серця. Подальше зменшення негативного рівня потенціалу спокою призводить до інактивації натрієвих і кальцієвих іонних каналів, кардіоміоцити не збуджуються, настає короточасна кардіоплегія, тривалість якої залежить від ступеня позаклітинної концентрації іонів  $\text{K}^+$ . Тимчасова зупинка серця при внутрішній інфузії препаратів калію широко використовується в кардіохірургічній практиці. Але надмірно висока ступінь гіпополяризації мембран призводить до того, що скорочення серця не відновлюються, і настає смерть.

Відомо, що гіпополяризацію кардіоміоцитів досліджують на окремих клітинах міокарду [Д. К. Гебсби, Э. Л. Вит «Нормальная и аномальная электрическая активность сердечных клеток», В кн.: Аритмии сердца. Механизмы, диагностика, лечение. Под ред. В. Дж. Мандела. Пер. с англ. В 3т. М.: «Медицина».- 1996. - Т.1. - С.107-155], розміщених в камері, яка перфузується теплим оксигенованим розчином. Потенціали дії в таких препаратах ініціюють короткими імпульсами електричного струму, реєстрацію трансмембранного потенціалу дії проводять з використанням мікроелектродів. Кінчик одного із них вводять в клітину, а другий встановлюють зовні на клітинній мембрані. Досліджуванні препарати, які впливають на реполяризацію та мембранний потенціал спокою, а відтак і на ритм серця (антиаритмічні засоби, препарати калію, кальцію та магнію, адреналін, ацетилхолін та ін.) додають до перфузуючого розчину. Недоліками способу слід вважати немож-

ливість його застосування у тварин in vivo, а також складні технологічні умови експерименту. Не підлягає сумніву також, що проникливість клітинних мембран ізольованих кардіоміоцитів для досліджуваних фармакологічних препаратів суттєво відрізняється від клітин, які функціонують в умовах цілісного організму.

В основу корисної моделі „Спосіб моделювання гіпополяризаційних аритмій серця та визначення ступені гіпополяризації кардіоміоцитів у експериментальних тварин” поставлено завдання розробити методику визначення гіпополяризації кардіоміоцитів у експериментальних тварин in vivo, що розширить можливості дослідження патогенезу аритмій серця, а також механізмів та умов виникнення аритмогенних ефектів антиаритмічних препаратів та інших фармакологічних засобів. Поставлене завдання вирішується шляхом застосування експериментальної гіперкаліємії, при якій легко дозувати концентрацію іонів  $\text{K}^+$  в плазмі крові та в міжклітинній рідині та ініціювати гіпополяризаційні порушення ритму серця. Для цього у тварин контрольної групи визначають дозу 1,5% розчину хлориду калію, яка вводиться в вену за 2с і на короткий час проковує аритмії серця. Таку ж кількість хлориду калію вводять після внутрішньої інфузії досліджуваного препарату, визначаючи особливості перебігу аритмій серця в залежності від ступеня гіпополяризації плазматичних мембран.

Спосіб здійснюється таким чином: експериментальну тварину наркотизують нембуталом ( $35\text{mg/kg}$  в черевну порожнину), фіксують і реєструють ЕКГ в II відведенні від кінцівок, після чого в стегнову вену вводять мінімальну аритмогенну дозу хлориду калію, яка ініціює гіпополяризацію мембран і порушення ритму серця. Така доза 1,5% розчину хлориду калію визначається емпірично з в контрольній групі тварин. При мінімальній аритмогенній дозі хлориду калію з'являються порушення провідності (атриовентрикулярні та внутрішлудочкові блокади) та одиночні екстрасистоли, які реєструються на ЕКГ на протязі 3-10с, після чого відновлюється правильний синусовий ритм. Для щурів мінімальна аритмогенна доза складає  $20\text{mg/kg}$ , яку вводять в вену в 1,5% розчині на протязі 2с. Через 15хв. розчин досліджуваного препарату вводять в вену в рекомендованій експериментальній дозі, а через 5хв. в ту же вену на протязі 2с повторно вводять мінімальну аритмогенну дозу хлориду калію, безперервно реєструючи ЕКГ до відновлення синусового ритму. На ЕКГ визначають порушення провідності та патогенетичні форми аритмій серця.

Аналіз результатів експериментальних досліджень порушень ритму серця при гіпополяризації мембран внаслідок гіперкаліємії у щурів дозволяє виділити 4 ступені гіпополяризації кардіоміоцитів. При 1-му ступені гіпополяризації реєструється уповільнення атриовентрикулярної та внутрішлудочнової провідності (збільшення тривалості інтервалів P-Q та QRS) без порушення ритму серця. При 2-му ступені гіпополяризації, окрім порушення провідності, з'являються аритмії серця (одиночні, парні та групові екстрасистоли, короткі епізоди пароксизмальної тахікардії). При 3-му ступені гіпополяризації виникає тимчасова кардіоплегія, при

якій реєструється повна атриовентрикулярна блокада та зубці Р при відсутності шлуночкових комплексів. Після спонтанного відновлення шлуночкових комплексів в переважній більшості щурів (86%) на протязі 3-5хв. реєструється шлуночкова екстрасистолічна аритмія, епізоди ідіовентрикулярного ритму або пароксизмальної тахікардії. При 4-му ступені гіпополяризації після внутрішнього введення мінімальної аритмогенної дози розчину хлориду калію виникає зупинка серця та смерть експериментальних тварин (див. рисунок).

Приклад. Наркотизованому нембуталом (35мг/кг в черевну порожнину) щурів вагою 200г після реєстрації вихідної ЕКГ в II відведенні в стегнову вену введено 0,26мл 1,5% розчину хлориду калію за 2с, тобто мінімальну аритмогенну дозу препарату. На ЕКГ через 3 с зареєстрована атриовентрикулярна блока 1-го ступеня, широкі комплекси QRS з глибокими зубцями S. Через 4с відновився правильний синусовий ритм. Мінімальна аритмогенна доза хлориду калію ініціювала гіпополяризацію 1-го ступеня. Аналогічні зміни ЕКГ зареєстровані у 9 щурів (із 10 тварин контрольної групи), причому їх тривалість змінювалась від 3-х до 10с. Через 15хв. щурів в ту ж вену ввели 0,4мл 0,5% розчину аміодарону (10мг/кг). Через 5хв. на ЕКГ зареєстрована синусова брадикардія без суттєвих змін форми шлуночкових комплексів та тривалості інтервалів. На фоні синусової брадикардії

внутрішнє введено 0,26мл 1,5% розчину хлориду калію на протязі 2с. Через 4с на ЕКГ зареєстровані 5 широких шлуночкових комплексів, виникла повна атриовентрикулярна блокада без шлуночкових комплексів, тобто шлуночки серця не скорочувались. Кардіоплегія продовжувалась 4,5хв., після чого появились одинокі комплекси QRS та екстрасистолічна аритмія. Правильний синусовий ритм відновився лише через 8хв.

Результати експерименту. Амідарон в дозі 10мг/кг блокує калієві канали плазматичних мембран, зменшуючи вихід іонів  $K^+$  із кардіоміоцитів. Певна кількість катіонів калію в кінці фази реполяризації залишилась в цитозолі клітин, що призвело до гіпополяризації мембран. Аритмогенна доза хлориду калію призвела до виникнення 3-ї ступені гіпополяризації мембран, внаслідок чого виникла тимчасова кардіоплегія з наступною екстрасистолічною аритмією.

Спосіб експериментального моделювання гіпополяризаційних аритмій серця та визначення ступеня гіпополяризації може використовуватись для дослідження аритмогенних ефектів антиаритмічних препаратів та інших фармакологічних засобів. Методика дослідження проста і доступна для любой лабораторії експериментальної кардіології. Результати дослідів вражають стабільністю і відтворюються практично у всіх експериментальних тварин.