

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР**

Доклинические исследования лекарственных средств

Методические рекомендации

Под редакцией
члена-корреспондента АМН Украины
А.В. Стефанова

Киев 2002

УДК 615.2.03

ББК 52.81

Д 63

**Доклинические исследования лекарственных средств
(методические рекомендации)**

Под редакцией члена-корреспондента АМН Украины А.В. Стефанова

Одобрено на заседании научно-экспертного совета
Государственного фармакологического центра МЗ Украины
26.04.2001 г. (протокол № 4)

Редакционная коллегия:

к.б.н. И.В. Данова
д.б.н. В.Н. Коваленко
д.м.н. Н.В. Литвинова
д.м.н. А.И. Соловьев
к.б.н. С.М. Тишкин
к.б.н. М.А. Филоненко-Патрушева
д.м.н., проф. С.Б. Французова
д.м.н. В.В. Храпак
к.б.н. А.С. Хромов

Перевод с украинского:

И.И. Котвицкая
Т.В. Тихонович

© Издательский дом «Авиценна», 2002 г.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Доклинические испытания лекарственных средств являются обязательным и одним из важнейших этапов их создания. Соответствующее выполнение всего комплекса исследовательских процедур и операций по изучению безвредности и специфической активности гарантирует в дальнейшем безопасность и высокую терапевтическую эффективность потенциальных лекарственных средств в условиях клинического применения.

Создание в Украине современной системы доклинических испытаний лекарственных средств, которая бы в полной мере отвечала международным требованиям – одна из важнейших задач на пути разработки эффективных, безопасных и конкурентоспособных лекарственных препаратов. Не менее важной задачей является недопущение на внутренний рынок малоэффективных лекарственных средств, не отвечающих требованиям безопасности.

Все это обусловило необходимость создания данного издания, целью которого является унификация методических подходов к оценке безвредности и специфической активности лекарственных средств. В книге обобщен опыт ведущих специалистов Украины по вопросам поиска и доклинического изучения лекарственных препаратов, все методические рекомендации одобрены Научно-экспертным советом Государственного фармакологического центра МЗ Украины.

Перевод этого сборника на русский язык продиктован желанием расширить круг специалистов, заинтересованных в овладении современными методами доклинического исследования. Это поможет унифицировать подходы к объективной оценке лекарственных средств, а также будет способствовать более тесному научному сотрудничеству ученых Украины и стран СНГ. В результате перевода украинского издания на русский язык и последующего редактирования в настоящее издание внесены некоторые изменения и дополнения, которые существенно не изменили содержание и смысл методических рекомендаций.

Издание базируется на принципах надлежащей лабораторной практики (GLP), которая должна обеспечить достоверность результатов доклинических испытаний лекарственных средств и гарантировать их безопасность для человека.

Существующий свод принципов GLP жестко регламентирует исследования безопасности новых лекарственных средств, что гарантирует достоверность полученных данных. Однако они не регламентируют исследования по оценке специфической активности. Предлагаемое издание – это первая попытка собрать в одной книге методические рекомендации по определению специфической активности лекарственных веществ с целью унифицирования этих методов.

В соответствии с современными требованиями Европейской хартии о гуманном отношении к животным впервые значительное внимание уделено так называемым альтернативным методам (клеточным технологиям) изучения безвредности лекарственных препаратов с использованием клеточных моделей.

Издание содержит большое количество экспериментальных методик, которые используются при доклиническом изучении безвредности и специфической фармакологической активности лекарственных средств. С течением времени оно, несомненно, будет дополняться и расширяться. Но и в настоящем объеме книга станет необходимым и полезным пособием для всех исследователей, имеющих отношение к созданию и производству лекарственных препаратов, и ее методики позволят существенно повысить качество экспериментальных исследований в этой области.

Директор Государственного
фармакологического центра МЗ Украины,
член-корреспондент АМН Украины

А.В.Стефанов

Содержание

Раздел I. Надлежащая лабораторная практика (GLP)	7
Основные термины и понятия.....	10
Основные принципы.....	14
Краткосрочные испытания.....	46
Мониторинг соответствия испытаний принципам GLP.....	51
Альтернативные методы исследования токсичности химических веществ. (Применение принципов GLP).....	62
Раздел II. Доклиническое изучение безвредности лекарственных средств	77
Экспериментальное изучение токсического действия потенциальных лекарственных средств.....	78
Изучение кумулятивных свойств лекарственных средств при доклинических исследованиях.....	104
Изучение иммунотоксического действия лекарственных средств.....	108
Экспериментальное изучение эмбриотоксического действия лекарственных средств.....	121
Изучение гонадотоксического действия новых лекарственных средств и их влияния на репродуктивную функцию животных.....	146
Доклиническое изучение влияния лекарственных средств, применяемых во время беременности, на нейроэндокринные системы регуляции репродукции и адаптации у потомков.....	161
Оценка мутагенных свойств новых лекарственных средств.....	175
Изучение канцерогенных свойств новых веществ и лекарственных средств.....	196
Морфологические исследования на этапе доклинического изучения лекарственных средств.....	207
Раздел III. Оценка специфической фармакологической активности лекарственных средств	219
Экспериментальное изучение антиаритмических и антифибрилляторных лекарственных средств.....	220
Экспериментальное изучение новых кардиотонических средств.....	237
Экспериментальное изучение антиангинальных, противоишемических, кардиопротекторных средств.....	256
Экспериментальное изучение антигипертензивных средств.....	269

Изучение гиполипидемических и противоатеросклеротических средств	280
Нормированные величины основных структурных элементов ЭКГ половозрелых крыс-самцов	290
Доклиническое изучение антианемических средств, антикоагулянтов и фибринолитиков	302
Экспериментальное (доклиническое) изучение фармакологических веществ, рекомендуемых в качестве нестероидных противовоспалительных средств	311
Поиск и экспериментальное изучение фармакологических веществ, которые предлагаются как ненаркотические анальгетики	327
Экспериментальное изучение новых противоязвенных препаратов	342
Экспериментальное изучение желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств	356
Экспериментальное (доклиническое) изучение фармакологических веществ, предлагаемых в качестве транквилизаторов и нейролептиков	374
Доклиническое изучение специфической активности противоопухолевых средств	384
Изучение антивирусного действия потенциальных лекарственных средств	394
Экспериментальное изучение новых гипогликемических средств	421
Доклиническое изучение тиреостатических и тиреоидстимулирующих средств	435
Скрининговые исследования веществ с предполагаемой андрогенной и антиандрогенной активностью	448
Экспериментальное (доклиническое) изучение лекарственных препаратов, воздействующих на мускулатуру матки	460
Доклиническое изучение гериатрических препаратов	471
Доклинические исследования стресспротективного действия фармакологических средств	485
Доклинические исследования специфической активности и безвредности минеральных вод	501
Экспериментальное изучение биостимуляторов из природного сырья	527
Моделирование эндотоксического и септического шока у грызунов	533
Раздел IV. Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственных средств	547
Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственных средств	548

Раздел III

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ И АНТИФИБРИЛЛЯТОРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Горчакова Н.А.,
Чекман И.С.,
Данильчук И.В.,
Данильчук В.В.,
Степанюк Г.И.,
Зупанец И.А.,
Соловьев А.И.,
Столярчук А.А.,
Мохорт Н.А.,
Французова С.Б.,
Ниженковская И.В.,
Серединская Н.Н.

Перечень сокращений

АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспаратаминотрансфераза
КФК – креатинфосфокиназа
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
МДГ – малатдегидрогеназа
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
СОД – супероксиддисмутаза
ЦНС – центральная нервная система

Введение

Для последних десятилетий характерно широкое внедрение в практику лечения аритмий немедикаментозных средств, в том числе различных типов имплантированных электростимулирующих устройств. Однако до настоящего времени фармакотерапия остается методом выбора при лечении большинства нарушений ритма сердца. Создано значительное количество новых лекарственных средств с антиаритмическим действием, но применение их в клинике возможно лишь после всесторонних исследований и получения максимально полной информации об эффективности и особенностях действия с целью разработки рекомендаций по применению в практике здравоохранения.

Данные методические рекомендации унифицируют методические подходы к экспериментальному (доклиническому) исследованию получения объективно сопоставимых результатов исследований, проводимых в разных научно-исследовательских центрах.

Настоящие методические рекомендации подготовлены с учетом требований GLP и других международных официальных положений; в том числе – «Экспериментальное и клиническое

изучение антиаритмических средств» (Киев, 1995), а также общая программа отбора («Pan-labs General Pharmacology Service Programm, General Screening Programm»).

1. Общие положения

К противоаритмическим средствам относятся вещества, способные предотвратить или купировать нарушения сердечного ритма. Экспериментальные (доклинические) исследования проводят с целью выявления их специфической активности, ее количественной оценки и безопасности использования по сравнению с препаратами аналогичного действия (хинидином, новокаиномидом, кордароном, лидокаином и др.).

Антиаритмические препараты, применяющиеся в медицине, различают по фармакологическим свойствам, механизмам воздействия на электрофизиологические процессы в мембране миокардиальных клеток, а также по эффективности при бради- и тахикардиях и фибрилляции.

Для лечения брадикардий применяют:

I. М-холиноблокаторы (атропина сульфат, капли Зеленина, иpratропия бромид, экстракт красавки сухой).

II. Адреномиметики (адреналина гидрохлорид, изадрин, орципреналина сульфат).

Для лечения тахикардий применяют:

1. Мембраностабилизаторы (блокаторы натриевых каналов):

а) хинидина сульфат, новокаиномид, дизопирамид – медленно уменьшают ток натрия и кальция во время деполяризации, калия – при реполяризации. Они занимают промежуточное место по скорости связывания с натриевыми каналами;

б) лидокаин, тримексин, дифенин, мексилетин, токсинид – слабо влияют на вход ионов натрия в клетки, повышают проницаемость мембран для калия, быстро связываются с каналами и быстро их высвобождают;

в) пропафенон, флекаинид, этазин (иногда относят к группе «А»), этмозин (иногда относят к группам «А» и «Б»), аймалин (гилуритмал), неогилуритмал (относят также к препаратам других групп, обладающих дополнительными свойствами). Все мембраностабилизаторы угнетают натриевый ток. Препараты медленно связываются с натриевыми каналами, медленно их высвобождают.

II. Бета-адреноблокаторы – анаприлин, талинолол, надолол, окспренолол, атенолол, метопролол и др.

III. Средства, замедляющие реполяризацию и удлиняющие потенциал действия – амиодарон, соталол, ибутилид, бретилий, азитилид, нибентан.

IV. Антагонисты кальция – верапамил, галопамил, дилтиазем, фендилин.

Антиаритмическое действие имеют также:

1. Сердечные гликозиды наперстянки – дигитоксин, дигоксин, целанид, лантозид.

2. Метаболитные препараты – аденозин, неон, рибоксин.

3. Препараты калия и магния – аспаркам (панангин), калипоз, калия хлорид, магния сульфат, магне В₆.

4. Препараты лекарственных растений – жидкий экстракт и настойка боярышника колючего и др.

Программа проведения поиска антиаритмических средств включает:

I этап. Определение антиаритмического действия исследуемых соединений.

II этап. Изучение характера и спектра действия отобранных соединений.

III этап. Изучение механизмов действия наиболее активных соединений, электрофизиологические исследования.

Поиск новых антиаритмических средств начинают с изучения химических соединений с приблизительным механизмом действия на определенных моделях, аналогичных клиническим ситуациям. Некоторые модели напоминают аритмии предсердия, желудочков или явля-

ются смешанными. Скрининг антиаритмических соединений можно провести на основании тестов, характеризующих главные свойства миокарда (изменение автоматизма, возбудимости, проводимости). Проведение опытов на нескольких моделях позволяет выбрать наиболее эффективное соединение.

2. Общие требования к противоаритмическим средствам

Новые вещества, предложенные как антиаритмики, должны превосходить известные современные противоаритмические препараты по активности или широте противоаритмического действия (противоаритмический индекс LD_{50}/ED_{50}) либо иметь другие преимущества перед ними – более выраженную безопасность (особенно при продолжительном использовании), отсутствие побочных эффектов и т.п.

3. Методы выявления противоаритмической активности

В соответствии с Panlabs General Pharmacology Service Program, General Screening Program антиаритмические препараты изучают по такой схеме. Интраперитонеально вводят изучаемое вещество (мг/кг) трем крысам, за 30 мин до этого наркотизированным хлороформом или другим препаратом. В течение 15 мин записывают ЭКГ. Препарат считается эффективным, если частота сердечных сокращений свыше 200 уд./мин наблюдается не более, чем у одного из трех животных.

Препараты для сравнения (мг/кг):

Дилтиазем	50
Лидокаин	10
Мексилетин	50
Пиндолол	50
Прокаинамид	20
Пропранолол	40
Верапамил	50
Флекаинид	10
Хинидин	100

3.1. Влияние исследуемых веществ на величину рефрактерного периода

Исследования проводят по методу Doves в модификации Alles и Ellis (1948) на изолированном ушке предсердий. Для этого ушко правого предсердия кролика или морской свинки закрепляют в специальной двухстенной ванночке (бане), в которую помещают определенное количество оксигенированного раствора Рингер-Локка при температуре 29–31°C (последняя поддерживается с помощью ультратермостата). С помощью записывающего устройства регистрируют сокращение ушка на ленте кимографа. Через 15–20 мин ушко раздражают током при помощи электростимулятора, повышая частоту к моменту, когда ушко прекращает усваивать соответствующий ритм. Эту частоту расценивают как максимальную величину, отвечающую рефрактерному периоду. После этого в ванночку добавляют исследуемое вещество и повторяют опыт. При наличии в препарате противоаритмического эффекта максимальная воспроизведенная ушком сердца частота сокращений уменьшится. Исследуют эффекты соединений в различных концентрациях. Каждую концентрацию исследуемого вещества подвергают испытанию на 4–5 препаратах ушка.

Величину изменения рефрактерного периода вычисляют в процентах, определяя эффективную концентрацию ЕС (в моль/л), которая способна уменьшить максимально выработанную частоту сокращений изолированного ушка на 15%. Активность сравнивают с действием стандартных препаратов.

3.2. Аконитиновая аритмия

Механизм влияния аконитина на миокард сложный и приводит к нарушению почти всех функций сердца. Его влияние обусловлено как непосредственным действием на миокард, так и опосредованным действием центральной нервной системы. Аконитин угнетает функцию синусового узла и повышает активность расположенных ниже водителей ритма миокарда, что приводит к появлению многочисленных пейсмекеров (эктопических очагов возбуждения). С помощью микроэлектродной техники установлен триггерный механизм развития аконитиновой аритмии на уровне мембранного потенциала 40–60 мВ. Под влиянием аконитина в волокнах Пуркинье на уровне мембранного потенциала – 50–60 мВ возникает внутренне направленный ток от активации быстрых натриевых каналов. Этот ток не возникает при действии аконитина и блокатора натриевых каналов тетрадолонина. В результате действия аконитина функционирование натриевых каналов нарушается, они оказываются постоянно активированными при нормальном потенциале покоя. Гипервозбудимость клеток и деполяризация связаны как со сдвигом процесса активизации натриевых каналов в сторону отрицательного потенциала, так и с угнетением процесса инактивации каналов. Аконитин также изменяет ионную селективность натриевых каналов: блокирует медленный кальциевый ток, не влияет на исходный калиевый ток, сокращает эффективный рефрактерный период, что ведет к усвоению более высоких частот возбуждения миокарда. Аконитин вызывает десинхронизацию процессов поляризации и деполяризации, активирует функцию натриевых каналов, препятствуя их инактивации вследствие местного действия, влияние на центральные механизмы регуляции работы сердца через блуждающий нерв и симпатические отделы. Для скрининга можно рекомендовать опыты на крысах, которые находятся в свободном поведении (без использования наркоза). Животным вводят в брюшную полость изучаемое средство в потенциально антиаритмической дозе. Через 0,5 ч внутривенно вводят аконитин в дозе 100 мкг/кг. Если препарат имеет противоаритмическое действие, гибель крыс уменьшается. В контрольных опытах (без введения антиаритмика) в течение 20 мин гибнет приблизительно 97,7% животных (B.Guttere et al., 1987). У наркотизированных белых крыс (этаминал-натрий в дозе 30 мг/кг в брюшную полость) аконитиновую аритмию моделируют путем его внутривенного введения в дозе 30–40 мкг/кг. Опыты проводят на группе из 7–10 животных обоих полов массой 120–200 г; контролем служит группа крыс, которым вводят физиологический раствор. Нарушения сердечного ритма под действием аконитина развиваются обычно через 1,5–3 мин и имеют разнообразный характер – одиночные и групповые экстрасистолы, желудочковый ритм и др. Аритмия длится свыше 30–90 мин и заканчивается возобновлением ритма у незначительной части животных. Большая часть животных при этом гибнет. С целью исследования способности предупреждать аритмию исследуемое вещество вводят внутривенно за 5–10 мин до введения аконитина (профилактическое действие) или на фоне развитой аритмии (лечебное действие). Учитывается количество животных, у которых аритмия не возникла, либо была купирована, а также количество погибших крыс в каждой серии. А также принимают во внимание частоту восстановления нормального синусового ритма (в %), продолжительность периода нормального синусового ритма, количество (%) выживших животных. Полученные результаты сравнивают с контрольными исследованиями, когда вводят один аконитин, а также с действием известных противоаритмических препаратов – новокаинамида (20 мг/кг), лидокаина (10 мг/кг), амиодорона (10 мг/кг), мексилетина и пропранолола (50 мг/кг). Исследование в каждой серии проводят не меньше, чем на 10 животных. Критерием активности выступает ED_{50} (по методу Литчфилда и Уилкоксона), о широте терапевтического действия свидетельствует соотношение LD_{50}/ED_{50} (антиаритмический индекс).

В соответствии с General Screening Program изучение антиаритмических соединений на модели аконитиновой аритмии и желудочковой тахикардии происходит таким образом. Исследуемую субстанцию вводят 3 мышам за 15 мин до введения аконитина (1,25 мкг/мл/мин).

Оценка специфической фармакологической активности лекарственных средств

Определяют время (в с) начала развития аритмии. За нарушение ритма принимают любое отклонение от нормального синусового ритма, которое продолжается в течение 5 с и больше. Увеличение времени с момента введения аконитина до начала развития аритмии более чем на 50%, свидетельствует об эффективности препарата. Предлагается сравнивать эффекты исследуемых веществ с такими препаратами (концентрации в мг/кг):

Название	Аритмия	Тахикардия
Верапамил	10	10
Дизопирамид	>100	>100
Дилтиазем	10	10
Лидокаин	100	100
Мексилетин	50	50
Нифедипин	>100	>100
Пропранолол	50	50
Хинидин	50	50
Флекаинид	10	10
Тимолол	100	100

3.3. Хлоридкальциевая аритмия

Токсические дозы кальция хлорида оказывают содействие высвобождению большего количества катехоламинов из нервных окончаний, увеличивают чувствительность к ним адренорецепторов миокарда. Под влиянием кальция хлорида повышается проводимость натрия плазматической мембраной, поднимается ионный гомеостаз, работа натриевых и кальциевых каналов, развивается быстротечная аритмия по триггерному механизму, во главе угла которого лежит ранняя постдеполяризация. Характер аритмии зависит от скорости введения кальция хлорида. Медленное введение может вызвать лишь временную брадикардию. При быстром введении кальция хлорида уже на первой минуте на фоне брадикардии возникают вспышки пароксизмальной желудочковой тахикардии, эпизоды фибрилляции желудочков. Аритмия достаточно быстро заканчивается асистолией и гибелью большинства животных. Этот вид аритмии недостаточно изучен, трудно протекает и трудно поддается действию противоаритмичных веществ. Хлорид кальция в виде 10% ампульного раствора в дозе 220–250 мг/кг вводят внутривенно наркотизированным крысам. В зависимости от скорости введения получают разный эффект: при быстром введении кальция хлорида в первую минуту на фоне брадикардии появляются экстрасистолы, которые заканчиваются фибрилляцией желудочка; медленное введение может вызвать лишь краткосрочную брадикардию без любых других нарушений ритма. При использовании хлоридкальциевой аритмии необходимо подобрать аритмогенную дозу хлорида кальция и вводить ее всегда с постоянной скоростью. Исследуемые соединения вводят внутривенно за 2–5 мин до введения аритмогена. Результаты надо сравнивать с эффектом новокаинамида (20 мг/кг), который при этой аритмии является достаточно эффективным (M.R.Malinov et al., 1953). Эталонным средством может быть антагонист кальция, верапамил (10 мг/кг), дилтиазем (10 мг/кг) или амиодарон (10 мг/кг), иногда используют новокаинамид (20 мг/кг). Модель применяют для поиска антиаритмиков I и IV классов (см. разд. 1).

3.4. Хлоридбариевая аритмия

Хлорид бария в диастолической фазе сердечного ритма снижает проницаемость клеточных мембран для калия и повышает ее для натрия. Этим объясняют его аритмогенное действие, изменение нормальных процессов поляризации, деполяризации, развитие аномального авто-

матизма, возникновение экстрасистолии, парасистолии и других нарушений. Опыты проводят на кроликах массой 2,5–3,5 кг без использования наркоза. Животным внутривенно вводят хлорид бария в дозе 4 мг/кг в виде 1% раствора. Аритмия продолжается от 15 до 20 мин. С помощью электрокардиографа регистрируют во II стандартном отведении время возникновения и продолжительность аритмии у каждого животного. Животных используют через каждые 3–4 дня еще 3–4 раза. В следующих опытах изучают как предупреждающее, так и купирующее действие исследуемых соединений: профилактически при внутривенном или внутрибрюшинном введении за 5–10 мин до введения бария хлорида либо с лечебной целью внутривенно сразу же после возникновения аритмии. Сравнивать эффекты исследуемых веществ рекомендуется с амиодароном в дозе 5 мг/кг (М.В. Львов, 1973). Модель применяют для поиска антиаритмиков III класса.

3.5. Строфантиновая аритмия

Эта модель нарушения ритма сердца начинается с брадикардии, на фоне которой возникают экстрасистолы и которая может заканчиваться фибрилляцией желудочков. В ее основе лежит угнетение натрий-калиевой АТФазы, содействующее повышению внутриклеточной концентрации кальция, нарушению электролитного баланса, появлению спонтанных следовых потенциалов, поздних осцилляторных потенциалов в волокнах Пуркинье. Аритмогенное действие строфантина реализуется также через серотонин- и гистаминэргические структуры мозга. Строфантиную модель аритмии вызывают у морских свинок или кошек, наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг, внутрибрюшинно). Ампульный строфантин-К вводят внутривенно в дозах 0,25 мг/кг чаще или 0,09–0,12 мг/кг соответственно в 0,01% концентрации. Кошкам предварительно вводят 0,07 мг/кг строфантина, затем через каждые 10 мин вводят еще по 0,01 мг/кг до появления аритмии. Исследуемые вещества вводят внутривенно сразу же после возникновения аритмии. Сравнивать рекомендуют с амиодароном в дозе 5 мг/кг (Э.И. Аммар, А.Н. Кудрин, 1969). Аритмию можно вызвать у морских свинок, наркотизированных эфиром, внутривенным введением строфантина-Г в дозе 250 мкг/кг, что адекватно строфантину-К в дозе 500 мкг/кг. Исследуемое соединение вводят за 2–3 мин до строфантина.

3.6. Адреналиновая аритмия

Аритмогенный эффект адреналина обусловлен повышением проводимости плазматической мембраны для ионов кальция, который приводит к возникновению эктопической пейсмекерной активности как в предсердиях, так и в желудочках. Адреналина гидрохлорид вводят внутривенно и быстро кроликам в дозе 120–150 мкг/кг в виде 0,1% раствора. На первых минутах возникает брадикардия с политопной экстрасистолией, которая уступает место желудочковой тахикардии. Аритмия продолжается 5–7 мин, через 30 мин кроликам вводят (внутримышечно, внутрибрюшинно либо внутривенно) исследуемое вещество и снова внутривенно вводят такую же аритмогенную дозу адреналина. Противоаритмическую активность исследуемого соединения оценивают по предупреждению как возникновения аритмии, так и гибели животных, если введение адреналина приводит к летальности. Адреналиновую модель аритмии можно воссоздать в опытах на кошках и собаках при быстром введении в вену адреналина в дозе 100 мкг/кг, а также на крысах. Чтобы осуществить более стойкий и продолжительный эффект, адреналин можно ввести вместе с ингаляционными средствами (эфир, фторотан, изофлуран). Эфирно-адреналиновую модель воссоздают на кошках массой до 3 кг. Животных наркотизируют внутривенным введением 30 мг/кг этаминала натрия. Катетеризируют яремную вену для введения исследуемого соединения и сонную артерию для регистрации артериального давления. ЭКГ регистрируют во II стандартном отведении. Исследуемое соединение вводят в 3 мл дистиллированной воды. После повторной записи ЭКГ адреналин вводят

внутривенно в дозе 20 мкг/кг одновременно с эфиром, который инстиллируют в трахею из расчета 0,1 мл/кг через катетер, введенный с помощью ларингоскопа. Записи ЭКГ воссоздают через 1, 3, 5, 10, 15, 30 и 50 мин. Адреналиновую модель применяют для поиска антиаритмиков II и IV классов.

3.7. Постинфарктная аритмия

Постинфарктная аритмия по своему генезу и проявлениям подобна аритмиям, которые возникают у людей при ишемической болезни сердца. Зачастую она проявляется пароксизмальной желудочковой тахикардией, экстрасистолью, фибрилляцией желудочков. Постинфарктную аритмию моделируют на кошках, наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг внутривенно), или собаках, наркотизированных гексеналом (40 мг/кг внутривенно) и дроперидолом (0,3 мг/кг внутримышечно), в условиях искусственного аппаратного дыхания.

У кошек перевязывают нисходящую ветвь левой коронарной артерии на границе верхней и средней трети. В большинстве случаев аритмия в виде пароксизмальной тахикардии и желудочковых экстрасистол возникает через 30 мин после окклюзии и длится больше двух часов. Как правило она заканчивается фибрилляцией желудочков или асистолией и гибелью животных. Исследуемые соединения вводят внутривенно сразу же после возникновения аритмии. Противоаритмический эффект оценивают по частоте восстановления синусного ритма и его продолжительности в сравнении с контролем и действием известных противоаритмических средств.

У собак проводят высокую перевязку нисходящей ветви левой коронарной артерии (возле ее устья). Фибрилляция желудочков сердца возникает в большинстве случаев через 5–20 мин после окклюзии и заканчивается гибелью животных. Исследуемое соединение вводят внутривенно перед перевязкой или сразу же после нее. Наличие противофибрилляторного эффекта определяют отсутствием фибрилляции на ЭКГ, ее отсрочкой, предупреждением гибели животных. Отмечают также выраженность признаков ишемии на ЭКГ.

По другой методике у собаки перевязывают нисходящую ветвь левой коронарной артерии на границе средней и нижней трети. Зашивают перикард, а потом послойно и грудную клетку, создают в грудной полости отрицательное давление путем откачивания из нее воздуха с помощью отсасывателя. Аритмия возникает на следующий день. Исследуемые соединения можно вводить различными путями после возникновения аритмии на протяжении нескольких дней. Регистрируют частоту, скорость и продолжительность восстановления синусного ритма. Результаты сравнивают с контролем и действием известных противоаритмических средств.

Постинфарктную аритмию можно также воссоздать на наркотизированных белых крысах в условиях искусственного дыхания путем высокой перевязки левой коронарной артерии.

3.8. Исследование влияния соединений на порог фибрилляции желудочков на фоне изадринового поражения миокарда

При изадриновом поражении миокарда, как и при инфаркте миокарда, повышается возможность развития фатальных аритмий, в том числе и фибрилляции желудочков. При этом может изменяться реакция миокарда на действие лекарственных средств. Введение животным больших доз изадрина вызывает значительные нарушения функций миокарда, сопровождающиеся увеличением поглощения кислорода, уменьшением запасов АТФ и креатинфосфата, возникновением очагов некроза в результате острой коронарной недостаточности. Предварительное введение животным изадрина позволяет обнаружить влияние соединения на электрическую стабильность пораженного миокарда, то есть в условиях патологии.

Исследования проводят на наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг) белых крысах в условиях искусственного дыхания при вскрытой грудной клетке и свободном доступе к сердцу. Сначала определяют порог фибрилляции, потом внутримышечно вводят изадрин (60 мг/кг). Через 15 мин снова определяют порог фибрилляции (который под влиянием изадрина уменьшается), вводят внутривенно исследуемое соединение и в третий раз измеряют порог фибрилляции. При его увеличении измерения проводят каждые 10–15 мин к моменту возвращения порога к начальному уровню (до введения исследуемого соединения). Полученные результаты сравнивают с начальным уровнем порога, а также с действием известных препаратов, например, лидокаина, кордарона.

3.9. Центрогенные нарушения сердечного ритма

Нарушения реализуются через симпатическую систему действием на альфа- и бета-адренорецепторы миокарда. Для моделирования аритмии чаще всего как аритмогенный агент используют аконитин, который в дозе 2 мкг/кг в 0,01% растворе вводят наркотизированным кошкам в мозгово-мозжечковую цистерну (полость 4-го желудочка), затем через каждые 5–7 мин повторно вводят такую же дозу аконитина до появления аритмии. Исследуемые вещества вводят внутривенно сразу после развития аритмии. Центральные нарушения сердечного ритма вызывают с помощью введения в полость 4-го желудочка головного мозга строфантина в дозе 0,01–0,04 мг/кг в 0,02% растворе бария хлорида или 1% раствора бария хлорида в дозе 1–2 мг/кг (В.Н.Павлов, 1976).

3.10. Влияние исследуемых веществ на предсердные нарушения ритма

Исследуемые вещества при этой патологии подвергают испытанию по методу A.Rosenblueth, G.Ramos (1949). У наркотизированных (гексенал 40 мг/кг внутривенно + дроперидол 0,3 мг/кг внутримышечно) собак при искусственной вентиляции легких обнажают сердце и с помощью зажима разрушают синусовый узел, размещенный на участке между устьями v.v.cava sup. et inf. После этого предсердия раздражают при помощи электростимулятора прямоугольными импульсами постоянного тока продолжительностью 1 мс, амплитудой 10–20 В и частотой 1,5–2,0 Гц. Изменения электрической активности предсердий регистрируют на электрограмме правого предсердия, желудочков – записью ЭКГ во втором стандартном отведении. Исследуемые вещества вводят в вену на фоне аритмии и оценивают их действие.

3.11. Модель желудочковых аритмий, вызванных двухсторонним перевязыванием коронарной артерии

Желудочковые нарушения ритма вызывают окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии у собак по методу Haggis, при этом характер нарушений ритма напоминает пароксизмальную тахикардию и желудочковую экстрасистолию. Перевязывание осуществляют в 2 этапа. Двойную лигатуру подводят под артерию у верхушки левого ушка. Интервал между частичной и полной окклюзией составляет 24 ч. Нарушения ритма выражаются в желудочковой тахикардии и экстрасистолии. Аритмия длится 2–3 суток; исследования действия соединений проводят через 24 ч после полной окклюзии коронарной артерии. ЭКГ регистрируют во II стандартном отведении. Эффективность соединений определяют на основании способности возобновлять синусовый ритм. Рассчитывают процент эктопических и нормальных сокращений.

3.12. Желудочковые аритмии, вызванные острой окклюзией коронарной артерии и их реперфузией

Антифибрилляторную активность соединений можно изучать на этой модели. Острая окклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии у наркотизированных этаминалом натрия (35 мг/кг) кошек или кроликов ведет к развитию разных нарушений ритма желудочков, которые во время реперфузии становятся более выраженными характер вплоть до фибрилляций желудочков.

3.13. Модель острой окклюзии коронарной артерии в хроническом эксперименте

Исследования проводят в 2 этапа на белых крысах-самцах массой 180–200 г. На первом этапе, после торакотомии в верхней трети левой нисходящей коронарной артерии вживляют окклюдер. Нить окклюдера проводят под артерией атравматической иглой, концы нити выводят на грудине в участке четвертого межреберья. Потом грудную клетку зашивают, концы нити выводят под кожу. Через 4–5 дней концы лигатуры высвобождают, стягивают над артерией, через 1–1,5 часа записывают ЭКГ, исследуемые вещества вводят внутривенно за 3–5 мин или внутрь за 30 мин до окклюзии.

3.14. Модель для изучения влияния веществ на нарушение ритма предсердий

Нарушение ритма предсердий у собак вызывают под морфино-уретановым наркозом при искусственном дыхании. Сердце открывают и разрушают синусовый узел на участке между устьями верхней и нижней полых вен. Потом предсердия раздражают прямоугольными стимулами продолжительностью 1 мс, напряжением, вдвое превышающим пороговое, при частоте импульсов 15–20 Гц. Регистрируют электрическую активность предсердий. Исследуемые соединения вводят через 30 мин после возникновения нарушения ритма. Нарушения ритма после механического разрушения синусового узла и раздражения электрическим током характеризуются миганием предсердий, при этом частота сокращений предсердий увеличивается в 2–7 раз сравнительно с исходной. Антиаритмическая активность соединений оценивается по методу биологического титрования при внутривенном введении (1 мг/кг в 1 мл в 1 мин) к полной нормализации синусового ритма. Возникновения эктопической пейсмекерной активности в предсердиях можно осуществить местной аппликацией аконитина, вератрина, бария хлорида, изменяющих проводимость ионных каналов мембран кардиомиоцитов.

3.15. Исследование влияния веществ на порог фибрилляции предсердий в опытах на наркотизированных кошках

Опыты проводят на кошках, анестезированных уретаном и хлоралозой в дозах 75 и 15 мг/кг соответственно (внутрибрюшинно). Проводят искусственную вентиляцию легких. Через яремную или бедренную вены вводят в правое предсердие биполярные электроды для регистрации предсердной электрокардиограммы и стимуляции предсердий. В шейном отделе парируют и выделяют блуждающий нерв, который перерезают на его периферическом конце. Накладывают платиновые электроды с расстоянием между ними 2 мм. Регистрируют ЭКГ и электрограмму. С помощью электростимулятора находят порог возбуждения блуждающего нерва (2 мс, 30 имп./мин), иногда частоту изменяют. После начала стимуляции нерва на фоне уменьшения частоты сокращений в два и больше раз проводят парную стимуляцию предсердия (5 мс), которое ведет к фибрилляции. Изучаемое вещество вводят внутривенно.

3.16. Модель аритмии и фибрилляции желудочков – воспроизведение при помощи биполярных электродов

Опыты проводят на наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг) кошках массой 2–4 кг при искусственном дыхании. Температуру тела поддерживают на уровне 37°C с помощью внешнего подогрева. Артериальное давление регистрируют в бедренной артерии электроманометром. Нарушения сердечного ритма, регистрируемые с помощью ЭКГ в II отведении, вызывают с помощью подшитых к миокарду правого желудочка биполярных электродов. Электрическим раздражением создают искусственный «эктопический очаг» для получения отдельных или групповых экстрасистол. Для создания фибрилляции применяют разные параметры раздражающих стимулов. Пока ритм не усваивается, сердце не реагирует на импульсы из «эктопического очага». Чем меньше частота навязанных из «эктопического очага» стимулов раздражения усваивается сердцем, тем большее антиаритмическое действие имеет исследуемое соединение. Порог фибрилляции определяют повторным сканированием сверхчувствительного периода (восходящая часть зубца Т) серией прямоугольных импульсов продолжительностью 1–4 мс (применяют 20–90 импульсов). За единицу значения порога принимают минимальную интенсивность тока в милливольтках, вызывающую фибрилляцию желудочков. Дефибрилляцию можно вызвать дефибриллирующим разрядом определенной интенсивности, который подается от аппарата ИД-03. Исследуемые соединения вводят внутривенно, определяя минимальную частоту сокращений, когда сердце перестает усваивать навязанный ритм. Эта частота отображает изменения реактивности рефрактерного периода под влиянием веществ, а также минимальную силу тока, необходимую, чтобы вызвать фибрилляцию желудочков.

3.17. Реперфузионные аритмии и фибрилляции сердца

Данные нарушения сердечного ритма обусловлены многими факторами, что подтверждается их предупреждением (правда, не во всех случаях) противоаритмическими препаратами с разнообразным механизмом действия: антиоксидантами, антитромбоксантами и др. В результате окклюзии коронарной артерии образуются свободные кислородные радикалы, которые приводят к росту кальциевой проницаемости сарколемы и перегрузке миокарда кальцием (кальциевый парадокс), тромбоксаном-2 и др., нарушается электролитный баланс. Через несколько секунд уменьшается количество макроэргических фосфатов – аденозинтрифосфата, креатинфосфата. Через 15 мин исчезает 60% общего количества аденозинтрифосфата и 55% всех адениннуклеотидов, через 40 мин ишемии запасы макроэргических фосфатов почти полностью исчерпываются, в результате выхода во внеклеточное пространство уменьшение запасов адениловых нуклеотидов происходит без чрезмерной активации кальцийзависимых АТФаз. Наблюдается разрежение тканей в результате активации фосфолипаз и протеаз, вследствие внутриклеточных напряжений, обусловленных развитием контрактур миофибрилл. Вымывание этих и других продуктов из очага ишемии во время реперфузии вызывает тяжелые нарушения ритма (В.Г.Сторожук, 1985).

Опыты на крысах

Высокое перевязывание у наркотизированных крыс левой коронарной артерии приводит к тахикардии, которая заканчивается аритмией и фибрилляцией. Исследуемые соединения вводят до перевязывания или после него внутривенно с целью предупреждения или купирования аритмии.

Опыты на кошках

У наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг) животных открывают грудную клетку и при искусственном дыхании оголяют сердце. Нисходящую ветвь левой коронарной артерии

лигируют в верхней ее трети. Через 25–30 мин лигатуру быстро распускают. Фибрилляция возникает в 80% случаев. Испытываемые соединения вводят за 10–20 мин до реперфузии внутривенно.

Опыты на собаках

Фибрилляция желудочков сердца у наркотизированных (гексенал 40 мг/кг внутривенно + дроперидол 0,3 мг/кг внутримышечно) собак моделируется путем высокого перевязывания межжелудочковой ветви левой коронарной артерии. До и после лигирования коронарного сосуда снимается эпикардальная электрограмма с помощью электрокардиографа с однополюсным серебряным электродом. Фибрилляция желудочков сердца возникает в 100% случаев через 5–20 мин после коронароокклюзии. Определение протифибрилляторного эффекта осуществляется по отсутствию развития фибрилляции желудочков сердца, ее запаздыванием и предупреждением гибели экспериментальных животных. Также определяют влияние исследуемых веществ на выраженность ишемии миокарда, что выполняется на эпикардальной электрограмме.

3.18. Влияние на порог фибрилляции желудочков

Фибрилляцию желудочков вызывают путем нанесения прямоугольного электрического импульса на миокард в чувствительный период электрической активности сердца (восходящая часть зубца Т на ЭКГ) с помощью электростимулятора. Определяют минимальную силу тока (в мА), которая вызывает фибрилляцию. Платиновые электроды вводят: один в верхушку сердца, второй – подкожно в участке нижней части туловища животного. После определения порога фибрилляции вводят исследуемые соединения и снова определяют порог фибрилляции через разные промежутки времени до тех пор, пока он не восстановится до начального уровня (В.Н.Титов, В.М.Шаргородский, 1977). Опыты проводят на наркотизированных кошках и крысах. У последних возникшая фибрилляция проходит самостоятельно в течение первой минуты. У кошек фибрилляцию надо снять дефибриллятором ИД-66 при напряжении от 2,5 до 3,5 кВ. У наркотизированных этаминалом натрия (40 мг/кг) кошек при искусственном дыхании раскрывают грудную клетку, оголяют сердце и накладывают лигатуру на нисходящую ветвь левой коронарной артерии в ее верхней трети. Через 25 мин лигатуру распускают. В 80% случаев на первых минутах после роспуска лигатуры развивается фибрилляция желудочков, которая приводит к гибели животных. Исследуемое соединение вводят внутривенно за 5–20 мин до реперфузии. О наличии аритмии при воспроизведении и о характере действия исследуемых веществ во всех исследованиях судят по показателям ЭКГ, которые снимаются во II стандартном отведении. Записывают ЭКГ до перевязывания артерии, после перевязывания, после снятия лигатуры через каждые 5–10 мин до появления аритмии или гибели животных. Учитывают время возникновения аритмий и количество животных, у которых она была предупреждена. Результаты сравнивают с контролем и активностью известных противоаритмических препаратов – амиодарона (5–10 мг/кг), лидокаина (10 мг/кг). Они предупреждают развитие фибрилляции в 40–50% случаев. Конечным этапом изучения противоаритмической активности исследуемых соединений выступают опыты на аконитиновой, послеинфарктной и реперфузионной аритмиях не менее чем на двух видах животных.

3.19. Электрофизиологические исследования

Известно, что большей части антиаритмичных препаратов присуща способность к местной анестезии, обусловленной блокированием под их влиянием натриевых каналов плазматической мембраны. Этот механизм действия является основным для употребляемых чаще всего антиаритмических средств-мембранодепрессантов: хинидина, новокаинамида и др. Блокада

натриевых каналов оказывает содействие повышению рефрактерности и угнетению аномальной пейсмекерной активности в миокарде. При оценке эффективности потенциального антиаритмического соединения изучается его влияние на входной натриевый ток. С этой целью чаще всего используют метод регистрации ионных токов в изолированных кардиомиоцитах (метод patch-clamp) или в полосках миокарда (сахарный мостик) при условиях фиксации мембранного потенциала. В качестве исследуемого параметра чаще всего используют амплитуду входного натриевого тока или скорость возрастания $dP/dt_{\max}$ или $V_{\max}$ потенциала действия, которая является отображением величины входного натриевого тока, определяющей формирование фазы быстрого возрастания (фаза 0) нормального потенциала действия в клетках предсердия, предсердно-желудочкового пучка волокон Пуркинье и миокарда желудочков. Для успешного использования $V_{\max}$ в качестве критерия натриевой проводимости необходимо выполнять ряд условий: а) ионный ток вдоль волокон должен равняться 0; б) мембранный потенциал, при котором достигается $V_{\max}$, должен иметь постоянную величину, не зависящую от внешних влияний; в) интервал между стимулом и моментом достижения $V_{\max}$ должен быть постоянным; г) вклад других токов, кроме натриевого, в момент достижения $\max$ должен быть очень небольшим. В настоящее время используют прямое измерение натриевого тока в изолированных кардиомиоцитах методом patch-clamp, который позволяет регистрировать интегральный ток от целой клетки, регистрировать токи одиночных каналов, изучать действие препаратов при их влиянии на внешнюю и внутреннюю стороны плазматической мембраны, исследовать электрофизиологические характеристики клеток небольших размеров (приблизительно 10 мкм). Регистрация тока выполняется от электрически изолированного фрагмента плазматической мембраны с помощью плотно прижатой к поверхности клетки стеклянной пипетки; общее оснащение, необходимое для исследований методом patch-clamp:

1) инвертированный микроскоп; 2) петч-усилитель – ЕРС-5, ЕРС-7, РОК-3 и др; 3) приспособление для введения веществ с ванночкой; 4) микроманипулятор; 5) приспособление для вытягивания и оплавления микропипеток; 6) стимулятор; 7) осциллограф; 8) магнитограф; 9) ЭВМ. Реакция ответа кардиомиоцитов на антагонисты кальция также зависит от величины мембранного потенциала, а методы регистрации кальциевого тока лишь незначительно отличаются от упомянутых выше. Некоторые блокаторы кальциевых каналов также имеют антиаритмическое действие. Но они в отдельных случаях весьма сильно тормозят электрическую активность миокарда.

Изучают влияние соединений на потенциал покоя, потенциал действия в миокардиальных клетках разных отделов сердца, максимальную скорость деполяризации ($V_{\max}$), пороговый и максимальный диастолический потенциалы, продолжительность потенциала действия на разных уровнях реполяризации, эффективный, относительный и функциональный рефрактерный периоды. Прямое измерение ионных токов кардиомиоцитов позволяет определить, на какие входные (быстрый натриевый или медленный кальциевый) или исходные (калиевые) токи (потоки) действует исследуемое соединение. Кроме того, важно знать не только, на какой ток действует соединение, но и на какое место в канале, в каком состоянии находится канал (открытом, закрытом, активированном, инактивированном).

Наиболее доступными являются исследования на кошках.

Влияние исследуемых соединений на электрофизиологические показатели работы сердца изучают в опытах на наркотизированных этаминалом натрия (40 мкг/кг) кошках в условиях искусственного аппаратного дыхания с раскрытой грудной клеткой и оголенным сердцем. После такой подготовки у животных записывают начальную электрокардиограмму во втором стандартном отведении, а тогда на фоне ее записи проводят электрическую стимуляцию сердца. Для этого с помощью электростимулятора через электрод, зафиксированный в правом ушке, на сердце подается прямоугольный электрический импульс продолжительностью 2 мс и напряжением в 1,5 раза больше от того, которое вызывает внеочередное сокращение пред-

сердий. В дальнейшем по этой ЭКГ определяют частоту сокращения сердца, продолжительность интервалов P, PQ, QRS, продолжительность электрической систолы (интервал QT). Во время электрической стимуляции определяют:

1. Время восстановления функции синусного узла по интервалу от последнего зубца P, вызванного электростимулом, к первому зубцу P синусного происхождения после прекращения электростимуляции.

2. Антеградную проводимость через атриовентрикулярный узел, что характеризуется с помощью точки Венкебаха. Для ее определения регистрируют ту частоту стимуляции предсердий, которая вызывает стойкую атриовентрикулярную блокаду второй степени с периодикой Самойлова-Венкебаха.

3. Ретроградное проведение импульсов через атриовентрикулярный узел. Для его определения электрическую стимуляцию сердца проводят с помощью второго электрода, зафиксированного на верхушке сердца. ЭКГ при этом записывают с электрода, зафиксированного в правом ушке. В этом случае регистрируют частоту стимуляции, вызывающую стойкую вентрикуло-атриальную блокаду второй степени с периодикой Самойлова-Венкебаха. Для записи ЭКГ лучше использовать двух- или трехканальный электрокардиограф.

Определение всех перечисленных показателей повторяют сразу после внутривенного введения исследуемого соединения, а тогда повторно через каждые 10–15 мин к моменту их возвращения к начальному уровню. По разности с исходными данными определяют степень и продолжительность изменения каждого показателя под влиянием соединения. Полученные результаты сравнивают с действием известных препаратов.

3.20. Влияние на трансмембранные потенциалы (покоя, действия) и сократимость кардиомиоцитов с применением стандартной микроэлектродной техники

Для отведения потенциалов применяют микроэлектроды с диаметром кончика 0,5 мкм и сопротивлением 30–40 МОм. Объектами опытов служат полоски миокарда желудочков (5x10 мм) лягушки *Rana temporaria*, которые помещают в камеру и перфузируют при 20°C с раствором Рингера (следующего состава, ммоль/л: NaCl 110, KCl 2,5, CaCl₂ 1,8, NaHCO₃ 2,4, pH 7,3).

Можно проводить исследование на папиллярной мышце морской свинки. Папиллярную мышцу помещают в проточную камеру, где проводят перфузию с постоянной скоростью (18 мл/мин) раствором Кребса-Хенселяйта (такого состава, ммоль/л NaCl 113,8, CaCl₂ 3,2, KH₂PO₄ 1,2, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, глюкоза – 10,0), поддерживают уровень кислорода 95%, CO₂ 5%, pH 7,4, 35°C). В папиллярной мышце укрепляют биполярный электрод (Ag/AgCl), с помощью которого наносят стимулы пороговой интенсивности (мВ), разной частоты (1 и 3 Гц). Трансмембранные потенциалы регистрируют с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных KCl (3 ммоль/л) с сопротивлением 10–25 МОм. После усиления потенциалы подаются на осциллоскоп и регистрируются в реальном времени после аналого-цифрового преобразования. Измеряют такие параметры: RP – потенциал покоя (мВ), OV – овершут (мВ), V_{max} – максимальная скорость прироста потенциала действия, CT – время проведения, APD₉₀ – продолжительность потенциала действия при 90% реполяризации (мс). Эффективный рефрактерный период (ERP) измеряют с применением дополнительного стимула, который равняется двойному пороговому, относительный рефрактерный период (RRP) определяют как наименьшее различие между продолжительностью ответов в фазе конечной реполяризации. Подобные исследования проводят на полосках миокарда лягушки.

Для изучения электрофизиологического влияния в опытах на собаках животных наркотируют, интубируют, переводят на искусственное дыхание, фиксируют на операционном столе на правой стороне. В асептических условиях вскрывают грудную клетку в четвертом межреберье с левой стороны. Надрезают перикард, выделяют нисходящую ветвь левой коронар-

ной артерии, расположенной ниже края ушка левого предсердия. Параллельно артерии накладывают инъекционную иглу № 20. Первую лигатуру завязывают на игле, что создает препятствие циркуляции крови в нижнем участке миокарда. Через 30 мин завязывают вторую лигатуру. В яремную вену вводят полиэтиленовый катетер, концы которого выводят на шею собаки и фиксируют. Выживших животных берут в эксперимент. На 2–4-е сутки на животных проводят электрофизиологические опыты. После этаминалнатриевой анестезии животных интубируют, проводят искусственную вентиляцию легких. По операционному шву снова вскрывают грудную клетку, осуществляют доступ к поврежденному миокарду. Через бедренную артерию вводят зонд-электрод, который устанавливают в устье аорты и с его помощью регистрируют биполярную электрограмму пучка Гиса. Второй биполярный электрод в виде зажима закрепляют на ушке левого предсердия. С его помощью регистрируют электрограмму и проводят электростимуляцию левого предсердия. Третий биполярный электрод с расстоянием между электродами 5 мм погружают в толщу миокарда левого желудочка на участке нормального (неинфарцованного) миокарда в зоне, близкой к ушку предсердия. С помощью этого электрода регистрируют электрограмму левого желудочка, проводят его электростимуляцию. За электрической активностью сердца наблюдают с помощью монитора компьютера, заносят в память внешнюю электрограмму в отведениях I, II, III и электрограммы сердца. Внешняя электрограмма воссоздается при фильтрации сигнала 0–250 Гц, электрограмма пучка Гиса – 60–400 Гц, миокардиальная электрограмма – 100–400 Гц. Продолжительность прямоугольных импульсов – 2 мс. При этом можно проводить:

1. Частую стимуляцию предсердий прерывистыми импульсами между сериями из 20 импульсов.
2. Стимуляцию предсердий одиночными преждевременными импульсами на фоне базисного ритма.
3. Стимуляцию желудочков одиночными преждевременными импульсами на фоне базисного ритма.
4. Стимуляцию желудочков парными преждевременными импульсами на фоне базисного ритма.
5. Возможны другие методы стимуляции желудочков.

На электрокардиограмме определяют интервалы PP, PQ, QT, комплекс QRS, интервал PA (время от зубца Р к первой быстрой высокоамплитудной осцилляции предсердий), интервал АН (время от начала быстрой высокоамплитудной осцилляции предсердий до осцилляции пучка Гиса), интервал HV (время от начала осцилляции пучка Гиса до начала возбуждения желудочков), минимальную продолжительность цикла стимуляции предсердий (CL 1:1), время восстановления функции синусового узла (SNRT). Во время стимуляции предсердий и желудочков определяют эффективный рефрактерный период предсердий (FRPA), функциональный рефрактерный период предсердий (FRPA), общий рефрактерный период предсердий (TRPA), относительный рефрактерный период предсердий (RRPA), эффективный рефрактерный период АВ узла (ER-PAVN), функциональный рефрактерный период АВ узла (FRPAVN), общий рефрактерный период системы Гиса-Пуркинье, эффективный рефрактерный период желудочков (ERP), функциональный рефрактерный период желудочков (FRPN). При электростимуляции желудочков определяют виды спонтанной эктопической активности: повторный ответ желудочков (RR), нестойкую желудочковую тахикардию (VTNS), стойкую желудочковую тахикардию (VTS), фибрилляцию желудочков (VFb). Во время развития фибрилляции желудочков или стойкой желудочковой тахикардии, которая не купируется электростимуляцией желудочков, и ведет к стойким гемодинамическим последствиям, проводят электроимпульсную терапию (DS shock). При этом энергию импульса подбирают с 1,0 RW, чтобы определить порог дефибрилляции. Если это происходит до введения препарата, то после восстановления нормального ритма ожидают не менее 20 мин, кон-

тролируют значение ERPV. После контрольного опыта вводят препарат. На протяжении 60 мин через каждые 5 мин измеряют интервалы ЭКГ и электрограммы пучка Гиса. При введении соединения в двух дозах вторую вводят не менее чем через час после первой.

3.21. Другие методы исследования антиаритмической активности

С целью прогнозирования антиаритмической активности проводят также биохимические и физико-химические исследования противоаритмических средств. Общепринятыми методами устанавливают способность противоаритмических средств предупреждать снижение содержания компонентов аденилатной системы, креатинфосфатной системы, аденилатного заряда, угнетения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, уровня никотинамидных коферментов, повышение показателей перекисного окисления липидов (малонового диальдегида, оснований Шиффа, диеновых конъюгатов и др.), показателей антиоксидантной защиты (активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, содержания восстановленного глутатиона, церулоплазмина), корректировать активность ферментов сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и др. Антиаритмическая активность соединений зависит также от их способности создавать комплексы с липидами, белковыми и углеводными компонентами биомембран, а также мембраносвязанными компонентами биометаллов и адениннуклеотидами, изменять вязкость липидного бислоя мембраны, применяя флуоресцентные зонды. Предложенные методы математического моделирования и прогнозирования антиаритмической активности новых соединений: при хлоридкальциевой аритмии – терапевтический индекс У1 и аконитиновой – У2 моделях. Модель прогноза рассчитывается с помощью констант стойкости комплекса соединений с фосфатидилхолином, холестерином, глюкозамином, цистеином, метионином, кальцием, магнием и АТФ (Методические рекомендации «Средства, которые применяют для лечения нарушений сердечного ритма», Запорожье, 1991). Для изучения механизма действия исследуемых соединений изучают связь с рецепторами натриевых, кальциевых, калиевых каналов, мускариновыми холинорецепторами (M_1 , M_2), адренорецепторами (α_1 , α_2 , β), дофаминовыми рецепторами (D_2), ГАМК-рецепторами, гистаминовыми, серотониновыми, аденозиновыми рецепторами и др. Изучают константы связывания соединений с этими рецепторами и другие физико-химические параметры. Изучают влияние соединений на активность аденилатциклазы и фосфоинозитольную систему, возможное определение содержания цитокинов.

Заключение

При исследовании новых противоаритмических средств обязательным является изучение их антиаритмической активности в опытах на 3–4 видах животных (крысах, кошках, кроликах, собаках) с использованием аконитиновой, хлоридбариевой, строфантиновой, хлоридкальциевой, реперфузионной и постинфарктной моделями аритмий, проведение электрофизиологических исследований. Остальные методики исследования антиаритмического действия используют при углубленном изучении препаратов в зависимости от свойств соединений. Обязательным также является изучение влияния соединений на кардио- и системную гемодинамику (сократительную функцию миокарда, ударный и минутный объем крови, артериальное давление, общее периферическое сопротивление сосудов). В связи с тем, что значительное количество противоаритмических средств угнетают сократительную активность миокарда, важно определить степень угнетения. Это также касается степени влияния нового соединения на частоту сердечных сокращений и функцию проводимости. Целесообразным является изучение антигипоксических свойств исследуемых веществ и их влияния на микроциркуляторные процессы.

Рекомендованный перечень методов позволит выявить соединения, которые по спектру и характеру действия могут быть предложены для клинических испытаний в качестве противоритмиков. Во время клинических исследований может возникнуть необходимость в проведении дополнительных экспериментов с целью уточнения рекомендаций по применению препарата в клинике.

Литература

1. Аммар Э.Г., Кудрин А.Н. Антиаритмическая активность β -N-гексаметиленимино-п-бутоксипропиофенона (ТГ-17), новокаинамида и хинидина при аритмиях, вызванных строфантинидом (К) у котенка//Фармакол. и токсикол.— 1969.— Т.32, №5.— С. 566–569.
2. Веденеева З.И. Влияние наркотических средств и новокаина на экспериментальную сердечную аритмию//Фармакол. и токсикол.— 1955.— Т.18, №5.— С. 3–8.
3. Вольперт Э.И., Могилев А.М. Влияние строфантина и цитохрома-С на сократительную функцию миокарда, частоту шока и фибрилляции желудочков при экспериментальном инфаркте миокарда//Кардиол.— 1979.— Т.19, №1.— С. 93–98.
4. Данильчук И.В. Пошук протиаритмічних засобів серед похідних діамінодифенілу та дібензодіазепіну//Ліки.— 1997.— №6.— С. 79–81.
5. Костко З.С., Юнусов З.З., Касимходжаев А.Ш. Функциональное состояние миокарда во время стенокардии, вызванной изопроterenолом//Кардиол.— 1984.— Т.24, №3.— С. 95–99.
6. Львов М.В. Влияние некоторых фармакологических веществ на хлористобариевую аритмию у кроликов//Журн. эксперим. и клин. мед.— 1973.— Т.13, №6.— С. 24–28.
7. Мазаев А.В. и др. Состояние микроциркуляции при ишемии миокарда в эксперименте//Бюлл. ВКНЦ АМН СССР.— 1979.— Т.1.— С. 9–13.
8. Павлов В.Н. Аконитиновая аритмия как модель изучения нервной регуляции ритма сердца//Регуляция деятельности сердца и коронарного кровообращения: Тр. II Моск. мед. ин-та.— Г., 1976.— Т.40, сер. Физиология, вып.1.— С. 140–146.
9. Розенштраух Л.В., Раковая А.В. Микроэлектродное исследование аконитиновой модели фибрилляции сердца//Физиол. журн. СССР.— 1965.— Т.51, №9.— С. 1070–1079.
10. Столярчук А.А., Поп В.Ю. Влияние феникаберана, кордарона и лидокаина на течение экспериментального инфаркта миокарда//VI съезд фармакологов УССР «Фармакология: состояние и перспективы исследований»: Тез. докл.— Харьков, 1990.— С. 292–293.
11. Сторожук Б.Г. Противофибрилляторная активность некоторых антиаритмических средств при максимально высокой перевязке коронарной артерии и ее реперфузии у котенка//Фармакол. и токсикол.— 1985.— №3.— С. 47–48.
12. Титов В.Н., Шаргородский В.М. Параллельное изучение порогов фибрилляции и возбуждения желудочков сердца в эксперименте на животных//Кардиол.— 1977.— Т.17, №4.— С. 111–116.
13. Физиология и патофизиология сердца: Пер. с англ./Под. ред. Н.Сперелакиса: в 2-х т.— Л.: Медицина, 1988.— Т.1.— 624 с.
14. Юрвичус М.А., Розенштраух Л.В., Юшманова А.В. Формирование эктопического возбуждения в сердце под действием аконитина. Сообщение 1. Динамика входящего и выходящего мембранных токов//Кардиол.— 1980.— Т.20, №1.— С. 75–78.
15. Alles G.A., Ellis C.H. Comparative actions of certain compounds like alfa-fagorine//J. Pharmacol. Exp. Ther.— 1948.— V.94.— P. 416–425.
16. Ellis K.O., Bryant S.H. Aconitine-induced repetitive firing in frog skeletal muscle and the effect on cable properties//Life Sci.— 1973.— V.13, №11.— P. 1607–1622.
17. Ferrter J.R., Saunders J.H., Mendez C. A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetyl-strophanthidin//Circ. Res.— 1973.— V.32.— P. 600–609.

18. Jennings R.B., Reimer K.A., Hill M.L., Majer S.E. Total ischemia in dog hearts, in vivo. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vivo, severe ischemia in vivo//Circ. Res. – 1981. – V.9. – P. 892–900.

19. Malinov M.R., Battle F.F., Malamud B. Nervous mechanisms in ventricular arrhythmias induced by calcium chloride in rats//Circ. Res. – 1953. – V.1. – P. 554–559.

20. Nayler W.J., Ferrary R., Williams A. Protective effect a pretreatment with verapamil, nifedipin and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium//Am. J. Cardiol. – 1980. – V.46. – P. 242–248.

21. Schmidt I., Schitt O. Effect of aconitine on the sodium permeability of node of Ranvier//Pflügers. Arch. – 1979. – V.61. – P. 133–148.