



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71186 (13) A

(51) 7 A61B10/00, G09B23/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИАРИТМІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН**

1

2

(21) 20031110742

(22) 27.11.2003

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Мороз Василь Максимович, Липницький Тарас Миколайович, Козловський Вадим Олексійович, Бандурка Наталя Миколаївна

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

(57) Спосіб кількісного визначення ефективності антиаритмічних препаратів у експериментальних тварин, що передбачає введення лікарських препаратів з метою попередження порушень ритму серця і реєстрацію електрокардіограми, який відрізняється тим, що через дві хвилини після внутрішньовенного введення антиаритмічного препарату вводять аритмогенний кардіотоксин в дозі, яка перевищує мінімальну аритмогенну дозу

на 20%, а через шість хвилин в вену болюсно вводять 1% розчин АТФ в дозі 1мг/кг ваги тіла і визначають ступінь антиаритмічної ефективності досліджуваного препарату.

при виникненні аритмії з запізненням на 4-6хв після введення кардіотоксину і періодичному спонтанному відновленні правильного синусового ритму протягом 30хв;

при відсутності аритмії протягом 6хв після введення кардіотоксину і її виникненні при АТФ-індукованій повній атриовентрикулярній блокаді; після блокади при відновленні синусового ритму протягом 1-2хв кількість ектопічних комплексів збільшується;

при виникненні аритмії серця тільки після атриовентрикулярної блокади;

при збереженні стабільного синусового ритму протягом досліджу.

Винахід належить до медицини, а саме до кардіології, і стосується доклінічного випробування ефективності, антиаритмічних препаратів.

Об'єктивність результатів доклінічного дослідження ефективності нових антиаритмічних препаратів в значній мірі залежить від раціонального вибору експериментальних моделей аритмії серця, для ініціації яких застосовуються кардіотоксини з високим спорідненням до певних іонних каналів або рецепторів серця. В експериментальній кардіології кардіотоксини з селективною дією на іонні канали використовуються також для тонкого фармакологічного аналізу патогенетичних механізмів формування ектопічного аритмогенезу. Так, для активації натрієвих каналів та провокації  $Na^+$ -залежних аритмії серця у експериментальних тварин широко використовуються аконітам і вератрин, а для блокади натрієвих каналів - тетродотоксин. Специфічних активаторів кальцієвих каналів сарколеми немає, але відомо, що верапаміл та ділтиазем надійно блокують їх функції. Широко застосовуються також активатори та блокатори калієвих каналів.

Другою умовою отримання об'єктивних результатів оцінки антиаритмічної активності досліджуваних препаратів слід вважати вибір раціонального методу їх застосування: для лікування розвинених аритмії серця або з метою попередження їх виникнення. Наприклад, при використанні хлоридкальцієвої моделі порушень ритму препарати можна використовувати тільки для профілактики аритмії, оскільки тривалість порушень ритму серця вимірюється лише декількома хвилинами. При аконітиновій, хлоридбарієвій та строфантинівій моделях аритмії серця можна застосовувати обидва методи. Але при експериментальних дослідженнях ефективності препаратів з метою попередження аритмії серця виникають труднощі в точному дозуванні аритмогенних кардіотоксинів з врахуванням індивідуальної чутливості до них експериментальних тварин. Очевидно, що значне підвищення їх дози може проявитися помилковою оцінкою неефективності препаратів; при застосуванні дещо занижених доз кардіотоксинів порушення ритму не виникають, і оцінка антиаритмічної ефективності препарату буде підвищеною.

(13) A

(11) 71186

(19) UA

Необхідність дослідження ефективності антиаритмічних препаратів з метою попередження формування аритмії серця визначається тим, що при деяких експериментальних моделях порушень ритму серця, особливо при аконітиновій аритмії, активність відомих і ефективних препаратів (аміодарону, новокаїнамід, етацизину) трудно оцінювати, оскільки при розвинутих формах аритмії вони відновлюють правильний синусовий ритм лише на нетривалий час (0,5-3хв.), після чого аритмія знову появляється і продовжує прогресувати, перетворюючись в більш тяжкі форми. Повторні введення досліджуваного антиаритмічного препарату також не призводять до стабільного синусового ритму, а підвищення доз - до появи побічних ефектів (порушення провідності, аритмогенних ускладнень, апное і т.ін.).

Разом з тим, аконітинова модель аритмії серця вважається загально визнаною, стійкою (продовжується 1,5-2 години), завжди набуває прогресуючого перебігу, і абсолютна більшість тварин гине. Антиаритмічний препарат, який відновлює стабільний синусовий ритм серця при аконітиновій аритмії і мало токсичний, заслуговує особливої уваги.

Відомо, що алкалоїд аконітин активує натрієві канали сарколеми кардіоміоцитів, внаслідок чого в клітину надходить надмірна кількість іонів  $\text{Na}^+$ . В початковій фазі досліджування виникає  $\text{Na}^+$ -залежна шлуночкова екстрасистолічна бігемінія. Але через декілька хвилин концентрація іонів  $\text{Na}^+$  в міоцитах настільки збільшується, що включається  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін і в цитозоль клітини поступає значна кількість іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже прогресуючі форми аритмії серця обумовлені аритмогенними концентраціями іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$ , тобто основними іонами, які призводять до електричної нестабільності міокарду та порушення ритму серця. Патогенетичний механізм формування ектопічного аритмогенезу при аконітиновій аритмії складний, оскільки включаються також центральні нервові фактори, які впливають на ритм серця. Це наближує аконітинову модель до природних умов виникнення порушень ритму у людини, що підвищує значущість моделі при дослідженні антиаритмічної ефективності лікарських засобів.

Відомий класичний спосіб моделювання  $\text{Na}^+$ -залежних аритмії серця аконітином (Н.В.Каверина, З.П.Сенова. Методические рекомендации по экспериментальному (фармакологическому) изучению препаратов, предлагаемых в качестве средств профилактики и лечения нарушенного ритма сердца. - М.: МЗ. -1981) полягає в тому, що тварині внутрішньовенно вводять розчин аконітину в дозі 30-40мкг/кг. Але в методичних рекомендаціях не вказано якому методу дослідження та при яких умовах слід віддати перевагу: антиаритмічний препарат вводити з метою лікування, чи попередження порушень ритму серця. Крім того, автори рекомендацій не розробили кількісний спосіб оцінки антиаритмічної ефективності досліджуваного препарату, що не дозволяє провести порівняльну оцінку клінічної цінності антиаритмічних засобів.

В основу винаходу „Спосіб кількісного визначення ефективності антиаритмічних препаратів у

експериментальних тварин" поставлена задача; розробити більш досконалий спосіб оцінки ефективності антиаритмічних засобів з визначенням не тільки явних порушень ритму серця, а і прихованої аритмогенної активності міокарду. Крім того, з метою порівняльної оцінки ефективності різних лікарських засобів необхідно розробити принцип визначення ступеню антиаритмічної активності препаратів. Поставлена задача вирішується тим, що після послідовного внутрішньовенного введення досліджуваного антиаритмічного препарату та аритмогенного кардіотоксину (наприклад, розчину аконітину) при відсутності явних порушень ритму серця в вену вводять 0,1% розчин АТФ (1мг/кг), створюючи короточасну повну атріовентрикулярну блокаду серця. При цьому виникає вузловий ритм, частота серцевих скорочень зменшується в два рази, і в клітинах міокарду складаються умови для активації ектопічного аритмогенезу. Якщо антиаритмічна активність препарату не висока, на ЕКГ реєструється аритмія серця внаслідок наявності прихованої аритмогенної активності, яка не проявляється при нормальній частоті серцевого ритму. Використання способу визначення прихованої аритмогенної активності після введення антиаритмічного засобу відкрило можливість розділити антиаритмічну ефективність препаратів на чотири ступені в залежності від того, при яких умовах реєструються аритмії серця.

Спосіб використовується таким чином: наркозовану нембуталом (35мг/кг в черевну порожнину) тварину фіксують і реєструють вихідну ЕКГ в П відведенні від кінцівок; в стегнову вену вводять розчин антиаритмічного препарату в рекомендованій дозі. Через дві хвилини в ту же вену вводять розчин кардіотоксину в дозі, яка на 20% перевищує мінімальну аритмогенну дозу, що дозволяє виключити можливість індивідуальної пониженої чутливості тварини до кардіотоксину. Оскільки аконітин частково інактивується в водяному розчині, його мінімальну аритмогенну дозу необхідно перевіряти перед кожною серією досліджень. Для цього шураам контрольної групи вводять розраховану дозу кардіотоксину (для аконітину - 40 мкг/кг), а в наступних дослідах дозу аконітину зменшують до мінімальної, яка провокує виникнення аритмії серця на протязі 2,5-3,5хв. Мінімальну дозу розчину кардіотоксину збільшують на 20% і вводять шураам в вену. При постійному моніторингу ЕКГ відмічають час появи порушень ритму серця. Якщо через 6хв. після інфузії аконітину аритмія не виникає, в вену вводять АТФ в дозі 1мг/кг в 0,5% розчині і постійно реєструють ЕКГ до відновлення синусового ритму. Моніторинг і періодичну реєстрацію ЕКГ продовжують на протязі 30хв. з моменту введення аконітину.

Оцінка результатів дослідження. Якщо аритмія серця виникає на протязі перших 4хв. після інфузії аконітину, незважаючи на профілактичне введення антиаритмічного препарату, необхідно вважати, що він при даній експериментальній моделі в рекомендованій дозі не володіє антиаритмічними властивостями. Застосування способу визначення прихованої аритмогенної активності міокарду дозволяє виділити чотири ступені антиаритмічної

ефективності. При першій ступені - аритмії серця виникають після введення аритмогенного кардіотоксина із запізненням (на 4-6хв.), вони періодично спонтанно зникають і перебіг менш „агресивний“. Друга степінь антиаритмічної ефективності препаратів проявляється тим, що аритмії серця не виникають на протязі перших 6хв., але при АТФ-індукованій повній атріовентрикулярній блокаді появляються аритмії, тобто існує прихована аритмогенна активність міокарду. В перші 1-2хв. після ариовентрикулярної блокади при відновленні синусового ритму кількість екстрасистолічних комплексів значно збільшується, виникає групова екстрасистоля і можлива її трансформація в шлуночкові тахікардію. При третій ступені - аритмії серця не появляються і не реєструються після введення розчину АТФ, але при відновленні синусового ритму після блокади реєструється екстрасистоля. Четверга ступінь антиаритмічної ефективності препарату характеризується тим, що аритмії серця не появляються після введення АТФ, а також в період після блокади; синусовий ритм стабільний на протязі 30хв., незважаючи на введення тварині підвищеної дози кардіотоксину.

Приклад.

Наркотизованому нембуталом (35мг/кг в черевну порожнину) щурові вагою 200г після реєстрації вихідної ЕКГ в П відведенні в стегнову вену введено 0,4мл 0,5% розчину аміодарону

(10мг/кг). Через 3хв. в ту же вену введено 8мкг аконітину в 0,0001% розчині. При постійному моніторингу ЕКГ на протязі 6хв. порушення ритму серця не виявлено. В вену болюсно введено 0,2мл 0,1% розчину АТФ. На ЕКГ зареєстрована повна атріовентрикулярна блокада з вузловим ритмом. Після 5-ти вузлових комплексів зареєстрована шлуночкова екстрасистолічна бігемінія. Після відновлення синусового ритму кількість екстрасистолічних комплексів значно збільшилась.

Результати досліджу: аміодарон в дозі 10мг/кг при аконітиновій моделі аритмії серця проявляє антиаритмічну ефективність II ступеню.

Застосування аміодарону з метою лікування розвинутих аконітинових аритмій серця не завжди успішне і практично ніколи не відновлює стабільний синусовий ритм. Об'єктивно визначити його антиаритмічну ефективність в оціночних балах при такому методі дослідження абсолютно неможливо.

Розроблений спосіб дослідження ефективності антиаритмічних препаратів методом: попередження аритмій серця: відносно простий, економічно доступний і може застосовуватися в лабораторіях експериментальної кардіології для кількісного визначення антиаритмічної ефективності лікарських засобів в оціночних балах або в ступенях антиаритмічної активності, що дозволяє порівнювати ефективність різних антиаритмічних препаратів.