

На правах рукописи

Стрельников Артем Григорьевич

**ХИМИЧЕСКАЯ ДЕНЕРВАЦИЯ СЕРДЦА
ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАБОТА)**

14.01.26 Сердечно-сосудистая хирургия

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Подпись
соискателя

Новосибирск – 2017

**Работа выполнена в Центре интервенционной кардиологии
ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России**

Научный руководитель д-р медицинских наук, профессор, член-корр. РАН
ПОКУШАЛОВ Евгений Анатольевич

Официальные оппоненты:

ЗЕНИН Сергей Анатольевич, доктор медицинских наук
(Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области
Новосибирский областной клинический кардиологический диспансер; руководитель
Новосибирского областного центра хирургической и интервенционной аритмологии
ГБУЗ НСО НОККД)

ЕВТУШЕНКО Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук
(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский
национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
«Научно-исследовательский институт кардиологии»; ведущий научный сотрудник)

Ведущая организация:

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-
исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний"**
(650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6)

**Защита состоится 20.12. 2017 года в 12 часов на заседании диссертационного совета
Д 208.063.01 при ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.
Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;
e-mail: Lenko@meshalkin.ru
http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli**

**С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
и на сайте http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli**

Автореферат разослан .11. 2017 года

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
д-р мед. наук, профессор

Ленько Евгений Владимирович

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АВ	– предсердно-желудочковое
АНС	– автономная нервная система
в/в	– внутривенно
в/м	– внутримышечно
ВЛГС	– верхнее левое ганглионарное сплетение
ВС	– вагосимпатическая стимуляция
ГС	– ганглионарные сплетений
ЕД	– единиц действия
ЛВ	– легочные вены
ЛД ₅₀	– полуметальная доза
ЛП	– левое предсердие
НПГС	– нижнее правое ганглионарное сплетение
ПД	– потенциала действия
ППГС	– переднее правое ганглионарное сплетение
РЧА	– радиочастотная абляция
ТИ	– терапевтический индекс
ФП	– фибрилляция предсердий
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЭД ₅₀	– полуэффективная доза
ЭКГ	– электрокардиограмма
ЭРП	– эффективный рефрактерный период
ВТХ	– ботулинический токсин типа А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования, его цель и задачи

Фибрилляция предсердий (ФП) наиболее частая форма устойчивого нарушения ритма сердца (Ali , 2012; Andrew, 2013; Zhou, 2011) По самым последним оценкам распространенность ФП в США на 2010 год составляет от 2,7 млн. до 6,1 млн. человек (Colilla, 2013; Go, 2013). Распространенность ФП у лиц старше 60 лет удваивается с каждым десятилетием жизни и встречается примерно у 10% населения в возрасте старше 80 лет (Ali , 2012; Kannel, 2008; Mercaldi, 2011). Недавнее исследование подсчитало, что количество пациентов с ФП в США потенциально может достичь 12 миллионов до 2030 года (Colilla, 2013). По оценкам российских специалистов общее число случаев ФП в России - около 2,5 млн человек (Колбин, 2010). У пациентов с ФП в пять раз выше риск перенести инсульт головного мозга, чем у пациентов на синусовом ритме (Go, 2013). Риск инсульта головного мозга у пациентов с ФП прогредиентно возрастает с возрастом, от 1,5% в возрасте 50 - 59 лет до 23,5% в возрасте 80 – 89 лет (Go, 2013). Результаты одного из последних отечественного медико-экономических исследований свидетельствует о том, что ФП - дорогостоящая проблема для российского здравоохранения, имеющая существенное медико-социальное значение. Ожидаемые прямые расходы в Российской Федерации могут достигнуть суммы эквивалентной 1080 евро/пациент/год, что значительно ниже затрат большинства Европейских стран (Колбин, 2010). Так, в Греции расходы на пациента в год составляют не менее 1360 евро, в Италии - 3220 евро, в Испании - 2300 евро (Ringborg, 2008), в США достигают 15553 долларов/пациент/год. Суммарные затраты, связанные с ФП, в Российской Федерации могут быть оценены в 102,92 млрд. руб. в год, включая расходы на госпитализацию (53,77 млрд. руб.), амбулаторное лечение и диагностику (21,4 млрд. руб.), лекарственное обеспечение амбулаторного лечения (16,9 млрд. руб.) и косвенные затраты (10,85 млрд. руб.) (Колбин, 2010).

Радиочастотная изоляция устьев лёгочных вен считается в настоящее время «золотым стандартом» интервенционного лечения ФП и у ряда пациентов является первой линией терапии (Anderson, 2013). Однако, часто эффективность и безопасность данного метода лечения не всегда достигает ожидаемого уровня. Существует несколько уязвимых мест применения традиционных методов радиочастотной абляции (РЧА) ФП. Средняя эффективность радиочастотной катетерной изоляции легочных вен по данным ряда авторов составляет от 45% до 75%, в связи с чем необходимость проведения повторного вмешательства может достигать 40%. Кроме того, существует риск таких грозных осложнений как стеноз легочных вен, перфорация сердца, перфорация пищевода, что в свою очередь ассоциировано с высокой частотой летального исхода. Для создания условий

минимального риска такого рода осложнений требуется опыт и мастерство оператора. Нельзя оставлять без внимания и большое количество ятрогенного левопредсердного трепетания после изоляции легочных вен, которое может составлять до 24%. При развитии левопредсердного трепетания, как правило, пациенты чувствуют себя хуже, чем до проведения вмешательства и требуют дальнейшей терапии.

Одним из ключевых элементов в возникновении и поддержании фибрилляции предсердий (ФП) является автономная нервная система сердца (АНС) (Scherlag, 2005; Hou, 2007). Это подтверждается заметным снижением степени индукции ФП после денервации сердца в эксперименте на животных (Schauerte, 2000; Lemola, 2008).

Ряд исследований продемонстрировал, что радиочастотная катетерная абляция автономной нервной системы левого предсердия имеет сопоставимую эффективность и безопасность с катетерной изоляцией устьев легочных вен, а в дополнении увеличивает эффективность лечения пациентов с ФП (Katrtsis, 2011; Zhou, 2011) (Calkins, 2012). Следует отметить, что селективное выполнение абляции ГС без воздействия на миокард предсердий не представляется возможным (Calkins, 2012), данная процедура так же ассоциирована с риском грозных ятрогенных осложнений типичных для катетерной абляции. Кроме того, катетерная (Montecusso, 1996) абляция автономной нервной системы, даже при своей высокой эффективности лечения ФП, ведет к необратимому уничтожению одного из основных электрофизиологических регуляторов функции левого предсердия.

Ботулинический токсин - токсин, продуцируемый бактерией *Clostridium botulinum*, обладающий цинк-связывающей металл-эндопептидазной функцией. Механизм действия данного токсина заключается в блокировании высвобождения ключевых нейромедиаторов из синаптических везикул (Montecusso, 1996). Таким образом, ботулинический токсин блокирует нейротрансмиссию, ключевую в функции постганглионарных нейронов.

В клинической практике ботулотоксин тип А надежно себя зарекомендовал как высокоэффективный и безопасный препарат, применяемый практически во всех специальностях современной медицины при лечении, связанным с блокированием нервно-мышечной передачи и нейротрансмиссии (Chen, 2012).

Все это создало предпосылки для исследования и разработки нового безопасного высокоселективного метода выключения патологической функции автономной нервной системы сердца при лечении начальных форм фибрилляции предсердий, профилактики фибрилляции предсердий после открытых кардиохирургических операций и в дополнение к стандартной методике катетерной абляции левого предсердия.

Цель и задачи исследования

Цель – разработать метод химической денервации сердца на модели животного для потенциального клинического применения: хирургического лечения и профилактики фибрилляции предсердий.

Задачи:

1. Исследовать специфическую антиаритмическую активность ботулинического токсина типа А на экспериментальной модели животных;
2. Оценить эффективность и безопасность метода эпикардиальных инъекций ботулинического токсина в целях снижения уязвимости к фибрилляции предсердий на экспериментальной модели животных;
3. Оценить эффективность и безопасность метода эндокардиальных инъекций ботулинического токсина в ганглионарные сплетения автономной нервной системы левого предсердия на экспериментальной модели животных;
4. Подобрать состав композиции на основе ботулинического токсина серотип А для его потенциального клинического применения в сердечно-сосудистой хирургии.

Научная новизна

В ходе исследования впервые:

- на модели животного разработаны новые методы лечения и профилактики фибрилляции предсердий путем селективной химической денервации вегетативной нервной системы сердца;
- подобраны критерии и методы оценки эффективности выполнения процедуры селективной химической денервации вегетативной нервной системы сердца;
- произведен анализ эффективности и безопасности разработанных методов для оценки целесообразности соответствующего клинического применения;
- создана трансляционная база для возможности проведения клинического исследования разработанных методов лечения.

Отличие полученных новых научных результатов от результатов, опубликованных другими авторами

Опубликован широкий спектр потенциального клинического применения ботулинического токсина тип А (Chen, 2012). В отличии от указанных направлений в работе выявлены эффекты ботулинического токсина, свойственные антиаритмическим препаратам II, III, IV классов.

Опубликована работа указывающая, что ботулинический токсин тип А блокирует нейротрансмиссию в сердце (Tsuboi, 2002). Результаты проведенных исследований показали, что блокирование ботулиническим токсином нейротрансмиссии ганглионарных сплетений левого предсердия снижает уязвимость к фибрилляции предсердий.

Ранее, в эксперименте на собаках, было выявлено свойство ботулинического токсина подавлять вагус-индуцированную ФП в течение 1 недели (Oh, 2011). Проведенные в ходе работы эксперименты на животных выявили эффективность эпикардального и эндокардиального методов хирургического введения ботулинического токсина в течение 3 месяцев.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов и рекомендаций

Результаты получены с применением сертифицированного оборудования, воспроизводимы. Дизайн экспериментальных исследований включал мероприятия по предупреждению предвзятости (систематических ошибок): исследования были плацебо-контролируемы, группы включения рандомизированы.

Научно-практическая значимость

В результате исследования разработан принципиально новый подход к лечению фибрилляции предсердий на основе безопасного ткане-сохраняющего устранения локальных нарушений в вегетативной иннервации сердца (селективная химическая денервации ганглионарных сплетений левого предсердия). Экспериментально доказана эффективность и безопасность процедуры, которая может позволить достичь положительного результата у пациентов с пароксизмальной формой ФП при минимальном риске осложнений, сохранения целостности тканей предсердия, физическом исключении ятрогенных постпроцедуральных нарушений ритма сердца. Получены новые научные знания о вегетативных механизмах возникновения фибрилляции предсердий.

Краткая характеристика научного материала (объекта исследования) и научных методов исследования

В основе диссертационной работы лежат результаты 7 последовательных экспериментальных исследований. Под каждое исследование был сформирован отдельный дизайн с включением разных типов экспериментальных животных (лабораторных крыс – 660, лабораторных кроликов – 220, свиней – 30, собак – 24). В исследования использовался ботулинический токсин тип А (Ксеомин), «Мерц Фарма», Германия. Синтез и разработка оптимального состава на основе ботулинического токсина А для химической денервации был выполнен на базе Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, сотрудниками института. Статистические расчеты проводились с использованием версии программного обеспечения STATA 12.0 (Stata Corp, Texas, USA).

Использованное оснащение, оборудование и аппаратура

Стандартное оборудование операционного блока в условиях экспериментальной лаборатории. Электрофизиологическая система CARTO XP (Biosense Webster, США). Интраоперационный анализатор порогов электростимуляции (Биотроник, Германия) Цифровая мобильная ангиографическая установка General Electric (Дженерал Электрик, США).

Личный вклад автора в получении новых научных результатов данного исследования

Автор принял непосредственное участие в работе над постановкой задач и моделирования научного дизайна работы, выполнении всех этапов экспериментального, клинико-лабораторного и гистоморфологического исследования.

Лично провёл статистический анализ и интерпретацию данных, сформулировал выводы диссертации опубликовал эти результаты в центральной печати.

Реализация и внедрение результатов исследования

Основные положения диссертации внедрены в повседневную практику отделения кардиохирургии нарушений ритма сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты диссертационной работы использованы при создании протокола и утверждении клинического исследования: «Профилактика фибрилляции предсердий у пациентов во время открытого кардиохирургического вмешательства при помощи ботулинического токсина тип А: рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование». Применение в клинической практике метода профилактики фибрилляции предсердий при помощи ботулинического токсина тип А способствует улучшению качества оказания медицинской помощи у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий, предотвращению прогрессирования данного вида нарушения ритма в отдаленном периоде наблюдения и улучшению клинических и функциональных показателей.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них опубликованных, в ведущих научных журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией – три, в зарубежных научных изданиях – 2

Работ, опубликованных в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов – 6.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием экспериментального материала и методов исследования, главы собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и практических рекомендаций. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста. Указатель литературы содержит 14 отечественных и 126 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 26 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпикардальное введение Ботулинического токсина обладает признаками и свойствами антиаритмических препаратов II, III, IV классов (Vaughan Williams , 1992).
2. Эпикардальные инъекции ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения автономной нервной системы левого предсердия является эффективным и безопасным методом значительно снижающего уязвимость миокарда к фибрилляции предсердий.
3. Метод эндокардиальных инъекций ботулинического токсина в интрамиокардиальные ганглионарные сплетения и эпикардальные жировые подушки практически осуществим, безопасен, обеспечивает полное устранение предсердного вегетативного влияния, достоверно снижает уязвимость к фибрилляции предсердий.
4. Наибольшей терапевтической эффективностью и длительностью действия обладает фармацевтическая композиция на основе ботулинического токсина серотип А в комплексе с раствором Хитозоля.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В соответствии с действующим рекомендациям по исследованию потенциально новых лекарственных средств и опытом новейших хирургических методов лечения нарушений ритма сердца был разработан многокомпонентный дизайн (рис. 2) экспериментального исследования Химической денервации сердца для устранения фибрилляции предсердий.



Рисунок 1. Дизайн экспериментального исследования.

Поиск новых лекарственных средств в аритмологии сопровождается тщательной и скрупулёзной оценкой их свойств, эффективности и безопасности. Это обусловлено тем, что данный вид лекарственных средств, помимо своей высокой эффективности, потенциально обладает и серьезными побочными эффектами, в частности, проаритмическим действием. Поиск и доклиническое изучение потенциальных антиаритмических ЛС можно условно разделить на несколько этапов (Миронов, 2012). На первом этапе осуществляется скрининг и первичная оценка механизмов возможного действия препаратов.

I. Исследование специфической антиаритмической активности ботулинического токсина типа А на различных моделях нарушения ритма сердца

Адреналиновой модель нарушения ритма сердца

Таблица 1. Распределение животных по группам в опыте по определению ЭД50

Препарат	Дозы соединения	Количество животных
ВТХ в/в (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп (включая плацебо) по 10 крыс
ВТХ эпикардiallyно (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп (включая плацебо) по 10 крыс
Метопролол в/в (мг/кг)	0.25, 0.5, 2, 8, 20, 40	6 групп по 10 крыс
Верапамил в/в (мг/кг)	0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20	6 групп по 10 крыс

Таблица 2 Данные фармакологической активности референтных антиаритмических препаратов

Препарат	ЭД ₅₀ , мг/кг (ср.±сo)	95% ДИ	ЛД ₅₀ , мг/кг	ТИ (ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀)
Метопролол	3,2±0,15	2,90; 3,49	71,9	22,4
Верапамил	1,1±0,04	1,02; 1,17	7,25	6,6
ВТХ в/в (нг/кг)	-		-	-

Таблица 3 Данные фармакологической активности эпикардиального введения ВТХ.

Препарат	Анализируемый признак	ЭД ₅₀ , нг/кг ср±сo	95% ДИ	ЛД ₅₀ , нг/кг	ТИ (ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀)
ВТХ эпикардиально (нг/кг)	«Выживаемость»	0,0580±0,0134	0,031; 0,084	1,5	25,86
	«Свобода от аритмии»	0,0894±0,0239	0,042; 0,136	1,5	16,77

Хлорид-бариевая модель нарушения ритма сердца

Таблица 4. Распределение животных по группам в опыте по определению ЭД₅₀ на хлорид-бариевой модели аритмии

Препарат	Дозы соединения	Количество животных
ВТХ в/в (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп по 10 кроликов
ВТХ эпикардиально (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп по 10 кроликов
Амиодарон (мг/кг)	0.5, 1, 2, 4, 8, 16	6 групп по 10 кроликов

Таблица 5 Данные фармакологической активности исследуемых соединений на хлорид-бариевой модели аритмий

Препарат	ЭД ₅₀ , ср.±сo*	95% ДИ	ЛД ₅₀	ТИ (ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀)
Амиодарон, мг/кг	4,5±0,3	0,05; 6,7	89	18,5
ВТХ эпикардиально (нг/кг)	0,050±0,016	0,018; 0,081	0,7	14
ВТХ в/в (нг/кг)	-		-	-

Внутривенное введение исследуемой субстанции на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

Таблица 6. Распределение крыс по группам в опыте по определению ЭД₅₀ на аконитиновой модели аритмии

Препарат	Дозы соединения	Количество животных
ВТХ в/в (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп по 10 крыс
ВТХ эпикардиально (нг/кг)	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125	6 групп по 10 крыс
Новокаинамид (мг/кг)	0.3, 0.7, 2, 6, 16, 32	6 группы по 10 крыс
Лидокаин (мг/кг)	0.2, 0.5, 2, 8, 20, 40	6 групп по 10 крыс
Этмозин (мг/кг)	0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8	6 групп по 10 крыс

Таблица 7 Данные фармакологической активности антиаритмических препаратов I класса на аконитиновой модели нарушений ритма

Препарат	ЭД ₅₀ , сред.±сo	95% ДИ	ЛД ₅₀	ТИ (ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀)
Новокаинамид, мг/кг	12,2±1,7	8,86; 15,53	95	7,8
Лидокаин, мг/кг	7,9±0,3	7,31; 8,48	21	2,7
Этмозин, мг/кг	1,9±0,02	1,86; 1,94	11	14
ВТХ эпикардиально (нг/кг)	-		-	-
ВТХ в/в (нг/кг)	-		-	-

Заключение

- Внутривенное введение ботулинического токсина тип А на адреналиновой, хлорид-бариевой, аконитиновой моделях нарушений ритма не оказывает антиаритмического действия.
- Эпикардальное введение ботулинического токсина тип А сердца приводит к эффекту свойственному антиаритмическим препаратам II, III, IV классов.
- По величине терапевтического индекса ботулинический токсин тип А, уступает метопрололу в 1,3 раза, амиодарону в 1,32, но превосходит верапамил в 2,5 раза.
- Превентивное внутривенное введение субстанции ВТХ в дозировке от 0,05 до 5 нг/кг не прекращало развитие аритмии, вызванной последующим введением аконитина в дозе 40 мкг/кг. Более высокие дозы субстанции ВТХ не использовались, т.к. развивались патологические явления характерные для отравления ботулиническим токсином (угнетение сердечной деятельности, непредсказуемые проходящие нарушения внутрисердечной проводимости, сердечного ритма и т.д).
- Субстанция ВТХ во всех исследуемых дозировках не проявила антиаритмического действия при использовании метода эпикардальной инъекции на аконитиновой модели аритмии. Увеличение дозы субстанции ВТХ до 5 нг/кг также не приводило к появлению антиаритмического эффекта

II. Оценка эффективности и безопасности на экспериментальной модели ФП.

Эпикардальная денервация автономной нервной системы левого

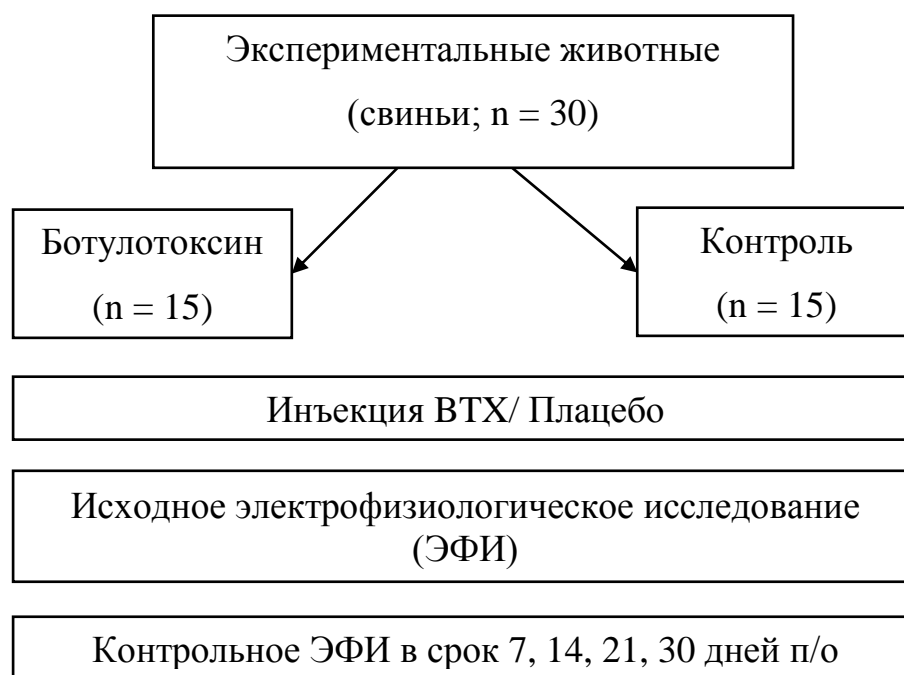


Рисунок 2. Дизайн исследования метода эпикардальной денервация автономной нервной системы левого предсердия

Результаты.

Последней точки периода наблюдения достигли 24 из 30 животных (80%; 13 - группа Ботулотоксин, 11 – группа контроля). Причинами исключения животных из эксперимента явились: технические трудности на этапе интубации до процедуры инъекции – 2 свиньи, инфицирование электрода в области вагосимпатического ствола – 1 свинья, проблемы с сосудистым доступом при осуществлении контрольного электрофизиологического исследования – 3 свиньи. Все причины исключения животных из эксперимента были квалифицированы как не связанные с процедурой инъекции ботулинического токсина. Других значимых осложнений и нарушения витальных функций животного не наблюдалось в обеих группах. Снижение фракции выброса левого желудочка, как основного из выбранных критериев кардиоингибиторного влияния, не выявлено ни в одной точке периода наблюдения, группа Ботулотоксин - $84 \pm 8\%$, группа Контроль - $82 \pm 11\%$ ($p=0,65$, 30 дней после инъекции). Превышение показателей послеоперационных маркеров кардиотоксичности не обнаружено в обеих группах, Тропонин I – $0,014 \pm 0,04$ и $0,017 \pm 0,09$ ($p=0,22$); Креатинфосфокиназа-MB – $226,3 \pm 114$ и $241,2 \pm 124$ ($p=0,63$), соответственно. Число включенных животных в исследование была последовательно дополнено до целевого значения по 15 в каждой группе (всего 30), путем проведения дополнительной части экспериментальной работы.

Исходно степень индукции ФП составила в группе ботулотоксина $71 \pm 10,7\%$, в

группе плацебо $74 \pm 9,1\%$ ($p=0.14$) и после эпикардиальной инъекции ботулинического токсина снизилась к 7 дню после процедуры до $21 \pm 12,1\%$ ($p < 0.001$ между группами; $p < 0.001$ от исходного; рис. 13); на 14 день $22 \pm 9,8\%$ ($p < 0.001$); на 30 день составила $41 \pm 11,4\%$ ($p < 0.001$).

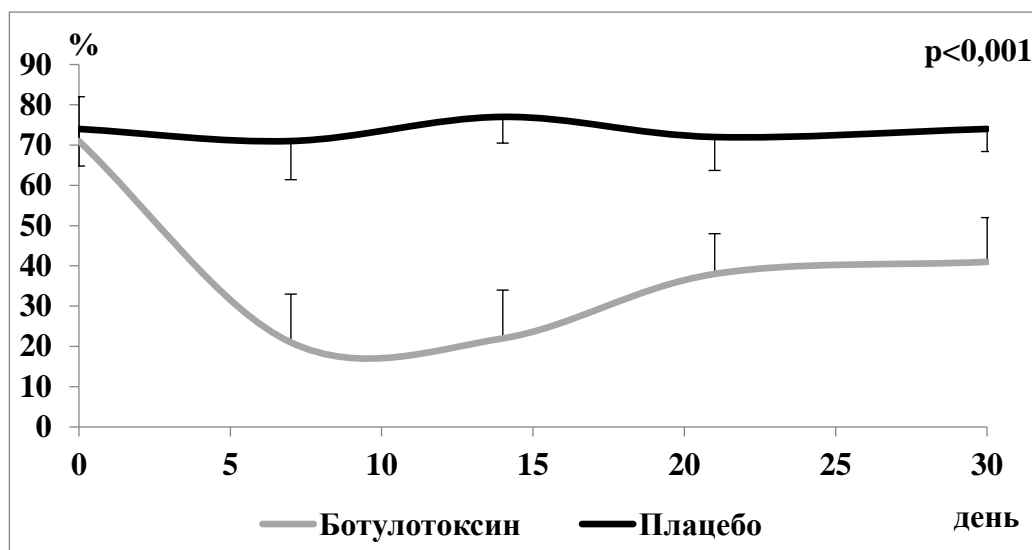


Рисунок 3. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий

Эндокардиальная денервация автономной нервной системы левого предсердия в целях лечения и профилактики фибрилляции предсердий

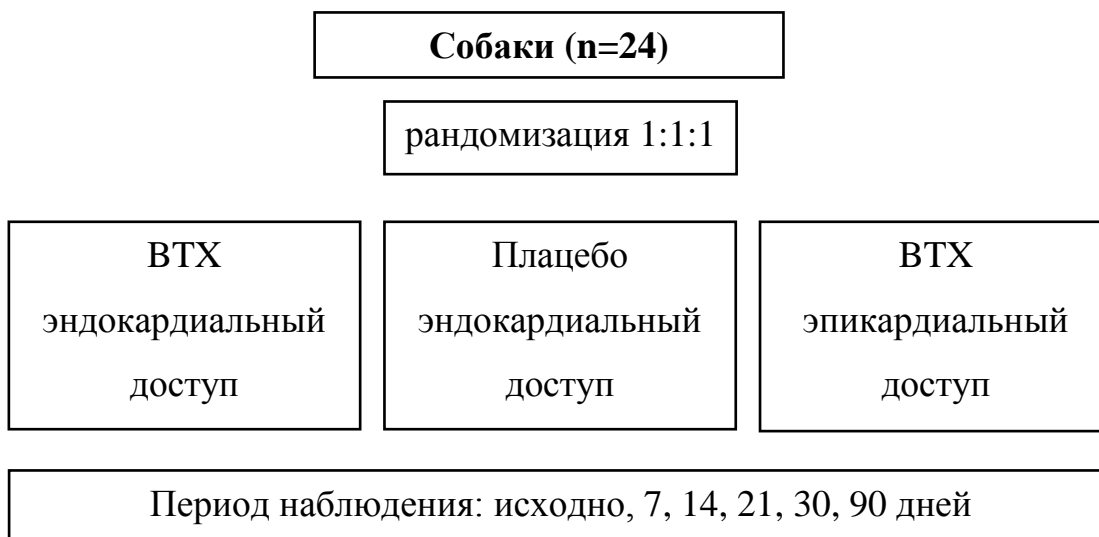


Рисунок 4. Дизайн исследования метода эндокардиальных инъекций ботулинического токсина



Рисунок 5. Инъекции контраста в эпикардиальные жировые подушки, содержащие верхние правые, нижние правые и верхние левые ГС.

Результаты

В среднем было выполнено 6.9 ± 1.7 интрамиокардиальных инъекций (по 10 Ед/0.2 мл на зону ответа) для каждого участка, с положительным вагусным ответом на высокочастотную электростимуляцию ($p > 0.05$ между группами). Дополнительно выполнялись 3 инъекции (50 Ед/1 мл в каждой) в каждую из трех жировых подушек – основных проекций ГС левого предсердия собаки. Расстояние между всеми инъекциями составляло около 0,5 см.

В эндокардиальной группе инъекции ботулотоксина для точной анатомической локализации выполнялись только после их предварительного рентген-контрастирования.

При точном введении рентген-контраста в область жировых подушек мы наблюдали задержку контраста и окрашивание ткани в виде облачной тени. В случае полной перфорации иглы наблюдалась утечка контраст вдоль перикарда в виде тонкой полоски.

При регистрации данного явления выполнялось контрольное ультразвуковое исследование сердца – гемоперикарда, тампонады и других значимых осложнений, связанных с процедурой, не выявлено.

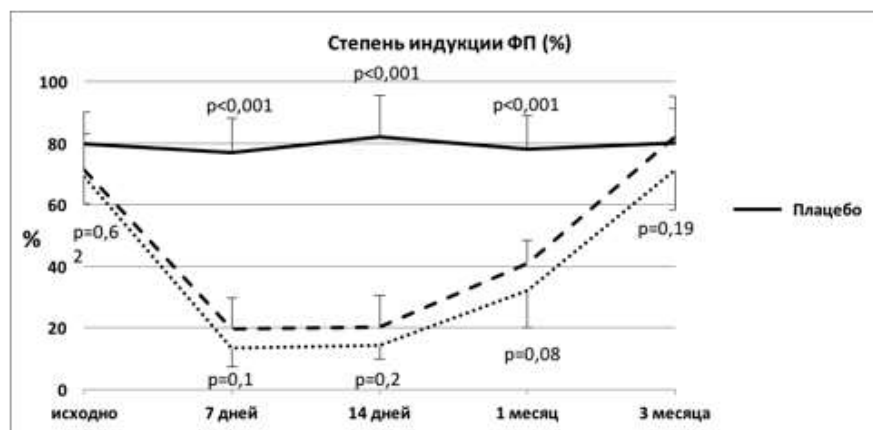


Рисунок 6. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий в ответ на эндокардиальные, эпикардиальные инъекции ботулотоксина и инъекции плацебо

Заключение

- Эпикардиальные инъекции ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения АНС левого предсердия является эффективным и безопасным методом значительно снижающего уязвимость миокарда к фибрилляции предсердий в течение 3 месяцев периода наблюдения.
- Метод эндокардиальных инъекций ботулинического токсина в интрамиокардиальные ГС и эпикардиальные жировые подушки практически осуществим, безопасен, обеспечивает полное устранение предсердного вегетативного влияния и достоверно снижает уязвимость к ФП в течение 3 месяцев периода наблюдения.

III. Разработка оптимального состава на основе ботулинического токсина типа А для химической денервации сердца.

Целью этой части работы стал подбор оптимального состава на основе ботулинического токсина тип А и природных мукополисахаридов, пригодного для потенциального клинического использования, а именно для профилактики и лечения нарушения сердечного ритма. Оптимальный состав должен обладать более высоким терапевтическим эффектом и повышенной длительностью (продолжительностью) действия, чем при применении препаратов на основе чистого ботулинического токсина тип А.

Общий дизайн исследования



Рисунок 7. Общий дизайн разработки оптимального фармацевтического состава на основе ботулинического токсина типа А для химической денервации сердца

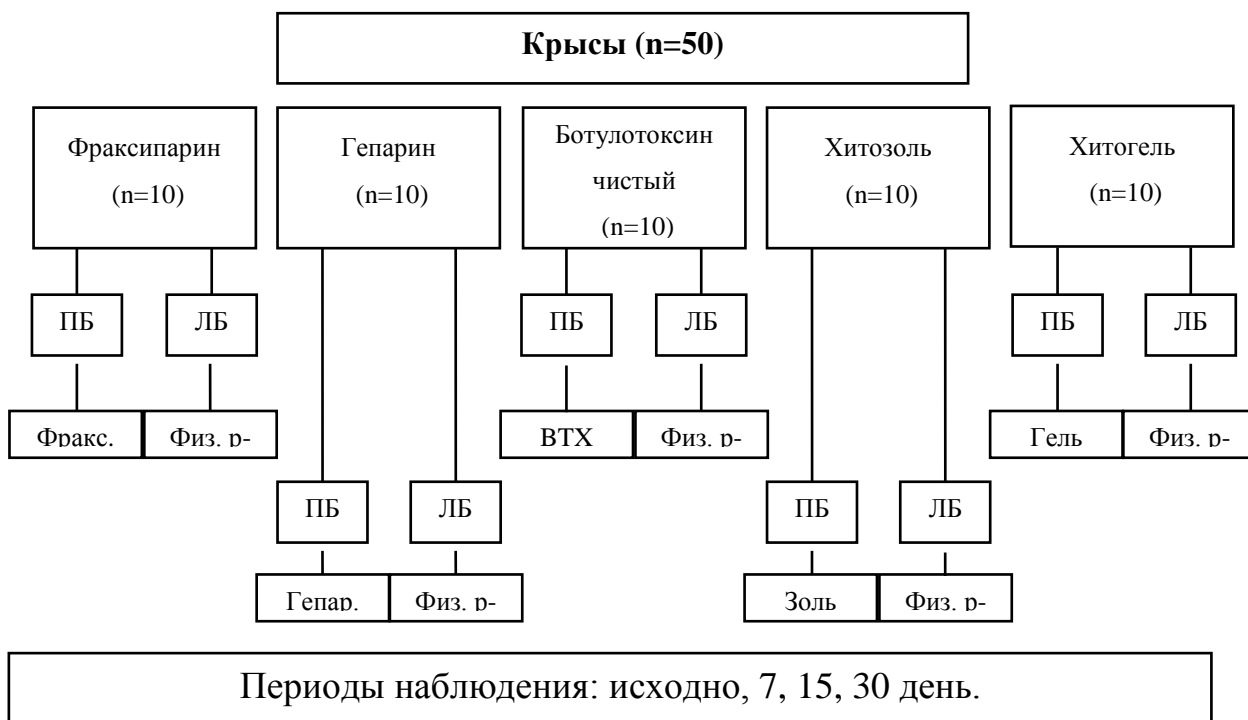


Рисунок 8. Выбор оптимального химического соединения в качестве системы медленного высвобождения. ПБ – правая задняя конечность, ЛБ – левая задняя конечность

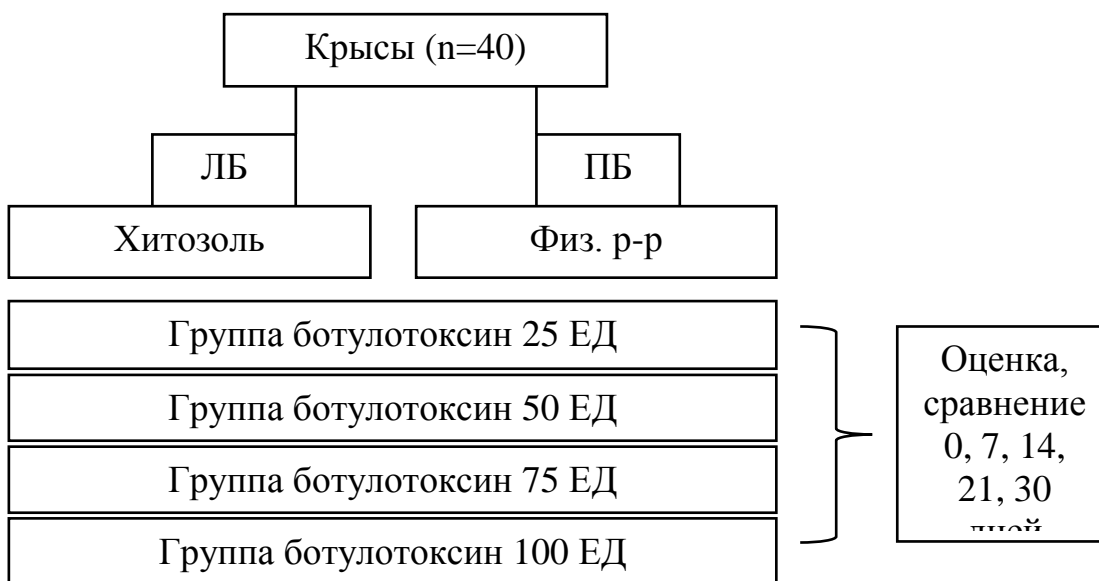


Рисунок 9. Выбор оптимальной дозы ботулинического токсина в новом фармацевтическом составе. ПБ – правая бедро, ЛБ – левое бедро.

Таблица 8.

Порог электростимуляции задней конечности крысы после инъекции ботулотоксина в сочетании с выбранным мукополисахаридом.

Наименование	Исходный порог стимуляции, V		4 неделя		Изменение от исходного, V		p от исходного
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	
Фраксипарин	1,23	0,35	1,33	0,44	0,1	0,80	0,68
Гепарин	0,96	0,42	0,83	0,22	-0,13	0,49	0,44
ВТХ	0,66	0,22	0,62	0,09	-0,04	0,30	0,70
Хитогель	0,53	0,09	1,17	0,22	0,645	0,19	<0,001
Хитозоль	1,40	0,23	2,80	0,46	1,78	0,62	<0,001
p между группами	0,4936		<0,001		<0,001		
μ - среднее значение; σ - стандартное отклонение							

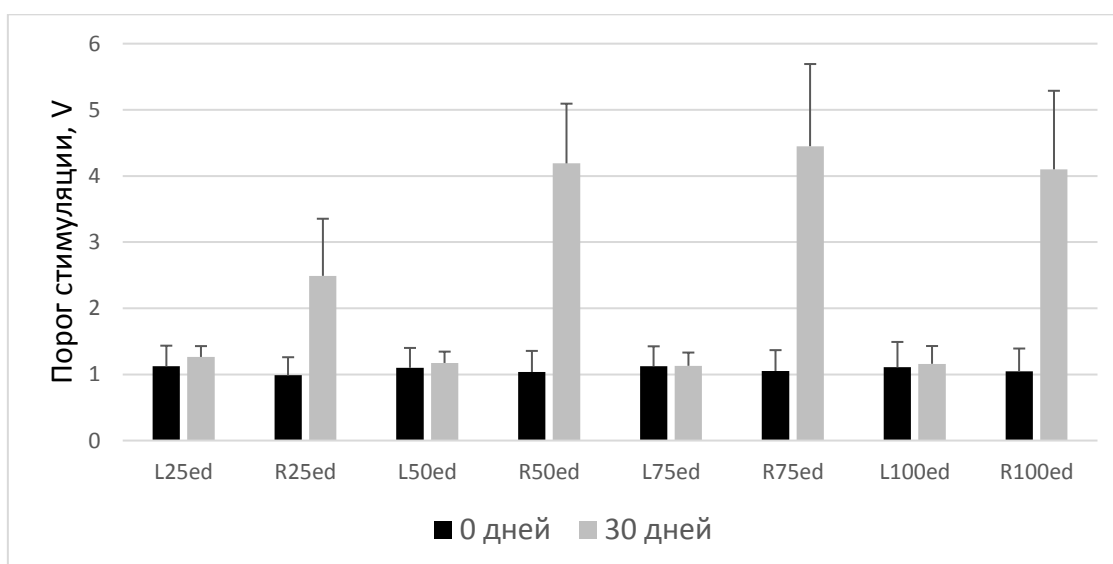


Рисунок 10. Сравнение эффективности эскалации дозы ботулотоксина

При анализе выживаемости: все экспериментальные животные групп 25 ЕД и 50 ЕД прошли весь период наблюдения, осложнений не выявлено. В группах 75 и 100 ЕД в первые две недели наблюдения погибли 4 и 6 из 10 животных соответственно в первые 2 недели наблюдения (рис. 10). Наблюдалось паралич правой задней конечности, передвижение за счет передних конечностей, общая заторможенность, потеря в весе, отказ от пищи и воды.

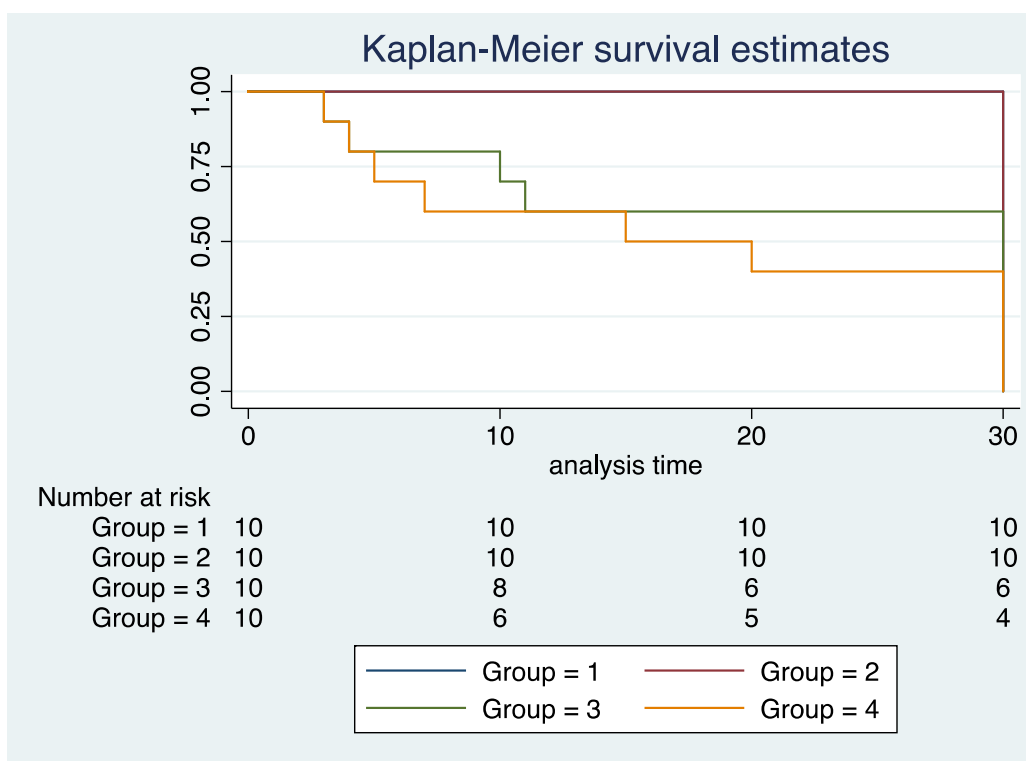


Рисунок 11. Выживаемость крыс после введения соединения различной дозы ботулинического токсина. Группа 1 – 25ЕД; 2 – 50ЕД; 3 – 75ЕД; 4 – 100ЕД ботулинического токсина;

На основании данных первого эксперимента по подбору оптимального мукополисахарида с группой Хитозоль (содержание ботулотоксина 10 ЕД) и второго эксперимента по подбору оптимального соотношения дозы ботулотоксина и хитозоля выполнен Пробит-анализ STATA 12.0 (Stata Corp, Texas, USA) с целью определения ЛД50 выбранного соединения с ботулиническим токсином: LD50(probit): 89.69 ЕД; 95% ДИ: 79.89-99.49 ЕД, что соответствует 2,24 нг/мл содержания Ботулинического токсина в растворе Хитозоля и дозе 0,4 нг/кг массы тела.

Гисто-морфологическое исследование

Для оценки общетоксического действия ботулотоксина и его комплексов было проведено гистологическое исследование внутренних органов экспериментальных животных, крыс Вистар. При микроскопическом анализе формалин-фиксированных и заключенных в парафин образцов тканей печени, почек, селезенки, сердца, скелетной мускулатуры и головного мозга не было обнаружено никаких морфологических признаков патологических изменений. Поэтому было сделано заключение об отсутствии поражающего воздействия препаратов ботулотоксина и различных его конъюгатов в исследуемых дозировках на ткани и органы экспериментальных животных.

Заключение

- В качестве оптимального состава на основе ботулинического токсина и природного мукополисахарида, пригодного для лечения нарушения сердечного ритма, обладающего высоким терапевтическим эффектом, повышенной длительностью действия выбрано соединение ботулотоксина серотип А раствором хитозана в золь - форме. Порог электростимуляции задней конечности крысы после инъекции субстанции более чем в 2 раза превышал параметры контрольных соединений.
- При выборе оптимального весового соотношения ботулинического токсина в разработанном соединении, наилучшую эффективность показали соединения Хитозоля с ботулиническим токсином в дозах 50, 75, 100 ЕД.
- ЛД₅₀ выбранного соединения с ботулиническим токсином: составил 89.69 ЕД; 95% ДИ: 79.89-99.49 ЕД, что соответствует дозе 0,4 нг/кг массы тела.

ВЫВОДЫ

1. Эпикардальное введение ботулинического токсина тип А сердца приводит к эффекту свойственному антиаритмическим препаратам II, III, IV классов.
2. Метод эпикардальных инъекции ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения автономной нервной системы левого предсердия является эффективным и безопасным методом значительно снижающего уязвимость миокарда к фибрилляции предсердий в течение 3 месяцев периода наблюдения.
3. Метод эндокардиальных инъекций ботулинического токсина в интрамиокардиальные ганглионарные сплетения и эпикардальные жировые подушки практически осуществим, безопасен, обеспечивает полное устранение предсердного вегетативного влияния и достоверно снижает уязвимость к фибрилляции предсердий в течение 3 месяцев периода наблюдения.
4. Наибольшей эффективностью и длительностью действия обладает композиция на основе ботулинического токсина типа А в комплексе с раствором Хитозоля. Порог электростимуляции задней конечности крысы на 30 день после инъекции композиции более чем в 2 раза превышает параметры контрольных соединений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Хирургический метод эпикардиальных инъекций ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения автономной нервной системы левого предсердия требует дальнейшее исследование на клиническом этапе как новый вариант выбора в лечении фибрилляции предсердий.
2. Хирургический метод эндокардиальных инъекций ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения автономной нервной системы левого предсердия требует дальнейшее исследование на клиническом этапе как новый вариант выбора в лечении фибрилляции предсердий.
3. Эпикардиальные инъекции ботулинического токсина следует выполнять в анатомические проекции основных ганглионарных сплетений левого предсердия (верхне-правое, нижне-правое, передне-левое, задне-левой) по 50 ЕД в 1мл физиологического раствора на одно сплетение.
4. Эпикардиальные инъекции выполнять стандартным инсулиновым шприцем по 3-4 вкола (0,3-0,25 мл) на одну проекцию сплетения. Вкол иглы шприца выполнять в 2 этапа: первый - вкол под 45° к поверхности на 1-2 мм, второй – продвижение иглы на 2 мм параллельно поверхности предсердия. Инъекции выполнять в шахматном порядке, на дистанции 3-5 мм от предыдущего вкола.
5. Эндокардиальные инъекции ботулинического токсина следует выполнять в рентген-анатомические проекции основных ганглионарных сплетений левого предсердия (верхне-правое, нижне-правое, передне-левое, задне-левой), по 50 ЕД в 1мл физиологического раствора на одно сплетение, при помощи специализированного рентгенэндоваскулярного катетера для миокардиальных инъекций.
6. После введения иглы, перед введением ботулинического токсина эндокардиальным способом, в целях более точного позиционирования, целесообразно первоначально ввести 0,5 мл рентгенконтрастного препарата. Критерием точного внутритканевого позиционирования является наличие гомогенного рентгенконтрастного облака до 5 мм в диаметре. Наличие серповидной рентгенконтрастной полоски вдоль контура предсердия обозначает внутривнутрикардиальное положение иглы.

ПУБЛИКАЦИИ

Всего опубликованных работ - 37 из них работ по теме диссертации - 5, среди них:

1. Работ, опубликованных в отечественных ведущих научных журналах и изданиях, определенных ВАК - 3
2. Монографий - 0
3. Работ в зарубежных научных изданиях - 2
4. Патентов - 0
5. Работ, опубликованных в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов (тезисов) - 3
6. Публикаций в электронных научных изданиях и депонированных рукописей - 0

1. Работы по теме диссертации

1.1. Работы, опубликованные в отечественных ведущих научных журналах и изданиях, определенных в действующем перечне ВАК

1. Нейротоксическая денервация автономной нервной системы левого предсердия в целях лечения и профилактики фибрилляции предсердий: экспериментальное исследование. Стрельников А.Г., Лосик Д.В., Сергеевичев Д.С., Зыков И.С., Абашкин С.А., Романов А.Б., Покушалов Е.А. // **Патология кровообращения и кардиохирургия**. 2015. т. 19. № 3. с. 94-99.
2. Метод эндокардиальной инъекции ботулотоксина в ганглионарные сплетения автономной нервной системы сердца в целях снижения уязвимости к фибрилляции предсердий. Стрельников А.Г., Якубов А.А., Сергеевичев Д.С., Артеменко С.Н., Михеенко И.Л., Абашкин С.А., Романов А.Б., Покушалов Е.Л. // **Патология кровообращения и кардиохирургия**. 2015. Т. 19. № 4. С. 99-107.
3. Применение ботулинического токсина на различных моделях нарушений ритма сердца. Стрельников А. Г., Сергеевичев Д. С., Покушалов Е. А. // **Биотехносфера**. 2017. Т. 2 (50). С. 58 - 64.

1.2. Работы, опубликованные в зарубежных научных изданиях

1. Long-term suppression of atrial fibrillation by botulinum toxin injection into epicardial fat pads in patients undergoing cardiac surgery: one-year follow-up of a randomized pilot study. Pokushalov E., Romanov A., Strelnikov A., Bayramova S., Sergeevichev D., Bogachev-Prokophiev A., Zheleznev S., Lomivorotov V.V., Karaskov A., Kozlov B., Shipulin V., Po S.S., Steinberg J.S. // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2015. Т. 8. № 6. С. 1334-1341.
2. Botulinum toxin injection in epicardial fat pads can prevent recurrences of atrial fibrillation after cardiac surgery: results of a randomized pilot study. Pokushalov E., Kozlov B.,

Romanov A., Strelnikov A., Bayramova S., Sergeevichev D., Bogachev-Prokophiev A., Zheleznev S., Shipulin V., Salakhutdinov N., Lomivorotov V.V., Karaskov A., Po S.S., Steinberg J.S. // Journal of the American College of Cardiology. 2014. Т. 64. № 6. С. 628-629.

1.3. Работы, опубликованы в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов

1. Ganglionated plexi ablation directed by high-frequency stimulation and complex fractionated atrial electrograms for paroxysmal atrial fibrillation. Artem Strelnikov // Journal of Arrhythmia. 2013. Volume 29 Supplement 10. P. i9.
2. Relationship between reduction of systolic blood pressure and atrial fibrillation burden after renal denervation and pulmonary vein isolation. E. Pokushalov, A. Romanov, D.G. Katritsis, A. Strelnikov, S. Artemenko, D. Losik, V. Baranova, A. Karaskov, J.S. Steinberg // EP Europace. 2015. Volume 17 Issue suppl.3. P. iii136–159.
3. Denervation Properties of Botulinum Neurotoxin Type A in Complex with Chitozan. D. Sergeevichev, V. Fomenko, A. Strelnikov, A. Dokuchaeva, A. Korobeynikov, E. Chepeleva, N. Salakhutdinov, E. Pokushalov, A. Karaskov // Tissue Engineering: Part A. 2016. Vol.22 Suppl.1. P.46.
4. Inducibility of Atrial Fibrillation After Epicardial Injection of the new pharmaceutical composition containing botulinum toxin into epicardial fat pads. Alexander Romanov, Evgeny Pokushalov, Artem Strelnikov, David Sergeevichev, Nariman Salakhutdinov, Vladislav Fomenko, Alexander Karaskov // EP Europace. 2016. Volume 18 Suppl.1. P. i28.
5. The influence of the new pharmaceutical composition containing botulinum toxin on different pharmacological models of heart rhythm disorders A. Romanov, A. Strelnikov, D. Sergeevichev, N. Salakhutdinov, V. Fomenko, V. Shabanov, D. Losik, I. Mikheenko, A. Karaskov, E. Pokushalov // European Heart Journal. 2017. Volume 38. Suppl.1. P1711.