

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.Н. МЕШАЛКИНА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Стрельников Артем Григорьевич

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

Специальность 14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель-
доктор медицинских наук, профессор
Покушалов Евгений Анатольевич

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список условных обозначений.....	4
Введение	5
Глава 1. Концепция вегетативной денервации в лечении пациентов с фебриляцией предсердий	15
1.1 Современные представления об автономной регуляции предсердий. Роль в развитии фибрилляции предсердий	15
1.2 Современные проблемы в хирургическом лечении фибрилляции предсердий.....	20
1.3. Абляция автономной нервной системы.....	22
1.4. Селективная денервация при помощи ботулинического токсина серотип А в лечении нарушений ритма сердца	23
Глава 2. Исследование специфической антиаритмической активности ботулинического токсина типа А на различных моделях нарушения ритма сердца.....	28
2.1. Материал и методы исследования.....	28
2.1.1. Лабораторные животные.....	28
2.1.2. Объект исследования.....	29
2.1.3. Экспериментальные модели	29
2.2. Статистический анализ.....	39
2.3. Результаты	39
2.3.1. Адреналиновая модель нарушения ритма сердца	39
2.3.2. Хлорид-бариевая модель нарушения ритма сердца	44
2.3.3. Аконитиновая модель нарушения ритма сердца	46
2.4. Заключение	50
Глава 3. Исследование специфической антиаритмической активности ботулинического токсина типа А на модели крупных позвоночных при эпикардальном и эндокардиальном методах введения.....	51
3.1. Эпикардальная денервация автономной нервной системы левого	

предсердия в целях лечения и профилактики фибрилляции предсердий	51
3.1.1. Материалы и методы	51
3.1.2. Статистический анализ.....	55
3.1.3. Результаты	55
3.2. Эндокардиальная денервация автономной нервной системы левого предсердия в целях лечения и профилактики фибрилляции предсердий	57
3.2.1. Материалы и методы	57
3.2.2. Статистический анализ.....	63
3.2.3. Результаты	63
3.3. Заключение	69
Глава 4. Разработка оптимального состава на основе ботулинического токсина типа А для химической денервации сердца	70
4.1. Введение	70
4.2. Материалы и методы	70
4.2.1. Оптимальный состав.....	70
4.2.2. Лабораторные животные.....	74
4.2.3. Электростимуляция	74
4.2.4. Общий дизайн исследования	74
4.3. Статистический анализ.....	77
4.4. Результаты	77
4.4.1. Выбор химического соединения	77
4.4.2. Определение оптимальной дозы ботулинического токсина в новом составе	78
4.5. Заключение	81
Обсуждение полученных результатов	82
Список литературы	91
Список иллюстрированного материала	106
Список таблиц	109

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Фибрилляция предсердий (ФП) наиболее частая форма устойчивого нарушения ритма сердца [1, 2, 3] [4, 5]. Распространенность ФП у лиц старше 60 лет удваивается [1, 6, 7].

Недавнее исследование подсчитало, что количество пациентов с ФП в США потенциально может достичь 12 миллионов до 2030 года [4].

По оценкам российских специалистов общее число случаев ФП в России - около 2,5 млн человек [8].

У пациентов с ФП в пять раз выше риск перенести инсульт головного мозга, чем у пациентов на синусовом ритме [5].

Риск инсульта головного мозга у пациентов с ФП прогрессивно возрастает с возрастом, от 1,5% в возрасте 50 - 59 лет до 23,5% в возрасте 80 – 89 лет [5].

Результаты отечественных и зарубежных медико-экономических исследований свидетельствует о крайне высоком финансовом бремени ФП как при амбулаторного лечения (16,9 млрд. руб. в России), так и косвенных затрат (10,85 млрд. руб. в России) [8, 9].

Радиочастотная изоляция устьев лёгочных вен считается в настоящее время «золотым стандартом» интервенционного лечения ФП, и у ряда пациентов является первой линией терапии [10]. 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 предсердий после изоляции легочных вен, которое может составлять до 24%. При развитии левопредсердного трепетания пациенты чувствуют себя часто 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) [11, 12]. Это подтверждено в ряде экспериментов на животных, в которых происходило заметное снижение степени индукции [13, 14].

Проведенные исследования продемонстрировали, 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 [3, 15, 16].

Следует отметить, что селективное выполнение абляции ГС без воздействия на миокард предсердий не представляется возможным [16], данная процедура ассоциирована с риском грозных ятрогенных осложнений типичных для катетерной абляции. Кроме того, катетерная 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 [17]. 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,

связанном с блокированием нервно-мышечной передачи и нейротрансмиссией [18].

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 аблации 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 эпикардальных 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 [18]. В отличие 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 [19]. 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 [20]. 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 моделированием 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 – 5.

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.

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.

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.

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.

Положения, выносимые на защиту

1. Эпикардальное введение Ботулинического токсина обладает признаками и свойствами антиаритмических препаратов II, III, IV классов [21].
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 эпикардиальные 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 композиция на основе ботулинического токсина серотип А в комплексе с раствором Хитозоля.

ГЛАВА 1. КОНЦЕПЦИЯ ВЕГЕТАТИВНОЙ ДЕНЕРВАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ФЕБРИЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ

1.1 Современные представления об автономной регуляции предсердий. Роль в развитии фибрилляции предсердий

Активация автономной нервной системы является причиной значительных электрофизиологических изменений в предсердии, включая гетерогенность электрического проведения, индукцию таких аритмий, как фибрилляция и трепетания предсердий. Значимость автономной нервной системы в этих процессах так же подтверждается циркадной вариабельностью возникновения эпизодов тахиаритмий [20]. Большим количеством исследований показано, что уменьшение автономной иннервации, значительно снижает количество и продолжительность эпизодов предсердных тахиаритмий (спонтанных и индуцированных), а нейромодуляция играет ключевую роль в контроле над ФП [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Сердце имеет обильную иннервацию элементами автономной нервной системы. Ганглионарные клетки автономной нервной системы локализованы как вне сердца (экстракардиальные), так и внутри сердца (интракардиальные). Обе системы (экстра- и интракардиальная) значительно влияют как на функцию сердца, так и на аритмогенез [27, 28, 29, 30].

Экстракардиальные симпатические нервы берут свое начало в паравертебральных ганглиях: верхний шейный, средний шейный, шейно-грудной (звездчатый) и грудной [31]. Так же частью экстракардиальной системы является блуждающий нерв, в состав которого входят аксоны нервных клеток из различных ядер продолговатого мозга. Преимущественным источником симпатической иннервации считают шейно-грудной (звездчатый) ганглий, он контактирует с многочисленными внутригрудными нервами, органами и кожей

области груди [32, 33, 34, 35], преимущественным источником парасимпатической иннервации – блуждающий нерв. Однако недавние иммуногистохимические исследования утверждают, что симпатическая нервная система звездчатого ганглия так же содержит и ацетилхолиновые (парасимпатические) синапсы, как и блуждающий нерв -норадреналиновые (симпатические) [36, 37]. В дополнении к парасимпатической функции блуждающего нерва на основании физиологических наблюдений, определен его симпатический компонент [38, 39, 40, 41]. Экспериментальная изолированная активация блуждающего нерва может сопровождаться тахикардией (Рисунок 1.) [42].

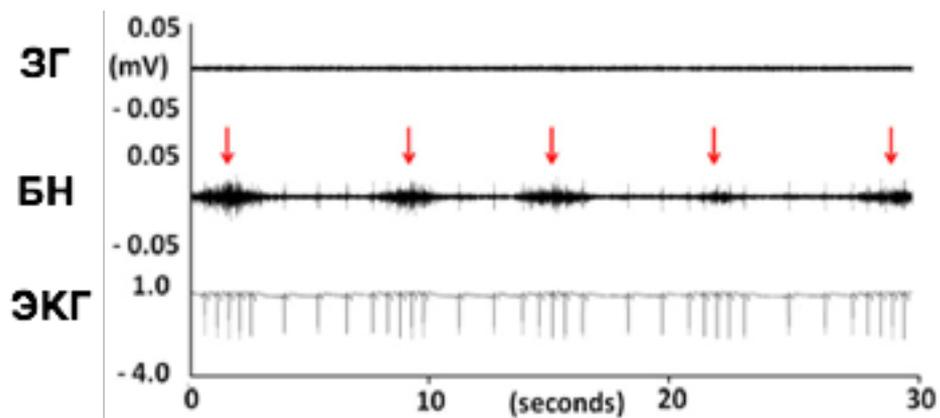


Рисунок 1. Изолированная активация блуждающего нерва, ассоциированная с ростом частоты сердечных сокращений. Электрическая активность ЗГ-звездчатый ганглий, БН – блуждающий нерв. ЭКГ – вариация частоты сердечных сокращений

Элементы интракардиальной нервной системы непосредственно вовлечены в аритмогенез. Проведенные гистологические исследования показали, что предсердия плотно иннервированы интракардиальной нервной системой, особенно в определенных областях левого предсердий (устья легочных вен), плотность расположения нервных элементов значительно выше с эпикардиальной поверхности чем с эндокардиальной [43]. Адренергические и

холинергические нервные элементы неразрывно со-расположены на всех тканевых и клеточных уровнях предсердия. Следует отметить, что значительная пропорция (более 30%) ганглионарных нервных клеток экспрессируют не определенный, а двойной - адрено-холинергический фенотип [44]. В связи с плотным и смешанным расположением элементов пара- и симпатической нервной системы в тканях предсердий, селективная элиминация той или иной системы методом радиочастотной абляции или их идентификация методом высокочастотной электростимуляцией технически не возможны.

Несмотря на сложную анатомию и физиологию взаимодействия между различными нервными элементами, в автономной нервной системе сердца постоянно происходят процессы ремоделирования, это особенно выражено в течение патологического процесса [45, 46, 47, 48, 49].

В эксперименте на животных показано, что усиление симпатической иннервации ассоциировано с увеличением числа и продолжительности инцидентов ФП. Эти работы показывают, что несмотря на ограничение денервации только областью желудочков, процесс ремоделирования нервных элементов отмечается по всему сердцу. Такие патологические процессы сердца, как инфаркт миокарда, могут потенциально увеличить нервную активность и соответственно запустить развитие как желудочковых, так и предсердных аритмий [44].

Патологическая иннервация АНС является ключевым механизмом в развитии ФП, что подтверждено как на экспериментальных моделях животных, так и клиническими электрофизиологическими исследованиями [50, 51, 52, 53, 54].

Отмечено, что у пациентов с длительно персистирующей формой ФП интенсивность симпатической иннервации значительно возрастает [55], хотя и другие патологические состояния (артериальная гипертензия, сердечная недостаточность, системные воспалительные процессы) могут так же стать причиной ремоделирования экстракардиальной нервной системы [56, 57].

Симпатическая нейротрансмиссия – результат возбуждения нервных

окончаний посредством передачи электрического импульса по эфферентным симпатическим нервам, расположенных в таких синаптических ганглиях, как звездчатый узел. Синтез, высвобождение, обратный захват и метаболизм синаптических нейротрансмиттеров чрезвычайно сложный и тонко регулируемый процесс. Количество норадреналина, который действует на постсинаптические адренергические рецепторы ограничено быстрыми механизмами обратного захвата, ферментным метаболизмом (моноаминоксидаза), отрицательной обратной связью, за счет пресинаптических α_2 -адренергических, допаминовых и мускариновых рецепторов [58]. Системная циркуляция адреналина, вырабатываемого мозговым веществом надпочечников, так же вносит свой вклад в сердечную симпатическую активацию, особенно в условиях генерализованной симпатической активации. Адренергический эффект кардиомиоцитов реализован за счет взаимодействия норадреналина с различными адренергическими рецепторами. ФП наиболее ассоциирована с активацией β -адренорецепторов, которые входят в состав огромного семейства трансмембранных G-протеин-связующих рецепторов и различаются тремя подтипами - β_{1-3} (β_1 больше всего ассоциирован с ФП).

В состав G-протеина β -адренорецепторов входит 3 субъединицы: α , β , и γ . $G\beta$ и $G\gamma$ субъединицы связаны друг с другом и часто отображаются как $G\beta\gamma$, третья субъединица $G\alpha$ существует в серии вариаций, однако, принципиально адренергической является стимулирующая субъединица ($G\alpha_s$). До воздействия норадреналина на β -адренорецепторы, большинство субъединиц $G\alpha_s$ связаны с $G\beta\gamma$, воздействие норадреналина на β -адренорецепторы приводит к диссоциации $G\beta\gamma$ - $G\alpha_s$ комплекса, свободная $G\alpha_s$ субъединица активирует аденилатциклазу, которая в свою очередь конвертирует АТФ в цАМФ. В свою очередь, цАМФ активирует протеин-киназу, фосфорилирующая мембранные белки, Ca^{2+} - транспортный белок, ионные каналы [59].

Ацетилхолин синтезируется в холенергических нервных окончаниях из холина и ацетилкоензим-А посредством действия ацетилтрансферазы, далее концентрируется и хранится в синаптических везикулах. Как и симпатические

нейротрансмиттеры, синтез и высвобождение ацетилхолина – высоко регулируемый процесс, подверженный отрицательной обратной связи через пресинаптические мускариновые рецепторы [60].

Высвобожденный ацетилхолин крайне быстро метаболизируется с помощью ацетилхолинэстеразы. Это происходит настолько быстро, что лимитирует зону и время воздействия ацетилхолина. Скорость метаболизма ацетилхолина обуславливает значительную локализованность его действия и гетерогенность эффекта, что объясняет развитие ФП при вагусной стимуляции.

Сердечные холинергическими рецепторы относятся к классу мускариновых подтип 2 (M_2 -рецепторы). M_2 -рецепторы так же, как и β -адренорецепторы связывают G-протеины, но с большой тропностью к ингибиторной $G\alpha_i$ субъединице ($G\alpha_i$). В отличие от адренергической активации, где активным компонентом выступает $G\alpha_s$ субъединица, холинергический эффект обусловлен активацией калиевых каналов при помощи $G\beta\gamma$ субъединиц. Активация калиевых каналов (I_{KACH}) является причиной тока ионов K^+ наружу в течение фазы деполяризации, что значительно сокращает время потенциала действия (ПД) мембраны кардиомиоцита [61].

Фибрилляция предсердий является следствием как фокусных, так и микроцентри механизмов аритмогенеза [62, 63]. Фокусный механизм осуществляется 2-мя путями: формирование триггера на чувствительном субстрате предсердий или формирование залповой-активности, которая в течении всего времени поддерживает ФП. Адренергическая активация способствует формированию обоих путей на клеточном уровне: фокальный, за счет усиления клеточного автоматизма (торможение тока калиевого канала I_{K1}), триггерный, за счет удлинение поздней постдеполяризации потенциала действия.

Точные механизмы формирования множественного микроцентри, такие как субстрат, количество петель, роль «роторов», остаются спорными [64], однако бесспорным остается тот факт, что сокращение рефрактерного периода приводит к формированию функционального реципрокного эффекта на всех

концептуальных моделях. Стимуляция блуждающего нерва значительно укорачивает рефрактерный период предсердий, путем усиления тока ионов калия через I_{KACH} – каналы, данное сокращение рефрактерного периода подвержено вариации (гетерогенности), в зависимости от расположения. Гетерогенность вагусной активации гораздо более выражена, чем при адренергическом эффекте, и лежит в основе вагус-индуцированной ФП [65].

Прямая запись активности автономной нервной системы доказывает ее непосредственную связь с аритмогенезом. Баррет с соавторами впервые провели непрерывную длительную запись нервной активности у экспериментальных животных [66].

Дальнейшие исследования показали, что активность звездчатого ганглия и блуждающего нерва усиливается при моделировании сердечной недостаточности путем повторяющейся индукции желудочковой тахикардии. Возрастающая нервная активность была непосредственно ассоциирована с развитием пароксизмальной предсердной тахикардии [67]. При прямой записи активности обеих систем, экстракардиальной (левый звездчатый ганглий, левый блуждающий нерв) и интракардиальной (левое верхнее и левое нижнее ганглинарное сплетение, связка Маршала), так же была выявлена непосредственная связь с индукцией ФП [65]. В связи с тем, что гистологические исследования показывают обширную ко-локализацию адренергических и холинергических нервных структур в интракардиальной системе [43], очевидно, что в патологический процесс формирования ФП вовлечены оба типа автономной нервной системы сердца.

1.2 Современные проблемы в хирургическом лечении фибрилляции предсердий

Фибрилляция предсердий (ФП) – одно из наиболее частых нарушений ритма сердца с преобладанием встречаемости у пожилых людей [68]. С учетом текущих демографических тенденций, влияние ФП на систему здравоохранения будет все

более и более обременительным [69]. ФП является прогрессирующим заболеванием, которое часто начинается с пароксизмальной формы и переходит в постоянную, с более длинными и частыми эпизодами, она вносит значительный вклад в заболеваемость и смертность, вызывая такие симптомы, как усталость, учащенное сердцебиение, одышка в различной степени тяжести, повышает риск развития инсульта, нейродегенеративных заболеваний, смерти [70, 71].

Существуют две основные стратегии лечения ФП: контроль ритма сердца, целью которого является восстановление и удержание синусового ритма, и контроль частоты сердечных сокращений (ЧСС) менее 100 ударов в минуту [72, 73]. Лечение «первой линии» по стратегии контроля ритма включает назначение антиаритмических лекарственных средств, с целью подавить возникновение ФП и ее прогрессию. Однако, открытие взаимосвязи фокусной активности в области устьев легочных вен и развития ФП, послужило основой для появления нового конкурентного метода лечения – интервенционной катетерной аблации [74].

Большое количество исследований показывают эффективность метода катетерной изоляции устьев легочных вен в уменьшении процента ФП от синусового ритма и ее симптоматичности [75, 76, 77, 78], причем частота успеха в лечении значительно выше при пароксизмальной форме, чем при персистентной [16]. Несмотря на показатель эффективности в отношении «свободы от аритмии», до сих пор нет доказательств преимуществ метода катетерной аблации в отношении «свободы от инсульта» и смертности [79, 80], что может быть связано с высоким риском перипроцедуральных осложнений, аблационными повреждениями эндокардиальной выстилки левого предсердия, последующим тромбообразованием, полного уничтожения одной из основных регулирующих систем сердца – автономной нервной системы.

В основные осложнения после процедуры интервенционной аблации левого предсердия включают: стеноз легочных вен, гемиперикард, плеврит, ятрогенные нарушения ритма сердца, осложнения, связанные с сосудистым доступом [81]. Международный клинический опрос, включающий 16309 пациентов, показал,

что серьезные осложнения возникают в 4,5% случаев, при этом смертность составляет 0,2% [82]. Мета-анализ исследований, посвященный длительному наблюдению (более 12 месяцев) за результатами катетерной аблации ФП, показал эффективность первичной хирургической процедуры всего 42% для персистирующей формы [83]. Анг с соавторами в своем мета-анализе показывает разброс данных по свободе от ФП в долгосрочном периоде наблюдения (12 месяцев) после катетерной аблации различных форм ФП от 16 до 89%, при этом осложнения достигают 9% [84].

1.3. Аблация автономной нервной системы

Появляется все больше подтверждений о решающей роли автономной нервной системе в развитии ФП. Как экспериментальные, так и клинические исследования продемонстрировали роль АНС в развитии триггерного механизма и альтерации предсердного рефрактерного периода [85, 86]. Рандомизированное исследование эффективности метода катетерной аблации АНС при наиболее тяжелой персистирующей форме ФП по сравнению с другими методами катетерной аблации, не учитывающих роль АНС, показало, что аблация ганглионарных сплетений (ГС) АНС левого предсердия, значительно повышает эффективность интервенционного лечения ФП [87]. Существует и критика данного метода: катетерная аблация зон ГС выполняется с эндокардиальной поверхности при их анатомическом эпикардиальном расположении, в связи с этим под сомнение попадает факт достоверно полного уничтожения функциональной нервной ткани АНС левого предсердия. Критерии интраоперационной оценки данного метода опираются на физиологический ответ (снижение частоты желудочковых сокращений, снижение артериального давления, признаки атриовентрикулярной блокады), во время эндокардиальной сверхчастой электростимуляции [88], и, хотя метод сопровождается клинической эффективностью, до сих пор не понятно, что происходит с данным физиологический ответом, как он коррелируется с ФП по истечению длительного времени.

Несколько исследований показывают эффективность «анатомического подхода» аблации ГС левого предсердия, без проведения сверхчастой электростимуляции для определения эндокардиальных проекций ГС, показатели успеха данной процедуры сопоставимы с эффективностью методик циркулярной изоляции легочных вен с более широкой линией изоляции [89, 87, 90]. Однако, нельзя не учитывать, что ГС левого предсердия является важным внутриорганным координирующим центром, полное уничтожение которого может потенциально приводить к неожиданным побочным явлениям. Описан клинический случай эндокардиальной и эпикардиальной радиочастотной вегетативной денервации при лечении пароксизмальной формы ФП, который в последующем осложнился гастропарезом [91]. Потенциально более серьезный эффект необратимого уничтожения основных нервных центров сердца связан с влиянием на желудочковую электрофизиологию. Несколько серий клинических работ, исследовавших пациентов с инфарктом миокарда, показали, что снижение variability частоты желудочковых сокращений является плохим прогностическим показателем в отношении смертности [92].

1.4. Селективная денервация при помощи ботулинического токсина серотип А в лечении нарушений ритма сердца

Ботулинический токсин - термолабильный токсин белковой природы, продуцируемый *Clostridium botulinum*, грамположительной спорообразующей бактерией, ингибирует выделение ацетилхолина в нервно-мышечном соединении и вызывает клиническое состояние, известное как ботулизм [93]. Клиническое использование ботулинического токсина началось с поиска альтернативы хирургическому лечению косоглазия. Алан Скотт, офтальмолог из США, исследовал различные соединения, путем экспериментальных инъекций в экстраокулярную мускулатуру, далее Эдвард Дж. Шанц предложил для этой цели использовать очищенный ботулинический токсин. Авторы обнаружили, что в экспериментах на животных инъекция ботулинического токсина приводит к долговременной, локализованной и дозозависимой мышечной слабости без

выраженной системной токсичности и некротизирующих эффектов [94].

Позже появились положительные результаты использования ботулинического токсина при таких состояниях, как мышечная дистония нижней челюсти и конечностей [95]. Наконец, в 1989 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США лицензировало производственное предприятие по изготовлению ботулинического токсина для терапевтического использования [96]. Первая партия ботулинического токсина типа А, произведенная Скоттом и Шанцем, была названа Oculinum®. Позже, в 1991 году завод и лицензия были переданы компании Allergan (США), препарат получил новое название Botox®.

Clostridium botulinum продуцируют различные серотипы токсинов, известны семь типов А-Г. Ботулизм вызван серотипами А, В, Е, F и потенциально G. Ботулинический токсин состоит из двух частей: тяжелая аминокислотная цепь и легкая аминокислотная цепь. Тяжелая цепь имеет молекулярную массу 100 Килодальтонов (кДа), а легкая цепь имеет молекулярную массу 50 кДа, обе цепи связаны дисульфидной связью. Различные препараты ботулинического токсина имеют разный молекулярный вес, от 300 до 900 кДа. Вес молекулярного комплекса ботулинического токсина может быть фактором, определяющим диффузию токсина из места его введения.

Используемый серотип ботулинического токсина является основным дифференцирующим фактором в терапевтическом применении, до настоящего времени коммерчески доступными были только серотип А и В, тип С и F были опробованы только на экспериментальных моделях. Биологическую активность ботулинического токсина измеряют с помощью единиц действия (ЕД). Одна единица соответствует средней летальной дозе (LD50) токсина, введенной в группу тестируемых лабораторных мышей. У разных препаратов токсина разные ЕД, например, 1ЕД препарата Ботокс приблизительно равна 3 ЕД препарата Диспорт [97]. Тип А в 10 раз токсичнее, чем тип С и в 20 раз типа В. Длительность эффекта ботулинического токсина тип F длится приблизительно 4–5 недель, тип В — 6 недель.

Механизм действия ботулинического токсина реализован через селективное связывание с гликопротеином нервного синапса, с последующим расщеплением различных белков транспортного каскада клетки (SNARE-белки) легкой цепью токсина [98]

Разные типы ботулинического токсина нацелены на специфические SNARE-белки, типы А, В и С связываются с белками SNAP-25, тогда как типы В, D и F связываются с мембранными белками VAMP [99, 100, 101, 102]. Временный эффект действия токсина объясняется, так называемым, процессом «прорастания», в ходе которого заблокированные токсином нейроны образуют новый синапс, заменяя исходные [103]. Действия ботулинического эффекта характеризуется дозо-зависимой корреляцией [104], после почти полного связывания с синаптическими нервными окончаниями очень небольшое количество ботулинического токсина может проникать в системное кровообращение [105], данное системное распространение токсина отличается у разных типов ботулинического токсина. Ботулинический токсин тип А обнаруживается системно только в очень высоких дозах, Ботулинический токсин тип В характерен более высоким системным распространением, чем Ботулинический токсин тип А, следовательно, побочные вегетативные эффекты возникают даже при небольшой дозе Ботулинического токсина тип В [106].

В последнее время в мировых публикациях появились работы, посвященные устранению нарушений сердечного ритма при помощи нейротоксина ботулина, однако эффект подавления индукции фибрилляции предсердий сохранялся не более чем 1 неделю [107]. Такой результат лечения аритмии не может считаться эффективным и подтверждает необходимость создания нового препарата, который мог бы эффективно применяться для лечения нарушений ритма сердца

В настоящее время наиболее часто применяется в клинической практике ботулинический токсин тип А. В клинической практике используется несколько препаратов на основе ботулотоксина типа А (Ботокс (Botox), Диспорт (Dysport),

Ксеомин (Xeomin), Лантокс (Lantox)). В ряде стран уже зарегистрирован широкий спектр применения этих препаратов, однако еще больший спектр применения ботулинического токсина не одобрен ввиду отсутствия [18].

В настоящий момент производители препаратов на основе ботулотоксина занимаются поиском стабилизирующих агентов, представляющих различные белки, аминокислоты, полисахариды и другие компоненты для повышения срока сохранности токсина, а также его эффективной доставки к органу-мишени.

Известны фармацевтические составы, включающие ботулинический токсин, выделенный из серотипов А, В, С, D, Е, F, G, С, полиаминокислоту, выбранную из группы полилизин, полиаргинин, полигистидин или полиорнитин (заявка RU 2011125775 А, оп.10.02.2013; патент RU 2407541 С2, оп. 27.12.2010); состав, включающий ботулотоксин типа А с дополнительными компонентами, как буфер рН, наполнитель, разбавитель, криопротекторное средство и/или стабилизатор, выбранный из группы гиалуроновая кислота, поливинилпирроллидон или полиэтиленгликоль (патент RU 2453333 С2, оп.20.06.2012). Недостатком данных составов является то, что они не обладают пролонгированным действием, не увеличивают терапевтический эффект.

Антиаритмические препараты характеризуются способностью подавлять аномальный автоматизм, проводимость и возбудимость миокарда. Несмотря на наличие большого количества антиаритмических лекарственных средств и методов хирургического лечения, поиск новых более эффективных и безопасных подходов в лечении этой грозной и одной из самых социально-значимых патологий остается высоко актуальным направлением научного поиска. 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. Современная классификация антиаритмических средств была предложена Е.М. Vaughan Williams в 1969 году и включает 4 класса. Поиск и доклиническое изучение потенциальных

антиаритмических средств условно разделены на несколько этапов [108]: первичный отбор и первичная оценка возможных механизмов действия соединений; изучение активности отобранных соединений на различных моделях нарушений сердечного ритма; изучение электрофизиологических механизмов, отобранных соединений в экспериментах. В соответствии с действующим рекомендациям по исследованию потенциально новых лекарственных средств и опытом новейших хирургических методов лечения нарушений ритма сердца, был разработан многокомпонентный дизайн (Рисунок 2.) экспериментального исследования Химической денервации сердца для устранения фибрилляции предсердий.



Рисунок 2. Дизайн экспериментального исследования

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА ТИПА А НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЯ РИТМА СЕРДЦА

2.1. Материал и методы исследования

2.1.1. Лабораторные животные

Лабораторные крысы были получены из SPF-вивария «Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск). Лабораторные кролики породы «Советская шиншилла» были получены из вивария ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область). Данные об использованных в эксперименте животных представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристика животных, использованных в эксперименте

Вид:	Rattus norvegicus	Oryctolagus sp.
Сток:	Wistar outbred	-
Пол:	Самцы	Самки
Статус здоровья:	СПФ	Конвенциональные
Возраст к началу исследования:	14-16 нед	4-5 мес.
Масса тела к началу исследования (средняя, min - max):	183 г (160 - 200)	2,9 кг (2,6-3,1)

Содержание животных в виварии ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России соответствует Приказу Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

2.1.2. Объект исследования

Готовая лекарственная форма представляет собой высокоочищенный ботулинический токсин типа А (ВТХ). Субстанция ВТХ (Таблица 2.) предназначена для изготовления лекарственного препарата для временного купирования нарушений ритма сердца в послеоперационном периоде, как дополнительный компонент терапии после хирургической абляции вегетативных ганглиев левого предсердия.

Таблица 2. Данные об исследуемом веществе

Название:	Ботулинический токсин типа А (Ксеомин)
Упаковка:	Флакон
Количественное содержание основного вещества:	100 ЕД активности ботулотоксина типа А в одном флаконе
Внешний вид:	Лиофилизат белого цвета
Температура кипения:	-
Плотность:	-
Изготовитель:	«Мерц Фарма», Германия
Срок годности:	3 года.

2.1.3. Экспериментальные модели

Экспериментальная работа осуществлялась согласно этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами («Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123» от 18 марта 1986 г. Страсбург, 1986; «Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации» № 267 от 19 июня 2003

г.). Исследования проводились согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств» [108]. Часть исследований на кроликах проводилась на бодрствующих животных, другая часть с применением наркоза. Для крыс использовали ингаляционную индукцию наркоза с переводом на внутривенный наркоз.

Для индукции наркоза животных помещали в наркотическую камеру с непрерывной подачей воздушно-газовой смеси с добавлением изофлюрана аппаратом Rodent Ventilator (Ugo Basil, Италия). Скорость испарения изофлюрана составляла 1 мл/мин. После наступления сна, животное извлекали из камеры и помещали на операционный стол, где крысам в хвостовую вену, а кроликам в ушную вену, устанавливали периферический катетер диаметром 24G, через который продолжали наркоз в поддерживающем режиме. Для поддерживающего наркоза внутривенно вводили 33 мг/кг раствора тиопентала натрия каждые 15-20 минут. Этот же катетер использовали для внутривенного введения других препаратов. Искусственную вентиляцию легких комнатным воздухом производили с помощью Rodent Ventilator через трубку диаметром 3 мм после наложения трахеостомии. Устанавливали периферические инвазивные электроды. Выполняли стандартный хирургический доступ к сердцу с выполнением срединной стернотомии. В ходе всего эксперимента во II стандартном отведении регистрировали ЭКГ с помощью аппарата Schiller AT-12 (Швейцария). Запись ЭКГ вели со скоростью 50 мм/сек.

Методика выполнения инъекции в жировую подушку предсердия

Для клинического изучения лекарственного препарата на основе субстанции ВТХ планируется инъекционный способ введения в жировую подушку, окружающую левое предсердие в месте впадения легочных вен, либо непосредственно в эпикард левого предсердия. Методики выполнения эпикардальной инъекции для крыс и кроликов принципиально не различались. (Рисунок 3.) Доступ к сердцу выполняли путем торакотомии с дальнейшей фиксацией тканей на держалках. После distraction тканей левого легкого в

сторону, визуализировали левое предсердие и производили инъекцию субстанции ВТХ инсулиновым шприцем с иглой 26G. Грудную клетку затем сводили, ушивали не рассасывающейся полипропиленовой нитью диаметром 4/0 с атравматической иглой, аспирировали пневмоторакс. В ходе всей операции производили мониторинг ЭКГ.

Если после введения субстанции ВТХ появлялись ЭКГ-признаки острого инфаркта миокарда, животное исключали из дальнейшего исследования.

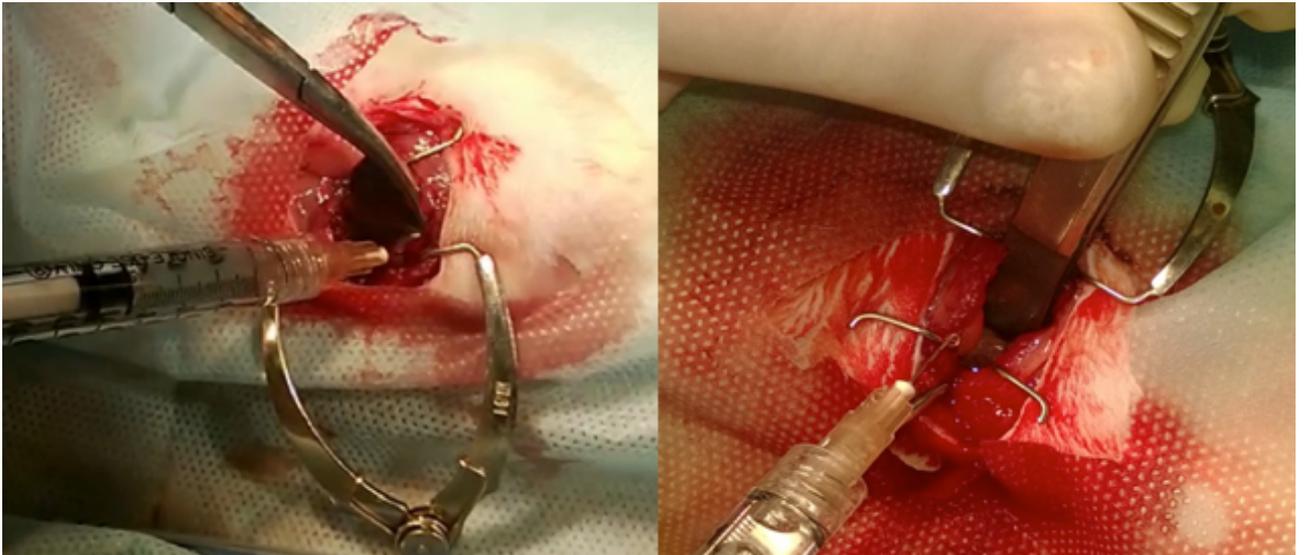


Рисунок 3. Инъекция раствора ботулинического токсина в жировую подушку крысы

Адреналиновой модель нарушения ритма сердца

Адреналиновая модель нарушений ритма сердца воспроизводит аритмогенный эффект, вызванный повышением активности симпатической иннервации и содержания катехоламинов. В ее основе лежит активация медленных трансмембранных кальциевых каналов, обусловленная возбуждением бета-адренорецепторов, что провоцирует усиление электрической активности водителей ритма 1, 2 и 3 порядка и формирование очагов эктопии. Поскольку адреналиновая модель нарушений сердечного ритма тесно связана с активностью вегетативной нервной системы и сложно поддается интерпретации, то эксперименты по изучению одной дозы ВТХ проводились в течение одного

дня. Первым этапом в ходе выполнения исследования подбирали дозу адреналина, вызывающую развитие у животных стойких нарушений ритма, для этого использовали 5 групп животных (крысы; Таблица 3).

Таблица 3. Распределение животных при подборе дозы адреналина

Номер группы	Доза адреналина (мкг/кг)	Объем введения (мл)	Количество животных
группа № 1	80	0,5	6
группа № 2	90	0,5	6
группа № 3	100	0,5	6
группа № 4	110	0,5	6
группа № 5	120	0,5	6

Дозу адреналина подбирали путем титрования, начиная с 80 мкг/кг и заканчивая 120 мкг/кг.

В ходе всей процедуры регистрировали ЭКГ через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 минут. Была определена минимальная доза адреналина 100 мкг/кг, которая у 100 % экспериментальных животных вызывала политопную желудочковую экстрасистолию, переходящую в фибрилляцию желудочков с летальным исходом в течение 5-10 минут.

В эксперименте испытывали внутривенный и эпикардальный (инъекции в жировые подушки предсердий) пути введения ВТХ. Для каждой дозы была использована группа из 10 животных. При последующей обработке, все данные были разделены на 2 подгруппы, согласно анализируемым признакам «Свобода от развития аритмии» и «Выживаемость», характеризующимися различной терапевтической жесткостью.

Внутривенное введение исследуемой субстанции на адреналиновой модели нарушения ритма сердца

Исследуемая субстанция ВТХ или референтные антиаритмические препараты

вводили внутривенно, за 20 минут до введения адреналина гидрохлорида. В качестве референтных препаратов использовали антиаритмические препараты II и IV классов (метопролол и верапамил) [19], в дозе, рекомендованной инструкцией по применению препарата. Показатели ЭКГ регистрировали в ходе всей процедуры: до и после введения исследуемой субстанции ВТХ или референтного антиаритмического препарата, во время инъекции адреналина гидрохлорида и далее через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 минут. Антиаритмический эффект субстанции ВТХ и референтных антиаритмических препаратов оценивали по их способности предупреждать развитие желудочковых нарушений ритма сердца и/или гибель животных от летальной фибрилляции желудочков. Животных распределяли следующим образом (Таблица 4.): при внутривенном введении субстанции ВТХ использовали дозы 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125 нг/кг, каждую дозу препарата использовали для введения группе из 10 животных. В качестве плацебо использовали группу животным, которым вместо ВТХ вводили 0,9 % раствор хлорида натрия (n=10). Дозы в группах Метопролола 0.25, 0.5, 2, 8, 20, 40 мг/кг. Дозы в группах Верапамила 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20 мг/кг.

Таблица 4. 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

Эффективную дозу ЭД₅₀ каждого препарата определяли пробит-анализом по методу Литчфилда [109] с помощью программного обеспечения «Sigma Plot» v.12.5. После испытания одинаковых для каждой группы доз определялась частота проявления заданного эффекта (отсутствие развития желудочковых

нарушений ритма) в группах, которая преобразуется в квантили нормального распределения (пробиты). Испытанные дозы и пробиты составляют совокупность исходных данных для построения функции эффективности. При расчете терапевтического индекса (ТИ) использовали значения 50 % летальной дозы (LD_{50}) заимствованные из специализированных литературных источников [110].

Эпикардальное введение исследуемой субстанции на адреналиновой модели нарушения ритма сердца

Эктопическое возбуждение миокарда, приводящее к развитию нарушений ритма сердца, зачастую, связано с деятельностью вегетативных ганглиев, расположенных в районе впадения легочных вен в правое предсердие [11].

Для определения эффективной дозы исследуемой субстанции и расчета ЭД₅₀ была использована методика эпикардальной инъекции ВТХ. Перед введением субстанцию ВТХ разводили 0,9 % раствором хлорида натрия так, чтобы объем инъекции составлял 0,1-0,2 мл, а желательнее было меньше. Использовались следующие дозы субстанции ВТХ при эпикардальном введении: 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125 нг/кг. Каждую дозу препарата использовали для введения группе из 10 животных. В качестве плацебо использовали группу животных, которым вместо ВТХ вводили 0,9 % раствор хлорида натрия (n=10).

Эффективность действия эпикардального метода введения субстанции ВТХ оценивали аналогично внутривенному методу.

Методика выполнения хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца

Хлорид-бариевая модель нарушений ритма сердца вызывает нарушения калиевой проводимости мембран кардиомиоцитов, поэтому используется для выявления веществ, обладающих свойствами антиаритмических препаратов III класса. Модель нарушения ритма воспроизводили внутривенным введением 2% раствора бария хлорида. Для приготовления стокового раствора в асептических

условиях навеску 2 г бария хлорида (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 100 мл воды для инъекций до момента исчезновения видимых включений, затем стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм (Millipore, США).

В качестве экспериментальных животных для выполнения хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца рекомендуется использовать кроликов [108]. Бодрствующим кроликам в ушную вену вводили раствор бария хлорида и регистрировали ЭКГ. Для дальнейшего исследования отбирали только тех животных, у которых в течение первых 15 минут возникало более 1 экстрасистолы. Для проведения исследований сначала определяли оптимальную дозу аритмогена, для чего использовали 4 группы животных (Таблица 5.).

Таблица 5. *Распределение кроликов при подборе дозы бария хлорида*

Номер группы	Доза бария хлорида (мг/кг)	Количество животных в группе	Развитие нарушений ритма, %
группа № 1	10	10	100
группа № 2	7,5	10	100
группа № 3	6	10	30
группа № 4	4	10	20

Дозу бария хлорида подбирали путем титрования, начиная с 10 мг/кг и заканчивая 4 мг/кг. ЭКГ регистрировали в течение 30 минут. Была определена минимальная доза бария хлорида (7,5 мг/кг), которая у всех экспериментальных животных вызывала многофокальные нарушения ритма. Далее в эксперименте использовали подобранную дозировку бария хлорида в качестве проаритмогенного соединения.

Внутривенное введение исследуемой субстанции на хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца

Спустя 7 дней после первичного отбора, животным в/в вводили аритмогенную дозу 2% раствора бария хлорида, затем через 2 минуты в/в вводили референтный антиаритмический препарат III класса (амиодарон) или исследуемую

субстанцию ВТХ в различной дозировке. При определении эффекта каждой изучаемой дозы препаратов животных распределяли следующим образом (табл. 6).

Таблица 6. *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 эпикардiallyно (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

Показатели ЭКГ регистрировали в ходе всей процедуры: до и после введения раствора бария хлорида, затем после введения исследуемой субстанции ВТХ или амиодарона, и далее через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 минут. Антиаритмический эффект субстанции ВТХ и амиодарона оценивали по их способности купировать нарушения ритма сердца в первые 20 минут после инъекции.

Эффективную дозу ЭД₅₀, ТИ определяли методом, описанным выше при исследовании адреналиновой модели нарушения ритма сердца.

Эпикардiallyное введение исследуемой субстанции на хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца

Для определения эффективной дозы исследуемой субстанции ВТХ и расчета ЭД₅₀ была использована методика эпикардiallyной инъекции. Перед введением субстанцию ВТХ разводили 0,9 % раствором хлорида натрия так, чтобы объем инъекции составлял 0,1-0,2 мл, а желательно был меньше. Применялись следующие дозировки субстанции ВТХ: 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 и 0.125 нг/кг. Каждую дозу препарата использовали для введения группе из 10 кроликов. Эффективность антиаритмического действия субстанции ВТХ оценивали по

тому, у какого процента животных прекращались нарушения ритма. Полученные данные были использованы для расчета ЭД₅₀.

Референтные антиаритмические препараты вводили внутривенно в дозе, рассчитанной на основании ранее проведенных экспериментов.

Методика выполнения аконитиновой модели нарушения ритма

Аконитин обладает способностью нарушать функциональную активность быстрых трансмембранных натриевых каналов и потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа [111]. Поэтому аконитиновая модель нарушений ритма сердца используется для фармакологической оценки антиаритмиков I класса. Аконитин является биологическим активным веществом, реакция животных на него индивидуальна и не стабильна. Поэтому экспериментальные и контрольные серии экспериментов с одной дозой антиаритмических препаратов проводили в один день.

Модель нарушения ритма воспроизводили внутривенным введением раствора аконитина. Для приготовления стокового раствора, навеску 20 мг аконитина (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 100 мл воды для инъекций содержащей 10% Твин-20 до момента исчезновения видимых включений, затем стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм (Millipore, США).

Для проведения эксперимента использовали дозу аконитина 40 мкг/кг, которая после внутривенного введения препарата у всех экспериментальных крыс вызывала смешанные предсердно-желудочковые нарушения ритма по типу экстрасистолии.

Исследуемый препарат ВТХ одной группе вводилась внутривенно, второй эпикардиально. Исследуемые препараты вводили за 2 минуты до введения аконитина. Распределение животных при определении эффекта каждой изучаемой дозы препаратов отражено в Таблице 7.

Таблица 7. 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 эпикардiallyно (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

Внутривенное введение исследуемой субстанции на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

Исследуемую субстанцию ВТХ или референтные антиаритмические препараты вводили внутривенно превентивно, за 2 минуты до введения аконитина. В качестве референтных препаратов использовали антиаритмические препараты IA, IB и IC классов (новокаинамид, лидокаин, этмозин) [19]. Антиаритмический эффект субстанции ВТХ и референтных антиаритмических препаратов оценивали по их способности предупреждать развитие нарушений ритма сердца. Показатели ЭКГ регистрировали в ходе всей процедуры: до и после введения исследуемой субстанции ВТХ или референтного антиаритмического препарата, во время инъекции аконитина, и далее через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 минут. Эффективную дозу ЭД₅₀, ТИ определяли методом, описанным выше при исследовании адреналиновой модели нарушения ритма сердца.

Эпикардiallyное введение исследуемой субстанции на аконитиновой модели нарушений ритма сердца

Для определения эффективной дозы исследуемой субстанции ВТХ и расчета ЭД₅₀ была использована методика эпикардальной инъекции. Перед введением субстанцию ВТХ разводили 0,9 % раствором хлорида натрия так, чтобы объем инъекции составлял 0,1-0,2 мл, а желательно был меньше. Используются следующие дозировки субстанции ВТХ: 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 и 0.125 нг/кг. Каждую дозу препарата использовали для введения группе из 10 крыс. Эффективность антиаритмического действия субстанции ВТХ оценивали по проценту группы животных, у которых прекращались нарушения ритма сердца. Полученные данные были использованы для расчета ЭД₅₀. Референтные антиаритмические препараты вводили внутривенно в дозе, рассчитанной на основании ранее проведенных экспериментов.

Эффективность действия ВТХ оценивали по тому, как животные переносили введение аконитина и вычисляли процент развития последовавших за этим аритмий. Полученные данные были использованы для расчета ЭД₅₀, ТИ.

2.2. Статистический анализ.

Все результаты выражены как среднее \pm стандартная ошибка. Для оценки достоверности различий между средними и долями при соответствии распределения вариантов закону нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента при значении $p=0,05$ и доверительном интервале - 95%. При межгрупповом сравнении различных препаратов и доз ботулинического токсина использовался тест Краскела-Уоллиса. Расчет ЭД₅₀ и ЛД₅₀ выполнялся методом пробит анализа. Статистические расчеты проводились с использованием версии программного обеспечения STATA 12.0 (Stata Corp, Texas, USA).

2.3. Результаты

2.3.1. Адреналиновая модель нарушения ритма сердца

Результаты внутривенного введения субстанции ВТХ в сравнении с референтными антиаритмическими препаратами

Внутривенное введение субстанции ВТХ во всем спектре исследуемых дозировок не оказывало влияния на динамику показателей ЭКГ. Более того, в дальнейшем, после введения этим животным расчетной дозы адреналина, все погибали от летальных желудочковых нарушений ритма. Применение терапевтических доз референтных антиаритмиков, а именно 5 мг/кг метопролола или 2 мг/кг верапамила, снижало выраженность нарушений ритма сердца у экспериментальных животных. Для проведения сравнительной оценки специфической фармакологической активности была проведена серия исследований и определены ЭД₅₀ и ТИ для референтных антиаритмических препаратов (Таблица 8.) при внутривенном введении. Полученные значения ЭД₅₀ значимо не отличались от данных, полученных ранее другими исследователями [112], что подтверждает валидность эксперимента.

Таблица 8. Данные фармакологической активности референтных антиаритмических препаратов

Препарат	ЭД ₅₀ , мг/кг (ср.±со)	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)	-		-	-

Таким образом, показано, что при внутривенном введении ВТХ на адреналиновой модели нарушений ритма не оказывает антиаритмического действия. Получено подтверждение, что для дальнейших исследований необходимо использовать эпикардальные инъекции в жировые подушки правого предсердия (Рисунок 4.).

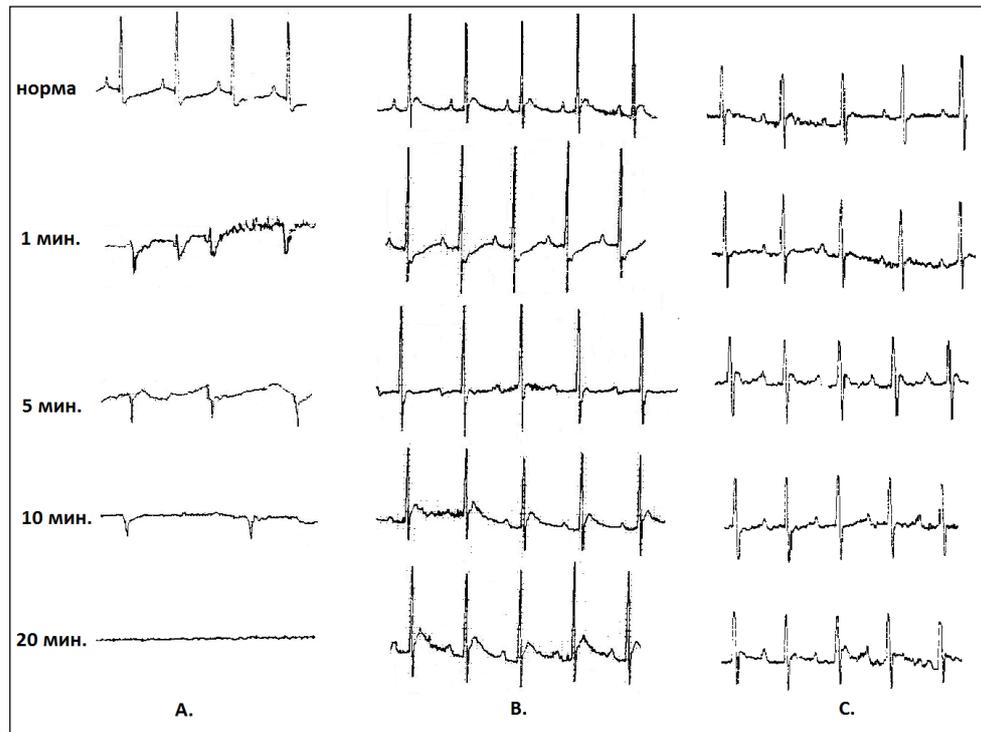


Рисунок 4. Динамика показателей ЭКГ при внутривенном введении референтных препаратов на адреналиновой модели нарушений ритма ($V=50$ мм/с), А – летальная фибрилляция желудочков, вызванная адреналином (в/в, 100 мкг/кг) после превентивного введения ВТХ (в/в, 0,25 нг/ кг); В – влияние адреналина на сердечную деятельность на фоне метопролола (в/в, 5 мг/кг); С - влияние адреналина на сердечную деятельность на фоне верапамила (в/в, 2 мг/кг)

Результаты исследования эффектов эпикардального введения субстанции ВТХ на адреналиновой модели нарушений ритма

При анализе результатов эпикардального введения ВТХ отмечался значимый эффект, более чем у 70% животных при использовании ВТХ в дозах превышающих 0,1 нг/кг (табл. 9; $p < 0,001$). В последующем все данные были разделены на 2 подгруппы, согласно анализируемым признакам «Свобода от развития аритмии» и «Выживаемость», характеризующимися различной терапевтической жесткостью. В результате чего появилась возможность рассчитать ЭД₅₀ ВТХ, которое либо препятствует появлению аритмии, либо предупреждает развитие летальной фибрилляции желудочков (табл. 10).

Таблица 9. Данные о переносимости адреналин-индуцированной фибрилляции

желудочков экспериментальными животными после введения субстанции ВТХ

Доза ВТХ, нг/кг	Выживаемость, %	Свобода от аритмии, %
0,0125	30	30
0,025	40	30
0,05	50	20
0,1	100	80
0,125	100	70
0,25	100	100

Группа «выживаемость» включает животных, не погибших от нарушений ритма. Это менее жесткий признак, и его значимость в основном проявляется только при описании достигнутого терапевтического индекса. В ходе выполнения исследований было отмечено, что при использовании субстанции ВТХ в дозах 0,1 нг/кг и выше у части животных после введения адреналина развивались нарушения ритма. Нарушения носили характер желудочковой экстрасистолии и изменений предсердно-желудочковой проводимости, которые к концу периода наблюдения, через 20-30 минут, исчезали.

Группа «Свобода от аритмии» включает животных, у которых после имплантации соединения ВТХ вообще не возникло нарушений ритма сердца. Данный признак характеризуется, как более жесткий, поскольку включает не только выживших животных, но и животных, без осложнений, перенесших модель фибрилляции желудочков, вызванной адреналином. Было отмечено, что для получения достоверных различий с предыдущей группой, необходимо было использовать дозу препарата в 2,5 раза выше.

Тем не менее необходимо сделать вывод о том, что статистически значимый эффект достигался у более чем 70 % животных при использовании ВТХ в дозах, превышающих 0,1 нг/кг (Рисунок 5.).

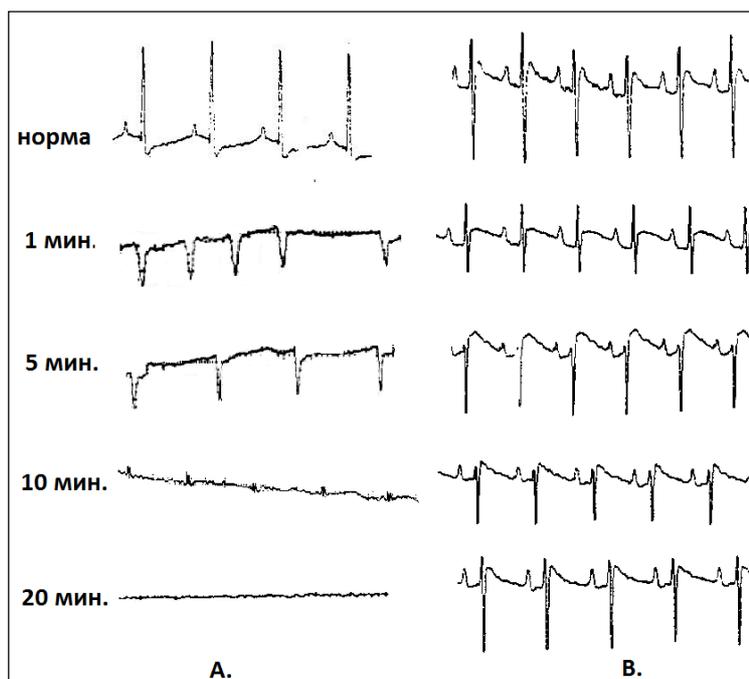


Рисунок 5. Влияние субстанции ВТХ на фибрилляцию желудочков сердца, вызванную внутривенным введением адреналина ($V=50$ мм/с), А – фибрилляция желудочков, вызванная адреналином (в/в, 100мкг/кг); В – влияние адреналина на сердечную деятельность спустя 20 минут после имплантации соединения ВТХ (эпикардальная инъекция, 0,1 нг/кг)

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что субстанция ВТХ обладает признаками и свойствами антиаритмических препаратов II и IV классов. При использовании наиболее жесткого критерия «свобода от развития аритмии» по величине терапевтического индекса соединение ВТХ, уступает метопрололу в 1,3 раза, но превосходит верапамил в 2,5 раза. А при анализе результатов по критерию «выживаемость» исследуемое соединение по величине ТИ превосходит оба референтных препарата в 1,2 и 3,9 раза соответственно (Таблица 10.).

Таблица 10. Данные фармакологической активности эпикардального введения ВТХ

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

2.3.2. Хлорид-бариевая модель нарушения ритма сердца

Результаты внутривенного введения субстанции ВТХ на хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца

Внутривенное введение расчетной дозы бария хлорида и последующее за этим введение субстанции ВТХ не вызывало прекращения нарушений ритма сердца вне зависимости от дозы препарата (Рисунок 6.).

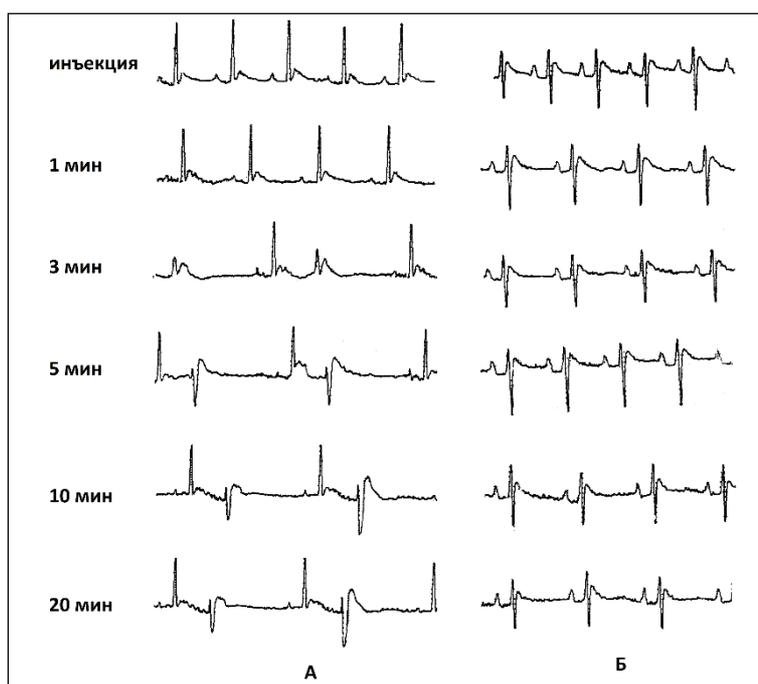


Рисунок 6. Динамика показателей ЭКГ при внутривенном введении препаратов на хлорид-бариевой модели нарушений ритма у кроликов. А-развитие нарушений ритма на фоне субстанции ВТХ (в/в, 0,25 нг/кг); Б-сохранение ритма на фоне амиодарона (в/в, 5 мг/кг)

Внутривенное введение антиаритмического препарата III класса амиодарона в минимальной терапевтической дозах 2,5 мг/кг и выше позволяло сохранить нормальную структуру сердечного ритма. На основании данных, полученных в экспериментальных исследованиях, были рассчитаны ЭД₅₀ и терапевтический индекс амиодарона (Таблица 11.).

Результаты эпикардиального введения субстанции ВТХ на хлорид-бариевой модели нарушения ритма сердца

При применении метода эпикардиальной инъекции препарата установлено, что

ВТХ обладает антиаритмическим действием, значимый эффект достигнут у 80% животных при использовании ВТХ в дозе 0,1 нг/кг ($p < 0,001$), Рассчитанная средняя эффективная доза ВТХ, при которой наблюдался антиаритмический эффект, для кроликов составила $0,05 \pm 0,003$ нг/кг (Рисунок 7.).

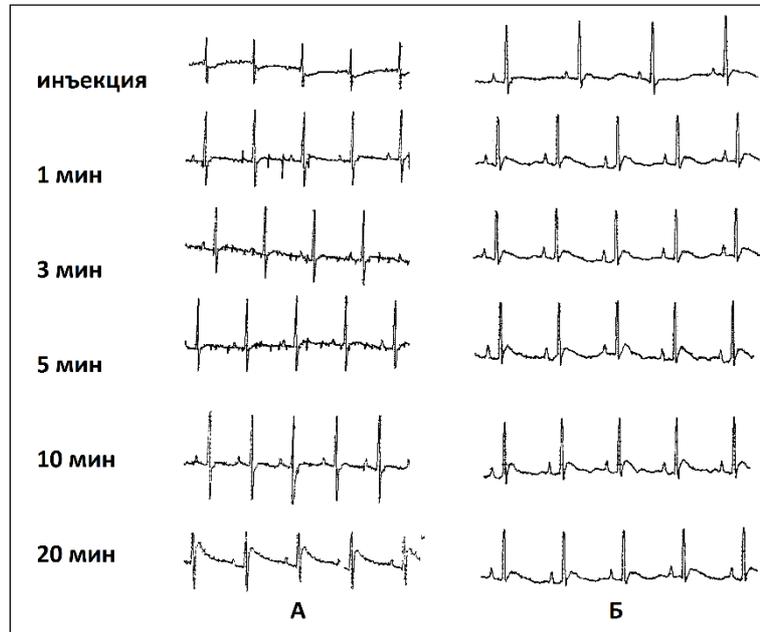


Рисунок 7. Сохранение сердечного ритма при эпикардальном введении субстанции ВТХ на хлорид-бариевой модели нарушений ритма. А-ЭКГ крысы в динамике на фоне субстанции ВТХ (доза 0,1 нг/кг); Б-ЭКГ кролика в динамике на фоне субстанции ВТХ (доза 0,005 нг/кг)

Терапевтический индекс исследуемой субстанции ВТХ уступает референтному антиаритмику амиодарону в 1,32 раза в исследованиях на кроликах, и в 1,27 раза в исследованиях на крысах. Данные фармакологической активности приведены в таблице 11. Значения ЭД₅₀ для амиодарона коррелировали с данными, полученными ранее другими исследователями [113]. Значения 50 % летальной дозы ЛД₅₀ для расчета терапевтического индекса получены из литературных источников [110].

Таблица 11. 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 эпикардiallyно (нг/кг)	0,050±0,016	0,018; 0,081	0,7	14
ВТХ в/в (нг/кг)	-		-	-

Таким образом, при проведении экспериментальных исследований специфической фармакологической активности установлено, что на хлорид-бариевой модели нарушений ритма соединение ВТХ при внутривенном введении не оказывает антиаритмического действия. При эпикардiallyной инъекции соединение ВТХ предотвращало развитие нарушений ритма, равно как и референтный антиаритмический препарат III класса амиодарон.

2.3.3. Аконициновая модель нарушения ритма сердца

Результаты внутривенного введения субстанции ВТХ на аконициновой модели нарушения ритма сердца

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 нейротоксином (угнетение сердечной деятельности, непредсказуемые приходящие нарушения внутрисердечной проводимости, сердечного ритма и т.д).

Напротив, применение референтных антиаритмических препаратов I класса позволяло эффективно предупреждать политопную экстрасистолию. На

основании результатов по выживаемости экспериментальных животных, полученных на этом этапе исследований, были рассчитаны значения ЭД₅₀ и терапевтический индекс для новокаинамида, лидокаина и этмозина (Таблица 12.).

Таблица 12. Данные фармакологической активности антиаритмических препаратов I класса на аконитиновой модели нарушений ритма

Препарат	ЭД ₅₀ , сред.±co	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 эпикардiallyно (нг/кг)	-		-	-
ВТХ в/в (нг/кг)	-		-	-

Результаты эпикардiallyного введения субстанции ВТХ на аконитиновой модели нарушения ритма сердца

Субстанция ВТХ во всех исследуемых дозировках не проявила антиаритмического действия при использовании метода эпикардiallyной инъекции на аконитиновой модели аритмии. Увеличение дозы субстанции ВТХ до 5 нг/кг также не приводило к появлению антиаритмического эффекта (Рисунок 8.).

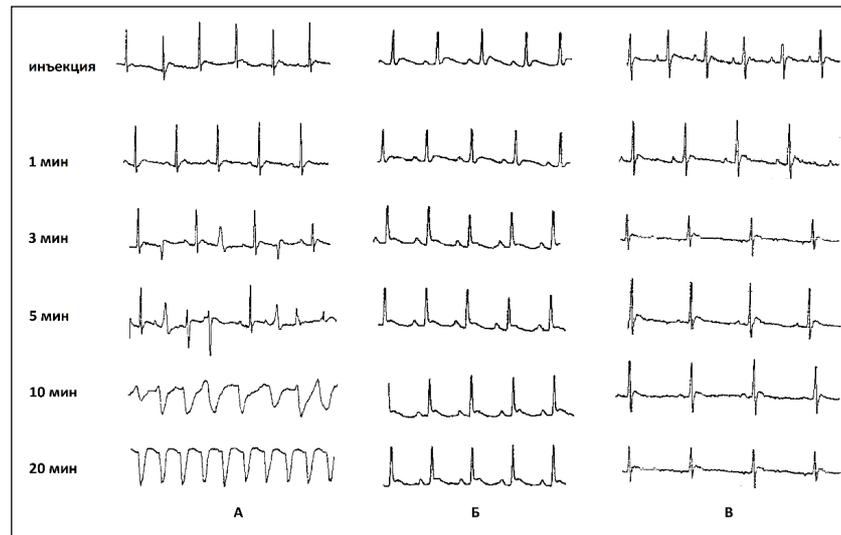


Рисунок 8. *Динамика ЭКГ при эпикардальном введении субстанции ВТХ в сравнении с референтными антиаритмическими препаратами после инъекции аконитина, А – развитие фибрилляции желудочков на фоне субстанции ВТХ (5 нг/кг); Б – сохранение ритма на фоне новокаинамида (в/в, 10 мг/кг); В – сохранение ритма на фоне лидокаина (в/в, 8 мг/кг)*

Полученный результат, по всей видимости, можно объяснить следующим образом. Аконитин способен взаимодействовать с потенциал-зависимыми натриевыми каналами. Эти каналы являются белками в клеточных мембранах возбуждаемых тканей, таких как сердечные и скелетные мышцы, и нейроны. В кардиомиоцитах они очень быстро открываются, приводя к деполяризации клеточной мембраны, вызывая увеличение потенциала действия. Натриевые каналы очень быстро закрываются, однако при деполяризации мембранного потенциала наблюдается открытие (активация) калиевых каналов и выброс калия, что приводит к реполяризации мембранного потенциала. Аконитин вызывает замедление процессов реполяризации за счет инактивации натриевых каналов. Мембрана остается деполяризованной благодаря постоянному инфлюксу натрия. При перегрузке ионами натрия активируется натрий-кальциевый обмен, клетка перегружается ионами кальция, которые затем поступают в саркоплазматический ретикулум. В дальнейшем излишки ионов кальция выбрасываются из саркоплазматического ретикулума в цитоплазму кардиомиоцита, что приводит к активации токов входящего направления и

развитию экстрвозбуждения [114].

В нейронах аконитин увеличивает проницаемость мембраны к ионам натрия, что приводит к большому инфлюксу натрия в терминале аксона. В результате этого происходит быстрая деполяризация мембраны. При этом быстро возрастает проницаемость мембраны к ионам калия, приводя к рефлюксу калия и высвобождению положительного заряда из клетки. В результате деполяризации мембраны увеличивается проницаемость не только к ионам калия, но и к ионам кальция. Происходит приток кальция, что стимулирует высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель. Таким образом, создается новый потенциал действия, и происходит запуск дополнительного сигнала к сокращению кардиомиоцитов [115].

Механизм нарушения ботулотоксином нервно-мышечной передачи заключается в блокировании белка SNAP-25, отвечающего за присоединение внутриклеточных везикул с ацетилхолином к пресинаптической мембране. В результате прерывается экскреция ацетилхолина и, в итоге, нарушается процесс передачи потенциала действия. Эпикаридальная инъекция субстанции ВТХ направлена на купирование всех потенциалов действия, которые генерируются в зоне впадения легочных вен в левое предсердие. Таким образом происходит предупреждение развития нарушений ритма сердца.

Поэтому, именно вследствие локальности антиаритмического действия, исследуемая субстанция ВТХ не способна предотвратить генерализованные нарушения сердечного ритма, которые вызываются внутривенной инъекцией аконитина. Прицельная инъекция субстанции ВТХ в предсердие направлена на изоляцию эктопических очагов электрического возбуждения, что очень важно при профилактике послеоперационных аритмий, которые являются следствием хирургических вмешательств на миокарде. Модель нарушений ритма, вызванных внутривенной инъекцией аконитина, вызывает возникновение и усиление активности очагов электрической активности во всех отделах сердца одновременно, что сводит к нулю локальный антиаритмический эффект ВТХ.

2.4. 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 нейротоксином (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.

**ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО
ТОКСИНА ТИПА А НА МОДЕЛИ КРУПНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ПРИ
ЭПИКАРДИАЛЬНОМ И ЭНДОКАРДИАЛЬНОМ МЕТОДАХ
ВВЕДЕНИЯ**

*3.1. Эпикардальная денервация автономной нервной системы левого
предсердия в целях лечения и профилактики фибрилляции предсердий*

3.1.1. Материалы и методы

Исследование выполнено в соответствии стандарта «Надлежащей лабораторной практики». Эксперимент проведен на 30 лабораторных мини-свиньях типа Минисибс (самцы, возраст 3-4 мес, масса 15-20 кг), полученных из Института цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирск. Содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Доступ к ганглионарным вегетативным нервным сплетениям левого предсердия осуществлялся через последовательную двухстороннюю боковую торакотомию, под общей анестезией с использованием пентобарбитала, непрерывного мониторингования ЭКГ, прямого артериального давления и температуры тела.

Животных рандомизировали на две экспериментальные группы (Рисунок 9.).

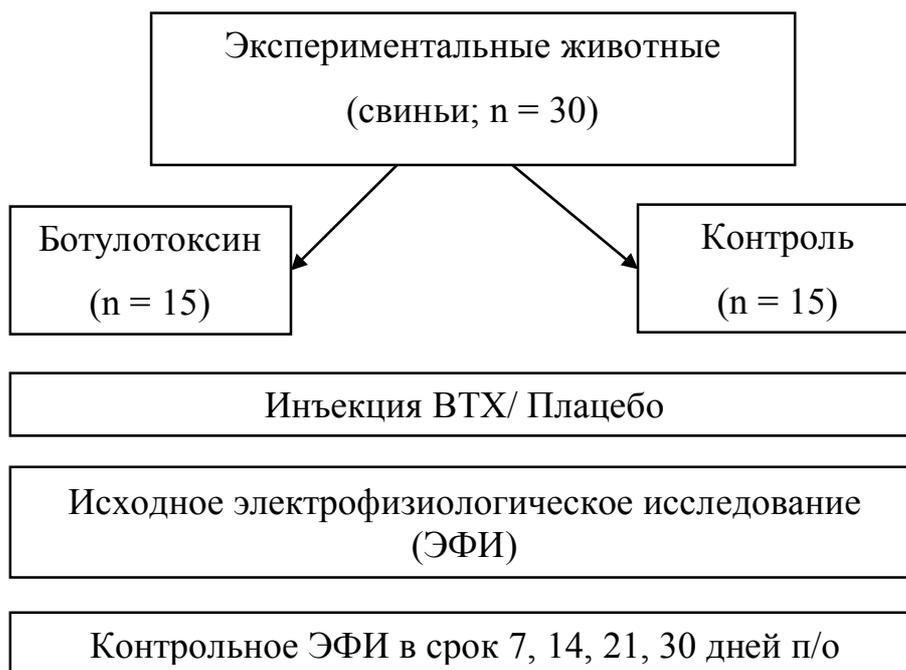


Рисунок 9. Дизайн исследования метода эпикардиальной денервация автономной нервной системы левого предсердия

Группа Ботулотоксин (n=15) – эпикардиально в жировые подушки области впадения правых верхнедолевой и нижнедолевой легочных вен (проекция правых вегетативных ганглионарных сплетений сердца), левой верхнедолевой легочной вены с переходом на зону связки Маршала (проекция левых вегетативных ганглионарных сплетений сердца) вводили препарат Ботулотксин тип А (Ксеомин, Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Германия) в объеме 4 мл (200ЕД) по 1 мл в каждую проекцию ганглионарного сплетения (Рисунок 10.). Эпикардиальные инъекции выполнялись стандартным инсулиновым шприцем по 3-4 вкола (0,3-0,25 мл) на одну проекцию сплетения. Вкол иглы шприца выполнялся в 2 этапа: первый - вкол под 45° к поверхности на 1-2 мм, второй – продвижение иглы на 2 мм параллельно поверхности предсердия. Инъекции выполнялись в шахматном порядке, на дистанции 3-5 мм от предыдущего вкола для достижения максимально гомогенной инфильтрации.

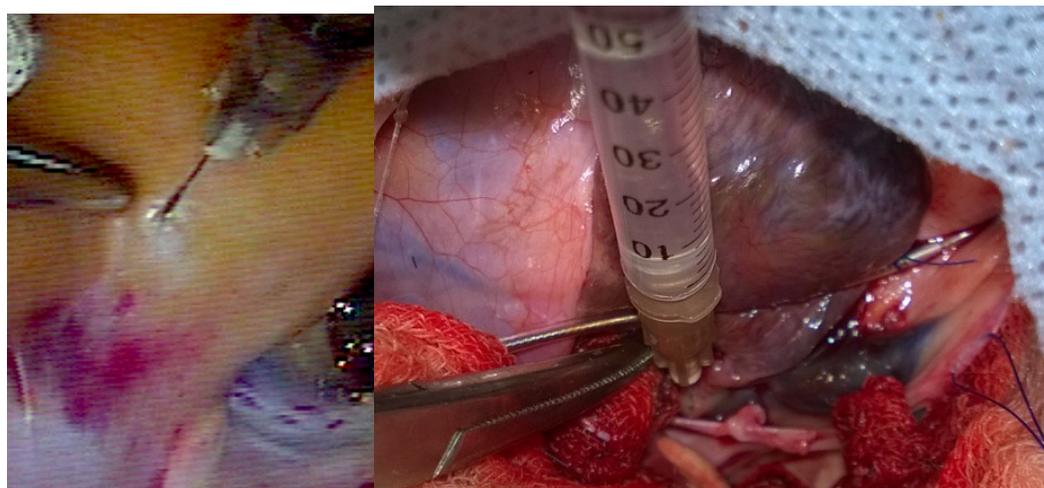


Рисунок 10. Инъекция раствора ботулинического токсина в жировую подушку области устья верхней правой легочной вены

Группе Контроля (n=15) в аналогичные зоны вводился 0,9% раствор натрия хлорид в объеме 4 мл, по 1 мл в каждую проекцию ганглионарного сплетения вышеописанным методом. Перед процедурой инъекции эпикардиально в область впадения правых и левых легочных вен подшивались 2 временных четырех-полюсных электрода для проведения контрольного электрофизиологического исследования, фиксация производилась одиночными узловыми швами удаленно от проекций ганглионарных сплетений (Рисунок 11.).

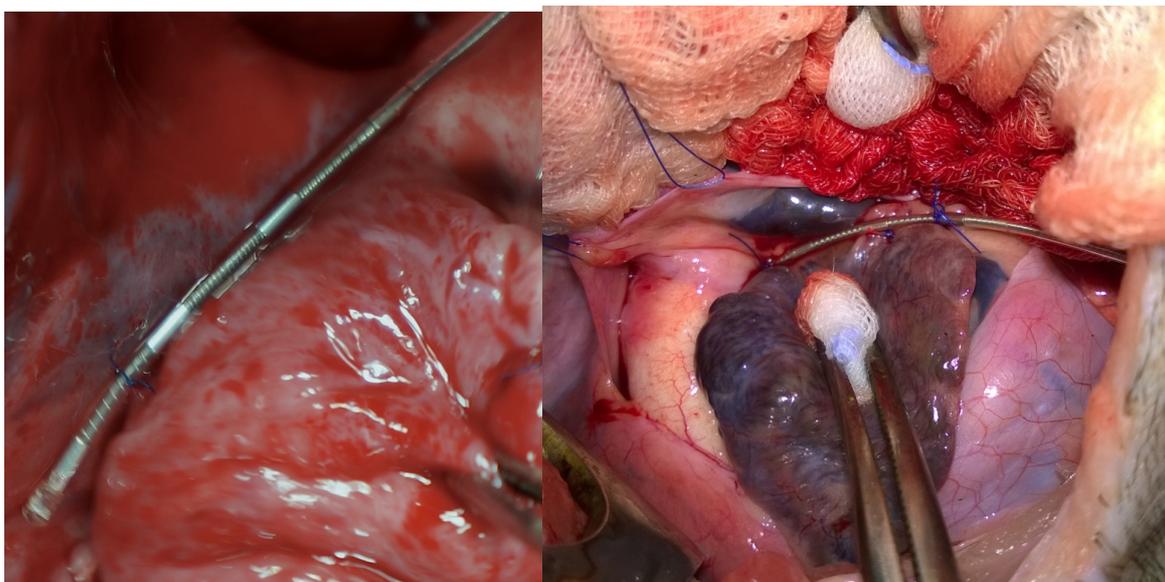


Рисунок 11. Временный эпикардиальный электрод для контрольного электрофизиологического исследования в области устья левых легочных вен

Учитывая, что эффект ботулинического токсина наступает в течение 24 - 48 часов после введения, в качестве сроков наблюдения были выбраны следующие точки: исходно, 7, 14, 21, 30 дней. В качестве оценки безопасности выбраны оценка витальных функций животного, учет осложнений и нежелательных явлений, оценка эхокардиографических параметров, маркеров кардиотоксичности (Тропонин I и Креатинфосфокиназа-МВ периферической крови). В критерии эффективности включены оценка эффективного рефрактерного периода (ЭРП) миокарда левого предсердия до и после вагосимпатической стимуляции, и степень индукции ФП. Вагосимпатическая стимуляция осуществлялась при помощи временного эпикардального электрода, фиксированного на шее в области правого сосудисто-нервного пучка. Параметры высокочастотной стимуляции: частота - 20 Гц, длительность импульса 0.1 мс, с возрастающей силой тока (0.5-8.0V). Сила тока, изменяющая ЧСС на 50% от исходного использовалась во всех последующих электрофизиологических измерений.

Электрофизиологические измерения выполнялись при помощи программируемого электрокардиостимулятора (Медтроник, Миннеаполис, США). Протокол измерения ЭРП: длина цикла базальной стимуляции (S1-S1) – 400 мс; экстрастимул (S1-S2) начинался с 200 мс и уменьшался с каждым шагом на 5 мс до исчезновения предсердного захвата. Измерения ЭРП выполнялось в каждом из 4-х отведений двух временных электродов, соответствующих определенной проекции основных ганглионарных сплетений АНС левого предсердия (верхнее и нижняя правые – R1-R4, верхняя и нижнее левые L1-L4). Степень индукции ФП оценивалась с помощью частой предсердной стимуляции (200 импульсов, длина цикла S-S=50 мс, амплитуда стимуляции – в два раза превышающая исходный порог электрического захвата), тест выполнялся дважды с каждого отведения эпикардальных электродов и рассчитывался по формуле ФП инд.= число попыток/количество индуцированных эпизодов ФП x 100%. На каждый индуцированный эпизод ФП при отсутствии самостоятельного восстановления наносилась электрокардиоверсия с минимальной энергией

шокового разряда.

3.1.2. Статистический анализ

Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение или как абсолютные значения и проценты. Количественные данные сравнивались с помощью t-критерий Стьюдента. Качественные признаки сравнивались на основании метода χ^2 . Сравнение изменение среднего ЭРП в ответ на вагосимпатическую стимуляцию и степени индукции ФП выполнялся методом сравнения площади под кривой. Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Все статистические расчеты проводились с использованием версии программного обеспечения STATA 12.1 (Stata Corp, Texas, USA).

3.1.3. 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 было последовательно дополнено до целевого значения по 15 в каждой группе (всего 30), путем проведения дополнительной части экспериментальной работы.

Эффективный рефрактерный период предсердий

Эпикардиальные инъекции Ботулинического токсина в основные ганглионарные сплетения АНС привели к значительному удлинению и уменьшению гетерогенности ЭРП во всех точках периода наблюдения (Рисунок 12.). Исходное среднее ЭРП (среднее по всем точкам измерения) ЛП группы Ботулотоксина составило 121 ± 8 мс, что значимо не отличалось от группы Контроля $123 \pm 9,6$ мс ($p=0.27$). После выполнения высокочастотной стимуляции правого вагосимпатического ствола отмечалось исходное укорочение среднего ЭРП в обеих группах, $27,2 \pm 10,7\%$ и $30,0 \pm 9,2\%$ соответственно ($p=0.27$). При контрольном электрофизиологическом исследовании, начиная с 7 дня после процедуры инъекции в группе ботулотоксина отмечалась статистически значимая разница в укорочении ЭРП после вагосимпатической стимуляции, $7.1 \pm 4.9\%$ ($p=0.04$; между группами; $p=0.001$ от исходного); на последний 30 день периода наблюдения разница в укорочении среднего ЭРП осталась статистически значимой ($12.4 \pm 3.5\%$ и $31,2 \pm 5,6\%$; $p < 0,001$).

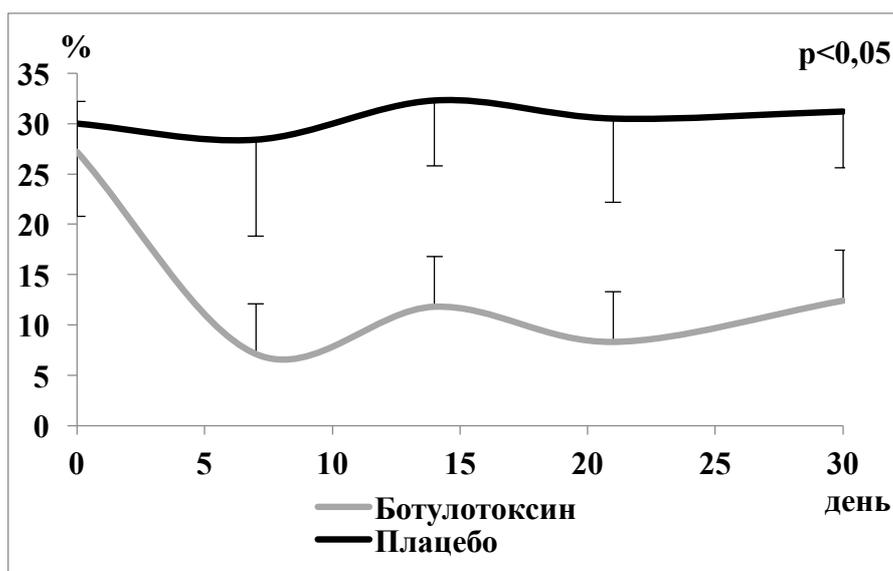


Рисунок 12. Изменение среднего ЭРП в ответ на вагосимпатическую стимуляцию

Степень индукции фибрилляции предсердий

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; Рисунок 13.); на 14 день $22 \pm 9,8\%$ ($p<0.001$); на 30 день составила $41 \pm 11,4\%$ ($p<0.001$).

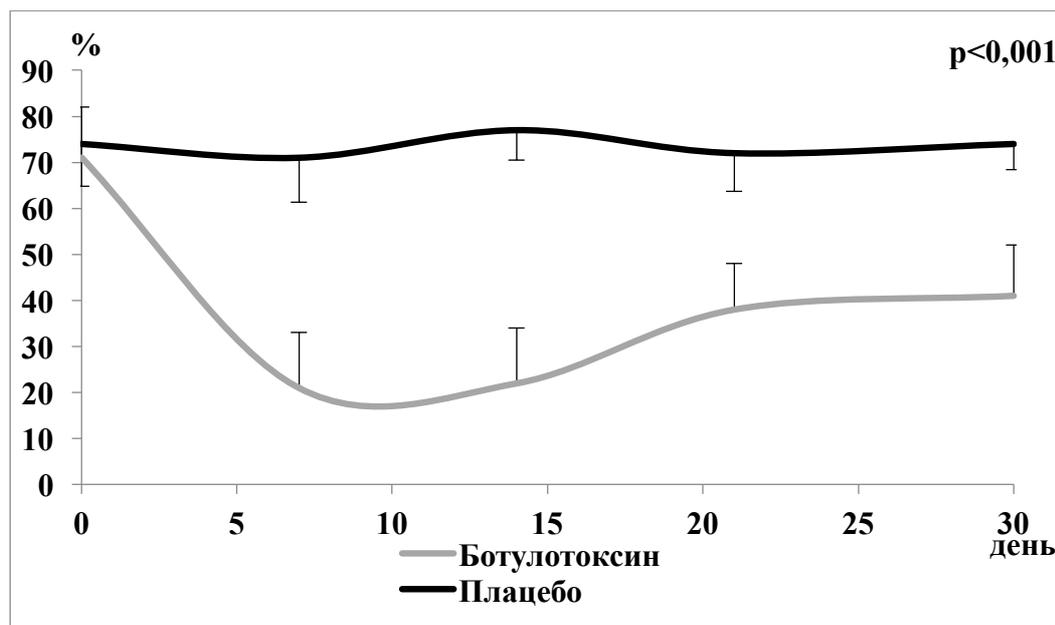


Рисунок 13. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий

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

3.2.1. Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии стандартам «Надлежащей лабораторной практики». В эксперимент были включены двадцать четыре беспородные собаки весом 20-25 кг. Выбор собак в качестве экспериментальных животных связан с технической сложностью выполнения пункции межпредсердной перегородки у свиней для эндокардиального доступа в левое предсердие. Анестезиологическое обеспечение - общий наркоз фенобарбиталом натрия, интубационная вентиляция легких воздухом, мониторинг ЭКГ для

контроля частоты сердечных сокращений и ритма. Мониторинг артериального давления происходил через датчик, установленный в правой бедренной артерии. Температура тела поддерживалась на уровне $36.5^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. Все физиологические данные отображались на системе непрерывного мониторинга Philips v26 (Philips Medical Systems GmbH, Bieblingen, Germany)

Вегетативная стимуляция

Выделялся правый шейный вагосимпатический ствол. Вагосимпатическая стимуляция (ВС) проводилась электродами из нержавеющей стали (Medtronic, Minneapolis, MN) с проведением высокочастотной электростимуляции (сигнал прямоугольной формы, 20 Гц, продолжительность 0.1 мс, возрастающим напряжением 0.5-8.0 В) с помощью специализированного электрофизиологического стимулятора (Б-53, Биоток, Россия). В ходе эксперимента за базовое значение параметров вегетативной стимуляции использовалось исходное напряжение стимула снижающее частоту сердечных сокращений на 50%.

Хирургический доступ и инъекции ботулотоксина

Двадцать четыре собаки были рандомизированы на 3 группы (Рисунок 14.):

1. Эндокардиальный доступ для инъекции ботулотоксина в эпикардиальные жировые подушки и левопредсердные интрамиокардиальные ганглионарные сплетения (группа исследования; n=8).
2. Эндокардиальный доступ для инъекции плацебо в эпикардиальные жировые подушки и левопредсердные интрамиокардиальные ганглионарные сплетения (группа контроля 1; n=8).
Та же техника, что и в группе 1, но вместо инъекций ботулотоксина вводилось плацебо (0.9% хлорид натрия).
3. Эпикардиальный доступ для инъекции ботулотоксина в эпикардиальные жировые подушки (группа контроля 2; n=8).



Рисунок 14. Дизайн исследования метода эндокардиальных инъекций ботулинического токсина

Все процедуры проводились с использованием интервенционных техник под рентгенконтролем ангиографической установки (GE, США). 3D - анатомические карты левого предсердия в реальном времени строились с использованием цифровой электрофизиологической системы картирования (CARTO, Biosense-Webster Inc., Diamond Bar, США). Электрофизиологические исследования выполнялись с помощью двух типов электродов. Десятиполюсный электрод для коронарного синуса устанавливался через правую наружную яремную вену с помощью обычного внутривенного интродьюсера. Картирующий электрод доставлялся через правую бедренную вену. Доступ в левое предсердие (ЛП) осуществлялся способом трансептальной пункции.

Точная локализация ГС достигалась транскатетерной высокочастотной стимуляцией (ВЧС). Параметры стимуляции: частота 20 Гц; длительность каждого стимулы 0.1 мс; вольтаж 0.5-8.0 В. Данное напряжение ВЧС индуцировало прогрессирующее замедление синусового ритма или предсердно-желудочкового проведения (АВ-проведения) во время ФП. ВЧС проводилась в 3 зонах ГС: зона ППГС (расположена между каудальной частью синусового узла и устьем правой верхней лёгочной вены), зона НПГС (расположена между нижней полой веной и устьем правой нижней лёгочной вены), зона ВЛГС (расположена между ушком левого предсердия и устьем левой верхней лёгочной

вены). Все зоны были зафиксированы на трёхмерных электрофизиологических картах (Рисунок 15.) [116, 117].

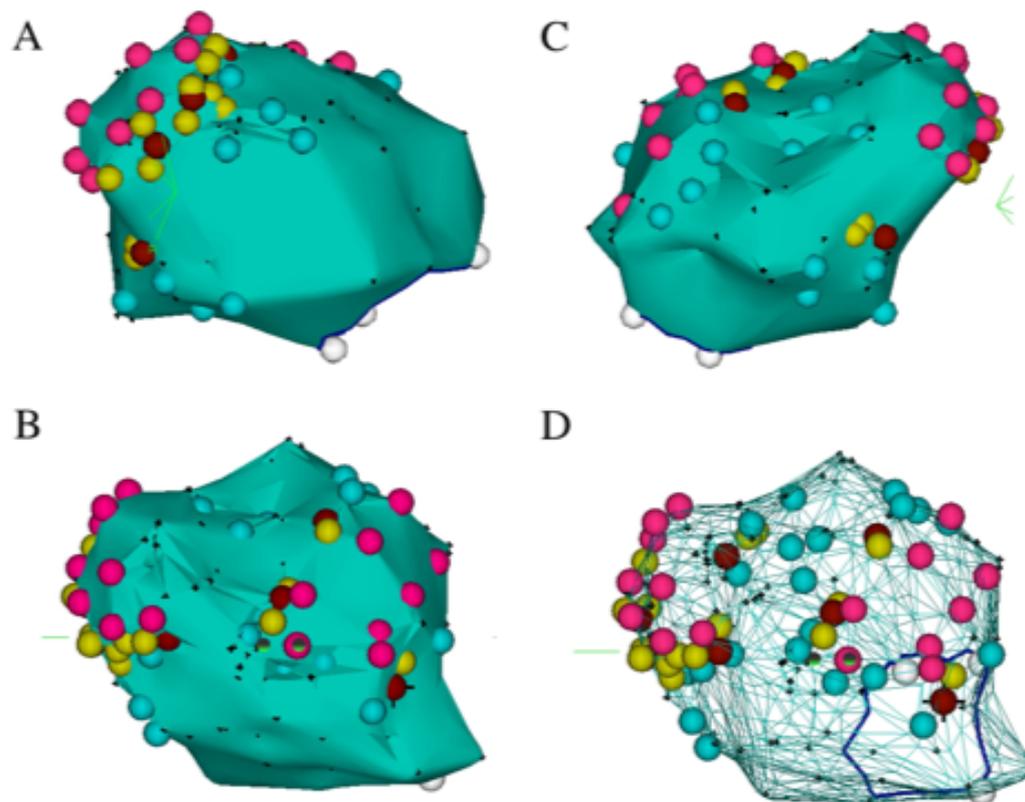
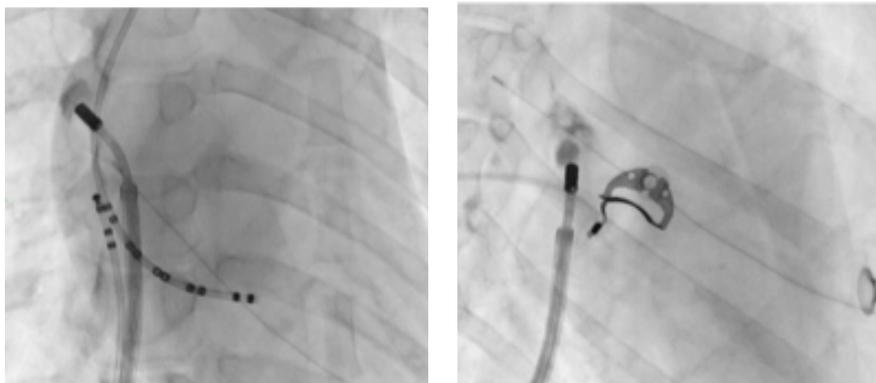


Рисунок 15. Передний (А), верхний (В) и задний (С) вид левого предсердия; верхний вид, в виде сетки (D). На картах розовые 2-мм точки отображают устья лёгочных вен, белые 2-мм точки отображают кольцо митрального клапана, жёлтые 2-мм точки отображают зоны высокочастотной стимуляции с положительным вагусным ответом, голубые точки – зоны с отрицательным вагусным ответом. Тёмно-бордовые 2-мм точки отображают участки интрамиокардиальных инъекций ботулотоксина

Инъекции выполнялись в зонах, с положительным вагусным ответом на транскатетерную ВЧС. В соответствующую зону трансэндокардиально вводился ботулинический токсин (Xeomin, incobotulinumtoxin A, Merz Pharma GmbH & Co KGaA, Германия; 10 Ед/0.2 мл) при помощи эндомиокардиального инъекционного катетера (MyoStar, Biosense-Webster Inc., Diamond Bar, США). Непосредственно перед инъекцией катетер позиционировался перпендикулярно эндокардиальной поверхности ЛП, подтверждение соответствующей стабильности осуществлялось рентгеноскопически, для непосредственного вкола из кончика катетера выдвигалась игла на длину 1.5 - 2 мм. После введения

иглы, перед введением ботулинического токсина эндокардиальным способом, в целях более точного позиционирования, первоначально вводился 0,5 мл рентгенконтрастного препарата (Йопромид). Критерием точного внутритканевого позиционирования являлось наличие гомогенного рентгенконтрастного облака до 5 мм в диаметре. Наличие серповидной рентгенконтрастной полоски вдоль контура предсердия означало внутриперикардальное положение иглы. Для каждой зоны положительного вагусного ответа выполнялась одна инъекция. Дополнительно к описанным зонам, эндокардиальным способом, токсин вводили в каждую из трёх эпикардиальных жировых подушек (по 50 Ед/1 мл в подушку). Визуализация жировых подушек осуществлялась непосредственно перед инъекцией ботулотоксина эмпирическим введением рентгенконтраста в соответствующие участки (Рисунок 16.).



А

В

С

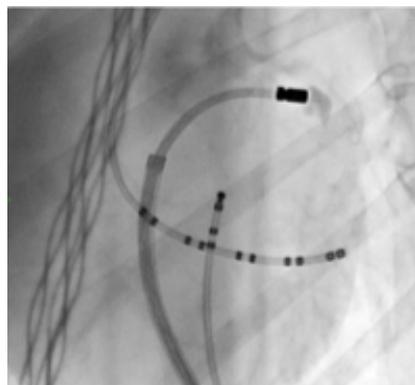


Рисунок 16. Инъекции контраста в эпикардиальные жировые подушки, содержащие верхние правые (А), нижние правые (В) и верхние левые ГС (С)

Правый торакотомный доступ в 4-ом межреберье использовался для визуализации жировых подушек, содержащих ППГС и НПГС. Левая торакотомия в 4-ом межреберье - ВЛГС. Точная локализация ГС оценивалась транскатетерной ВЧС с помощью биполярного электрода (Atricure, Inc., США; частота 20 Гц; длительность стимула 0.1 мс; вольтаж 0.5-8.0 В). Инъекции ботулинического токсина выполнялись с помощью обычного инсулинового шприца (1 мл) в каждую зону с положительным вагусным ответом на ВЧС (10 Ед/0.2 мл на зону) и, дополнительно, по 50 Ед/1 мл в каждую из трех основных жировых подушек ЛП. Инъекции осуществлялись в два этапа: первый этап – пункция иглой под углом 45 градусов относительно эпикардиальной поверхности жировых подушек на глубину 1-2 мм; далее, вторым этапом, игла вводилась на 2 мм вглубь и параллельно поверхности жировой подушки. После позиционирования иглы жировая ткань инфильтрировалась раствором объёмом 0.2 мл. Зона инфильтрация имела отличительный беловатый цвет, чёткие границы с диаметром 5-6 мм. Для полного покрытия поверхности жировой подушки требовалось от 3 до 5 зон инфильтрации.

Программная стимуляция

Учитывая, что эффект ботулотоксина начинается через 24-48 часов, были определены следующие даты периода наблюдения: исходно (до инъекций ботулинического токсина), через 7, 14, 30 и 90 дней после инъекций. Электрофизиологические измерения выполнялись при помощи программируемого электрокардиостимулятора (Медтроник, Миннеаполис, США). в целях измерения эффективного рефрактерного периода (ЭРП) и степени индукции ФП. Параметры предсердной стимуляции соответствовали удвоенному значению порогу «электрического захвата» предсердий.

Протокол измерения ЭРП: базальная длина цикла стимуляции (S1-S1) - 400 мс. Интервал сцепления S1-S2 начинался с 200 мс и градиентно уменьшался шагом в 5 мс до прекращения предсердного захвата. При программной стимуляции устьев ЛВ кончик электрофизиологического катетера располагался на венозной

стороне. Предсердный ЭРП измерялся в ушках правого и левого предсердия.

Степень индукции ФП оценивалась частой электростимуляцией в 200 импульсов с длиной цикла в 50 мс, которая выполнялась 4 раза (2 для стимуляции свободной стенки правого предсердия и 2 для стимуляции свободной стенки левого предсердия) каждому животному в течение вагосимпатической стимуляции. Эпизод ФП определялся как нерегулярный предсердный ритм с частотой более 500 ударов в минуту с нерегулярным предсердно-желудочковым проведением продолжительностью более 5 секунд. Спонтанная ФП с продолжительностью более 30 секунд после прекращения частой стимуляции считалась устойчивой. Частота устойчивой ФП, выраженная в процентах от общего числа попыток индуцировать ФП, была определена, как степень индукции ФП.

3.2.2. Статистический анализ

Расчет объема выборки в каждой группе выполнялся на основе предыдущих работ, для обеспечения минимальной 80% мощности исследования. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение или как абсолютные значения и проценты. Количественные данные сравнивались с помощью t-критерий Стьюдента. Качественные признаки сравнивались на основании метода χ^2 . Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Все статистические расчеты проводились с использованием версии программного обеспечения STATA 12.1 (Stata Corp, Texas, USA).

3.2.3. 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 контраста 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 17.).

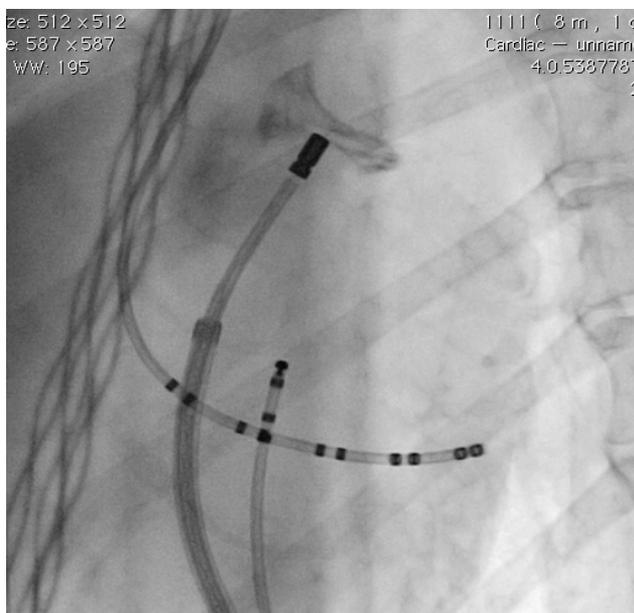


Рисунок 17. Инъекции контраста в эпикардиальные жировые подушки, перфорация иглы эндомиокардиального катетера в полость перикарда

Влияние на синусовый и АВ-узел

Вагосимпатическая стимуляция (ВС) достоверно замедляла, как синусовый ритм, так и частоту желудочковых сокращений во всех группах до процедуры инъекций ($p < 0.001$ для всех групп; рис. 18). После эндокардиальных инъекций ботулинического токсина эффект замедления синусового ритма и частоты желудочковых сокращений в ответ на вагосимпатическую стимуляцию стал менее выраженным, (рис. 19) чем в группе эпикардиальной инъекции: исходно -

46.3 ± 6.7% (p<0.001) и 51.5 ± 5.8% (p<0.001); на 7 сутки - 14.4 ± 9.6% (p=0.003; p<0.001 в сравнении с исходными данными) и 18.8 ± 7.2% (p<0.001; p<0.001 в сравнении с исходными данными); на 14 сутки - 16.2 ± 7.3% (p<0.001; p<0.001 в сравнении с исходными данными) и 15.9 ± 6.7% (p<0.001; p<0.001 в сравнении с исходными данными); через 1 месяц - 32.5 ± 14.2% (p<0.001; p=0.026 в сравнении с исходными данными) и 37.8 ± 14.3% (p<0.001; p=0.018 в сравнении с исходными данными); через 3 месяца - 37.1 ± 8.9% (p<0.001; p=0.035 в сравнении с исходными данными) и 51.5 ± 5.8% (p<0.001; p=0.49 в сравнении с исходными данными). Статистически значимой разницы между группами ботулинотоксических инъекций не выявлено (p>0.05 для всех контрольных точек). В группе плацебо степень замедления синусового ритма и частоты желудочковых сокращений в ответ на ВС оставался неизменным на протяжении всего периода наблюдения (p>0.05 в сравнении с исходными данными).

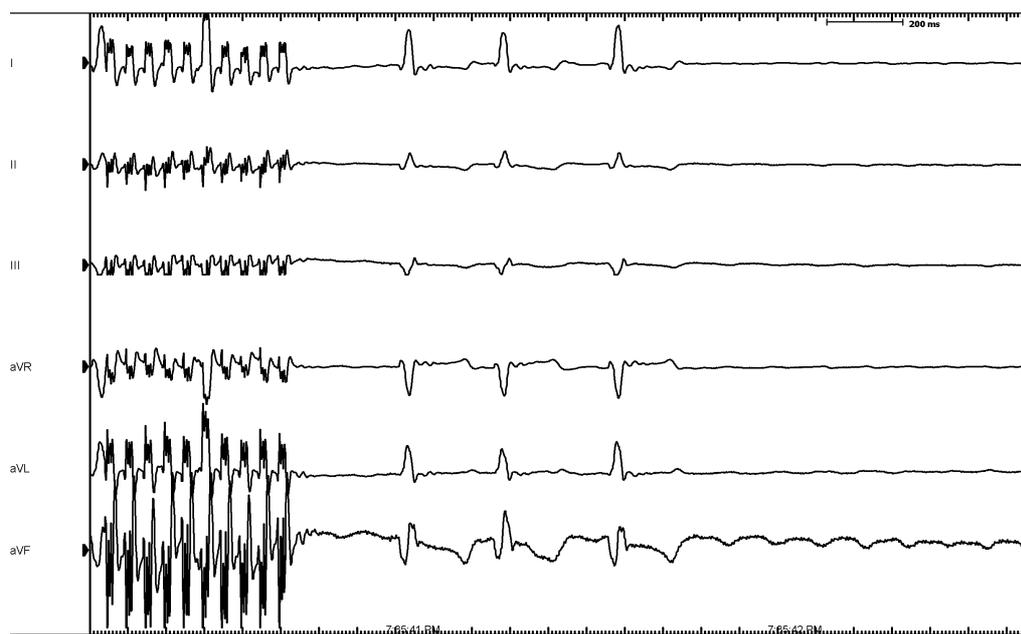


Рисунок 18. Эндограмма высокочастотной электрокардиостимуляции эндокардиальной проекции ганглионарного сплетения левого предсердия собаки (до инъекции ботулинотоксина). Зафиксирован момент положительного вагусного ответа вплоть до асистолии

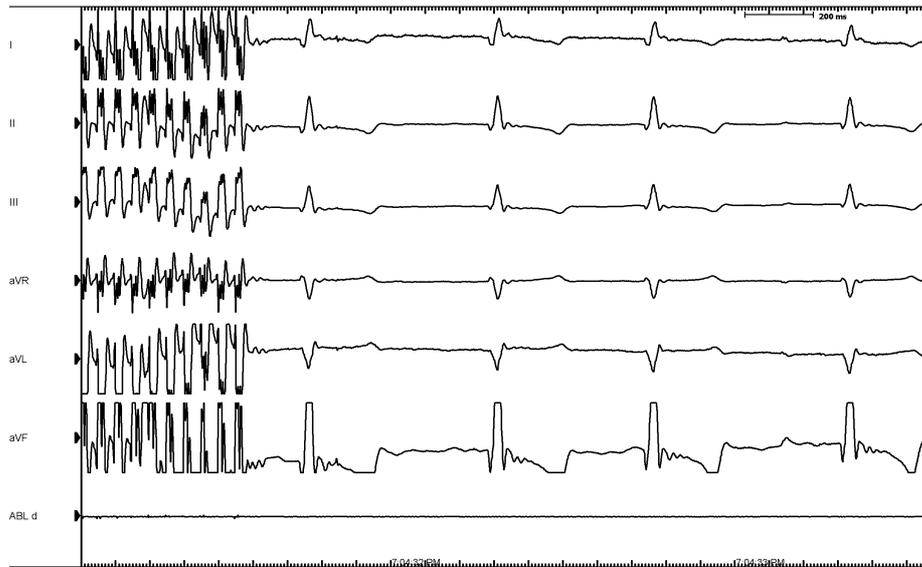


Рисунок 19. Эндোগрамма высокочастотной электрокардиостимуляции эндокардиальной проекции ганглионарного сплетения левого предсердия собаки (после инъекции ботулинического токсина). Отсутствие эффекта положительного вагусного ответа, невозможность индуцировать ФП

Изменение предсердного эффективного рефрактерного периода

Эндокардиальные инъекции ботулотоксина привели к значительному удлинению ЭРП во всех зонах измерения ЛП как в сравнении с исходным уровнем, так и в сравнении с плацебо (Рисунок 20.).

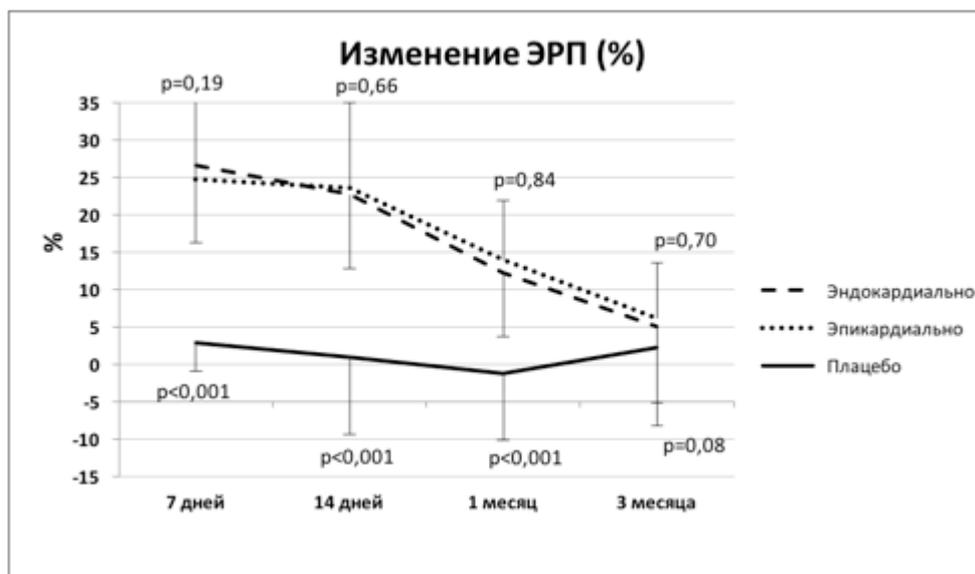


Рисунок 20. Изменение среднего значения эффективного рефрактерного периода (ЭРП) в ответ на высокочастотную стимуляцию блуждающего нерва после эндокардиальных, эпикардиальных инъекций ботулинического токсина, инъекции плацебо

Усреднённые значения удлинения ЭРП обобщенной группы инъекции ботулинического токсина представлены в таблице 13. Исходной разницы между группами ботулинотоксических инъекций не выявлено ($p > 0.05$ для контрольных точек). В группе плацебо ЭРП оставался неизменным на протяжении всего периода наблюдения ($p > 0.05$ в сравнении с исходными данными).

Вагосимпатическая стимуляция укоротила ЭРП во всех группах, но после инъекций ботулотоксина это укорочение было менее выраженным.

Разницы между группами инъекции ботулинического токсина не выявлено ($p > 0.05$ для всех контрольных точек). В группе плацебо уровень укорочения ЭРП за счет ВС был неизменным на протяжении всего периода наблюдения ($p > 0.05$ в сравнении с исходными данными; $p < 0.001$ в сравнении с группами ботулинотоксических инъекций на 7, 14 сутки наблюдения для всех зон измерения).

Таблица 13. Процент изменение ЭРП группы инъекции ботулинического токсина до и после вагосимпатической стимуляции

	Исх.	7 сутки			14 сутки			1 месяц			3 месяца		
	ВС после инъекций БТХ	Инъекции БТХ	ВС после инъекций БТХ	р-значение	Инъекции БТ	ВС после инъекций БТ	р-значение	Инъекции БТ	ВС после инъекций БТ	р-значение	Инъекции БТ	ВС после инъекций БТ	р-значение
ПВЛВ	31.3 ± 9.7%*	17.2 ± 4.6%*	12.4 ± 3.5% ^у	<0.001	14.1 ± 6.1% ^у	7.9 ± 4.1% ^у	<0.001	11.1 ± 6.7% ^у	10.8 ± 7.6%*	<0.001	1.9 ± 3.6% ^у	27.4 ± 12.5%*	0.49
ПНЛВ	27.1 ± 13.2%*	18.8 ± 9.7%*	7.1 ± 4.9% ^у	0.001	15.6 ± 11.4% ^у	8.7 ± 3.0% ^у	0.002	13.9 ± 13.1% ^у	22.8 ± 7.0%*	0.43	4.3 ± 5.9% ^у	27.6 ± 11.4%*	0.93
ЛВЛВ	16.6 ± 9.4% ^у	31.7 ± 12.3%*	6.3 ± 5.6% ^у	0.02	28.8 ± 13.8%*	5.7 ± 6.6% ^у	0.02	24.8 ± 17.2%*	9.3 ± 4.9%*	0.07	19.7 ± 19.8% ^у	20.6 ± 5.3%*	0.31
ЛНЛВ	13.8 ± 6.4%*	28.1 ± 9.7%*	5.7 ± 3.2% ^у	0.006	28.0 ± 9.7%*	5.7 ± 3.1% ^у	0.006	17.5 ± 10.5%*	14.7 ± 6.3%*	0.77	1.1 ± 14.3% ^у	11.1 ± 10.8% ^у	0.54

УЛП	17.8 ± 16.6%*	44.1 ± 22.1%*	8.6 ± 0.5% ^γ	0.14	36.9 ± 14.5% *	14.9 ± 6.0%*	0.65	3.5 ± 6.4% ^γ	20.8 ± 7.8%*	0.68	1.6 ± 5.3% ^γ	17.8 ± 16.6% *	0.48
УПП	24.4 ± 12.5%*	19.4 ± 16.5%*	9.3 ± 5.4%*	0.008	12.8 ± 12.9% ^γ	17.0 ± 5.9%*	0.15	2.4 ± 4.5% ^γ	23.7 ± 12.3%*	0.61	1.8 ± 5.1% ^γ	24.3 ± 12.5% *	0.72

* - $p < 0.005$ по отношению к исходным значениям

^γ - $p > 0.005$ по отношению к исходным значениям

Степень индукции фибрилляции предсердий

Подавление степени индукции ФП наблюдалось на 7 сутки после эндокардиальных инъекций ботулотоксина: на 7 сутки - 57% ($p < 0.001$ в сравнении с группой плацебо; $p < 0.001$ в сравнении с исходными данными); на 14 сутки - 61% ($p < 0.001$ в сравнении с группой плацебо; $p < 0.001$ в сравнении с исходными данными); через 1 месяц - 38% ($p < 0.001$ в сравнении с группой плацебо; $p < 0.001$ в сравнении с исходными данными); через 3 месяца - 23% ($p = 0.003$; $p = 0.06$ в сравнении с исходными данными; Рисунок 21.).

Разницы между группами ботулинотоксических инъекций не выявлено ($p > 0.05$ для всех контрольных точек). Эффект подавления ФП исчез через 3 месяца. В группе плацебо уровень степени индукции ФП был неизменным на протяжении всего периода наблюдения ($p > 0.05$ в сравнении с исходными данными).

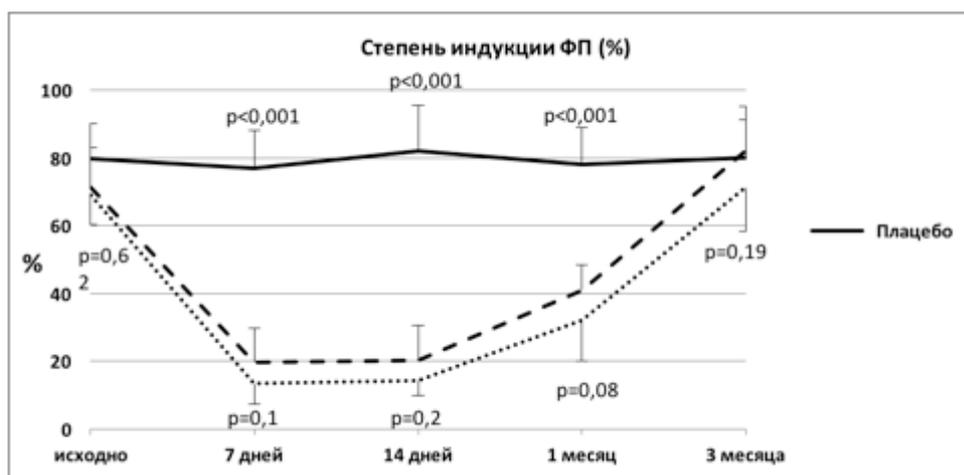


Рисунок 21. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий в ответ на эндокардиальные, эпикардиальные инъекции ботулотоксина и инъекции плацебо

3.3. Заключение

- Эпикардальные 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 эпикардальные жировые подушки практически осуществим, безопасен, обеспечивает полное устранение предсердного вегетативного влияния и достоверно снижает уязвимость к ФП в течение 3 месяцев периода наблюдения.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА ТИПА А ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНЕРВАЦИИ СЕРДЦА

4.1. Введение

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. Учитывая цель, в данном экспериментальном исследовании были поставлены следующие задачи: выбрать оптимальные комплекс-образующие компоненты состава на основе ботулотоксина, сравнить специфическую активность и длительность действия данных составов.

4.2. Материалы и методы

4.2.1. Оптимальный состав

Для достижения продолжительного высвобождения действующего вещества обычно применяют полимерные составы с различными физическими свойствами. Ранее были разработаны успешно действующие препараты на основе полимерных систем длительного высвобождения. Такие системы длительного высвобождения оказались чрезвычайно эффективными при использовании относительно гидрофобных и нерастворимых в воде лекарственных средств [118, 119]. Однако вследствие быстрой диффузии водорастворимого действующего вещества через полимерные матрицы оказалось затруднительным достичь продолжительности высвобождения. Таким образом, существует потребность в новых составах и способах, которые могли бы понизить диффузию лекарства и устранить эффект "взрыва" для хорошо

растворимых в воде препаратов. В настоящее время в мировой публикации активно изучается перспектива использования природного полимера Хитозана. Хитозан по своему строению близок к целлюлозе - одному из основных волокнообразующих природных полимеров. Естественно, как и целлюлоза, эти полимеры и их производные обладают волокно- и пленкообразующими свойствами. Благодаря биосовместимости с тканями человека, низкой токсичности, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран, биodeградируемости такие материалы представляют особый интерес для медицины. Хитозан, в отличие от хитина, получаемого при его дезацетилировании, растворяется даже в разбавленных органических кислотах, например, в водном растворе уксусной кислоты. При этом, для растворов хитозана, как и других полимеров, характерна существенная зависимость вязкости от концентрации (при увеличении концентрации раствора хитозана в 1-2%-ном растворе уксусной кислоты с 2 до 4% вязкость раствора увеличивается примерно в 30 раз) [119, 120, 118, 121]. Появление в каждом элементарном звене макромолекулы свободной аминогруппы придает хитозану свойства полиэлектролита, одним из которых является характерный для растворов полиэлектролитов эффект полиэлектролитного набухания - аномального повышения вязкости разбавленных растворов (с концентрацией ниже 1 г/л) при уменьшении концентрации полимера. Этот эффект является следствием увеличения эффективного объема и асимметрии макромолекул в растворе в результате отталкивания одноименных зарядов, возникающих при протонировании аминогрупп.

Данные свойства хитозана, идеально подходят для использования его в системе медленного высвобождения такой сложной молекулы, как ботулинический токсин.

При сотрудничестве с ФГБУН Новосибирским институтом органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, был произведен синтез системы медленного высвобождения ботулотоксина на основе хитозана.

Для приготовления раствора хитозана использовался продукт "Хитозоль"

производства ООО "Биоаванта" (научноград Кольцово, Новосибирская область). Степень дезацетилирования не менее 90%, мол. вес ~500kDa.

В качестве группы сравнения использовали другие наиболее оптимальные для внутрисердечных инъекций соединения из группы мукополисахаридов, гепарин, фраксипарин, хитозан в двух агрегатных состояниях (гель, золь) и непосредственно чистый ботулитнический токсин, разведенный 0,9% растворе натрия хлорида (физ. раствор).

Гепарин – мукополисахарид, антикоагулянт прямого действия, характеризуется молекулярной массой, сравнимой с молекулярной массой ботулотоксина;

Фраксипарин - мукополисахарид, антикоагулянт прямого действия, является низкомолекулярным гепарином с молекулярной массой, на порядок меньше, чем у ботулотоксина;

Хитозан – мукополисахарид, имеющий молекулярную массу, сравнимую с молекулярной массой ботулотоксина. По своему строению близок к полимеру, выстилающему интиму сосудов, обладает полной биосовместимостью с тканями человека, отличается низкой токсичностью.

- Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и хитозан в гель форме.

Использовали флаконы препарата Ксеомин (Мерц Фарма, Германия), содержащие по 100 ЕД Ботулотоксина, в каждый флакон добавляли по 1000 мкл стерильного физ. раствора. Полученные растворы использовали для смешивания с раствором хитозана.

Состав готовили путем смешения в шприце объёмом 1 мл, снабжённого системой Luer-Lock Tip. В результате получили жидкий состав, содержащий следующие компоненты:

Ботулотоксин типа А 10 ЕД/мл (0,25 нг/мл)

Хитозан 44 мг/мл

физ. раствор до 1 мл

- Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и хитозан в золь форме

Ботулотоксин типа А 10 ЕД/мл (0,25 нг/мл)

Хитозан 11 мг/мл

физ. раствор до 1 мл

- Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и гепарин.

Для эксперимента использовали раствор гепарина с концентрацией 5000 МЕ/мл производства ОАО «Синтез» г. Курган, регистрационный номер Р N000116/01.

Одна единица действия гепарина равна 0,0077 мг международного стандарта гепарина, т.е. в 1 мг препарата содержится 130 МЕ (Першин Г.Н., Гвоздева Е.И. Учебник фармакологии - Москва: Медгиз, 1961 - с.405).

Ботулотоксин типа А 10 ЕД/мл (0,25 нг/мл)

Гепарин 200 МЕ/мл (1,6 мг/мл)

физ.раствор до 1 мл

- Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и надропарин (фраксипарин).

Для эксперимента использовали раствор надропарин (фраксипарин) производства Санофи Винтроп Индустрия, Франция, регистрационный номер П N012486/01 с концентрацией 9500 МЕ в мл. Одна единица действия низкомолекулярного гепарина - надропарина (средняя молекулярная масса 4000-7000 дальтон) была принята нами равной одной единице действия гепарина, т.е. 0,0077 мг.

Ботулотоксин типа А 10 ЕД/мл (0,25 нг/мл)

надропарин (фраксипарин) 100 МЕ/мл (0,8 мг/мл)

физ. раствор до 1 мл

- Приготовление контрольного состава, содержащего ботулотоксин типа А препарата Ксеомин (Мерц Фарма, Германия) в разведении с физ. раствором.

Ботулотоксин типа А 10 ЕД/мл (0,25 нг/мл)

физ. Раствор до 1 мл

4.2.2. Лабораторные животные

За основу экспериментальной модели взяты лабораторные крысы линии Вистар, полученные из SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (Новосибирск).

4.2.3. Электростимуляция

Сравнение результатов проводилось методом оценки сокращения дистальных мышц конечности в ответ на электростимуляцию бедра крысы. Сравнялось изменение порога внутримышечной электростимуляции с течением времени. Измерение порога электростимуляции проводилось внутримышечно при помощи двух стерильных стальных микроэлектрода и аппарата ERA 300 (Biotronic, США), диапазон силы тока 0,5 – 10 мА, шаг изменения силы тока 0,5 мА.

4.2.4. Общий дизайн исследования



Рисунок 22. *Общий дизайн разработки оптимального состава на основе ботулинического токсина типа А для химической денервации сердца*

Выбор химического соединения

Пять групп, в каждой по 10 крыс. Каждой группе в правое бедро вводился контрольный препарат, содержащий ботулотоксин тип А 10 ЕД и химическое соединение, выступающее в роли системы медленного высвобождения. Контролем служило левое бедро, в которое вводился 0,9% раствор натрия хлорида (физ. раствор) по той же схеме. Наркоз: эфир. Объем инъекции: 1 мл в

каждое бедро. Метод введения: внутримышечно, в три инъекционные точки (задняя, медиальная, латеральная поверхности бедра) по 0,33 мл в каждую.

Химические соединения выступающее в роли системы медленного высвобождения (мукополисахариды, Рисунок 23.):

Первая группа: Фраксипарин

Вторая группа: Гепарин

Третья группа: Ботулотоксин серотип А чистый (10 ЕД) разведенный в физ. растворе.

Четвертая группа: Хитозан жидкая фракция (Гель)

Пятая группа: Хитозан густая фракция (Золь)

Периоды наблюдения (контрольная электростимуляция задней конечности крысы): Исходно, на 7, 15 и 30 день.

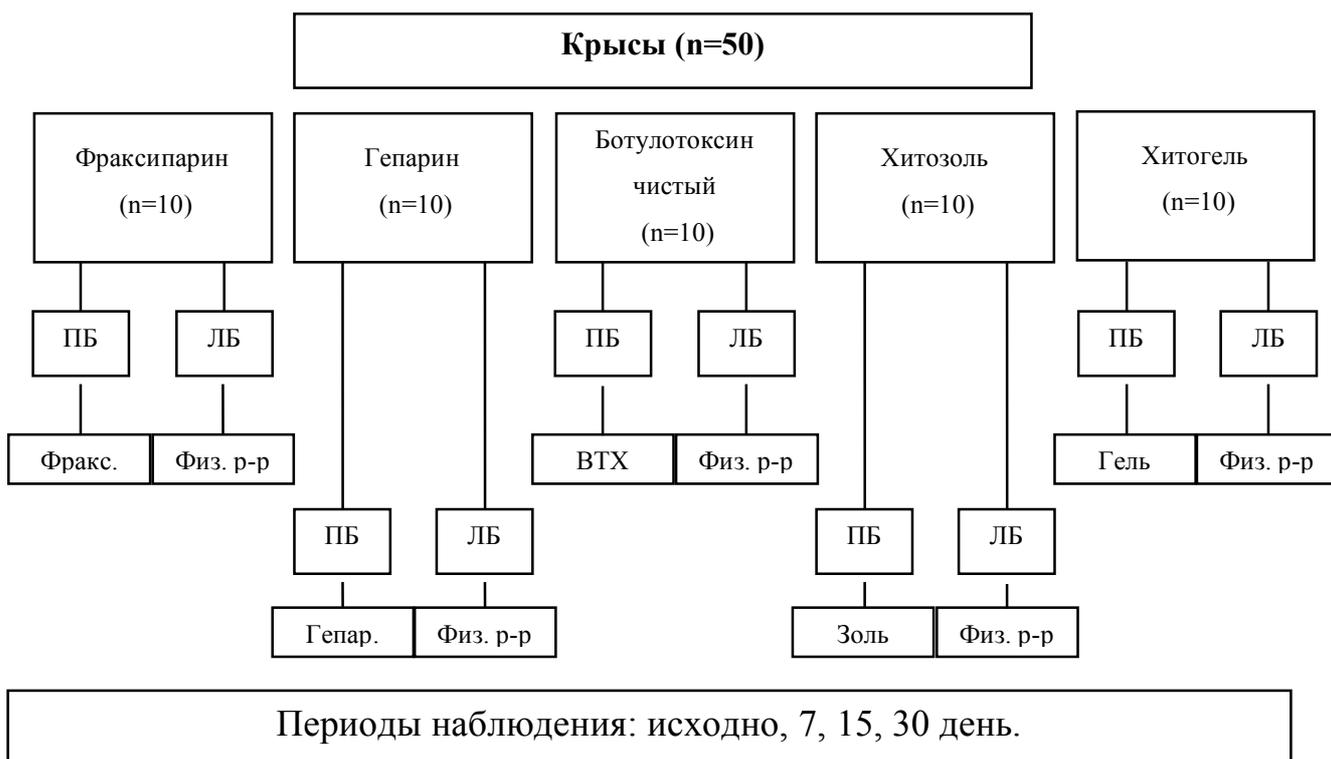


Рисунок 23. Выбор оптимального химического соединения в качестве системы медленного высвобождения. ПБ – правая задняя конечность, ЛБ – левая задняя конечность

Определение оптимальной дозы ботулинического токсина в новом составе

После выбора мукополисахарида в качестве соединения для системы медленного

высвобождения ботулинического токсина, было подобрано их оптимальное весовое соотношение на основе оптимальной используемой дозы ботулинического токсина в разработанном составе.

Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и хитозан в золь форме

- Приготовление состава, содержащего ботулотоксин типа А и хитозан в золь форме

Ботулотоксин типа А 25, 50, 75, 100 ЕД/мл

Хитозан 11 мг/мл

физ. раствор до 1 мл

Четыре группы, в каждой по 10 крыс (Рисунок 24.).

Каждой группе в левое бедро вводился 0,9% раствор натрия хлорида (физ. раствор); в правое бедро вводился ботулотоксин, разведенный в хитозоле.

Наркоз: эфир

Объем инъекции: 1 мл в каждое бедро.

Метод введения: в\м, в три инъекционные точки (задняя, медиальная, латеральная поверхности бедра) по 0,33 мл в каждую.

Первая группа: вводимый раствор содержал 25 ЕД ботулотоксина тип А.

Вторая группа: 50 ЕД ботулотоксина тип А .

Третья группа: 75 ЕД ботулотоксина тип А.

Четвертая группа: 100 ЕД ботулотоксина тип А.

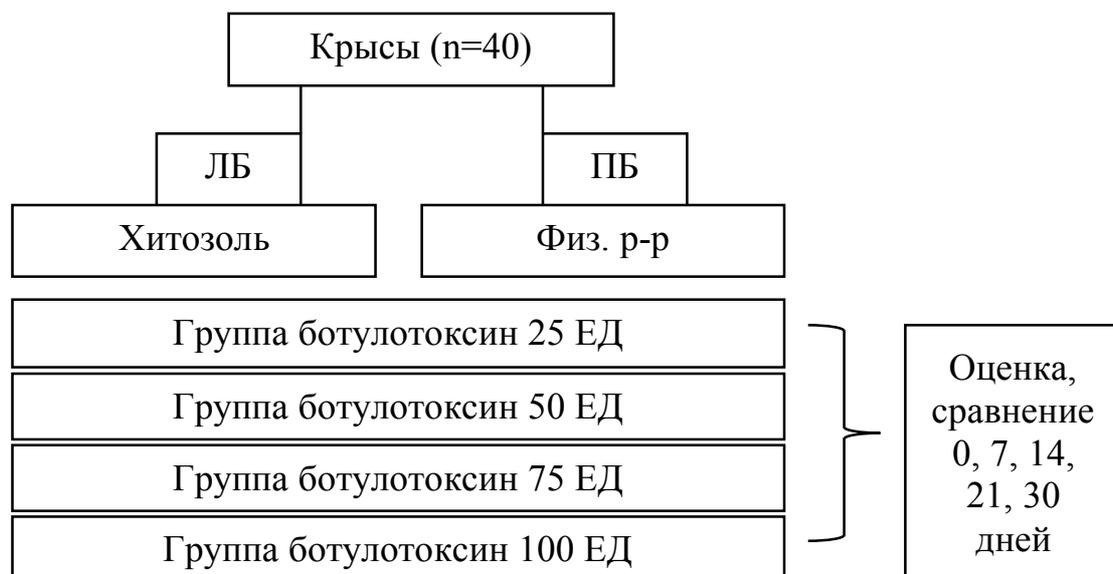


Рисунок 24. Выбор оптимальной дозы ботулинического токсина в новом составе. ПБ – правая бедро, ЛБ – левое бедро

4.3. Статистический анализ

Все результаты выражены как среднее \pm стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий между средними и долями при соответствии распределения вариантов закону нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента при значении $p=0,05$ и доверительном интервале - 95%. Межгрупповой анализ и сравнение от исходного методом мультвариационного теста средних. Анализ выживаемости методом Каплан-Майера, LD50 – пробит-анализ. Все статистические расчеты проводились с использованием версии программного обеспечения STATA 12.0 (Stata Corp, Texas, USA).

4.4. Результаты

4.4.1. Выбор химического соединения

На основании проведенного сравнения, наибольшую эффективность и длительность действия показал ботулотоксин, связанный фракцией хитозана в форме золь, порог электростимуляции задней конечности крысы после инъекции субстанции в 2 раза превышал исходные параметры, $1,4 \pm 0,23V$ в сравнении с $2,8 \pm 0,46V$ после 4-х недель наблюдения ($p < 0,001$; табл. 14). Вторым

соединением по величине порога электростимуляции после 4-х недель наблюдения стал фраксипарин, $2,8 \pm 0,46V$, при анализе величины изменений на четвертую неделю в сравнении от исходных параметров на втором месте - хитозана в форме гель (Хитогель, Таблица 14.), однако, при осуществлении инъекции Хитогеля отмечались технические затруднения, связанные с плохой проходимостью геля через инъекционную иглу.

Таблица 14. 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
	ср	±	ср	±	ср	±	
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	1,05	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	1,12	0,35	2,80	0,46	1,78	0,62	<0,001
p между группами	0,4936		<0,001		<0,001		
p в сравнении с ВТХ	0,40		<0,001		<0,001		
ср - среднее значение; ± - стандартное отклонение							

4.4.2. Определение оптимальной дозы ботулинического токсина в новом составе

При выборе оптимального весового соотношения на основе оптимальной используемой дозы ботулинического токсина в разработанном составе, наилучшую эффективность показали соединения Хитозоля с ботулиническим токсином в дозах 50, 75, 100 ЕД на 30 день наблюдения порог электростимуляции задней конечности крысы более чем в 1,5 раза превышал порог группы с ботулотоксином в дозе 25 ЕД: $2,49 \pm 0,86V$ против $4,19 \pm 0,9$; $4,45 \pm 1,24$; $4,1 \pm 1,18V$ соответственно ($P < 0,001$; Табл. 15), однако между

группами 50, 75, 100 ED статистически значимой разницы не выявлено ($P = 0.85$; Рисунок 25.)

Таблица 15. Средние значения порога электростимуляции при эскалации дозы ботулотоксина

Дата	Группа 25 ED		Группа 50 ED		Группа 75 ED		Группа 100 ED		P*
	левое бедро, V	правое бедро, V							
Исходно	1,12±0,31	0,98±0,27	1,09±0,30	1,0±0,31	1,1±0,29	1,0±0,31	1,10±0,38	1,04±0,34	0.64
1 день	1,17±0,24	1,28±0,13	1,08±0,25	1,52±0,1	1,21±0,19	1,51±0,1	1,15±0,36	1,5±0,1	0.012
7 дней	1,25±0,17	4,51±0,29	1,1±0,16	4,0±0,26	1,22±0,17	9,01±0,81	1,20±0,30	10,0±1,18	<0,001
14 дней	1,25±0,19	5,02±0,88	1,087±0,19	9,83±0,54	1,19±0,17	9,71±0,98	1,20±0,30	9,95±1,48	<0,001
21 день	1,31±0,17	4,45±0,72	1,13±0,15	6,01±0,57	1,15±0,15	5,44±1,03	1,19±0,20	5,51±1,04	<0,001
30 дней	1,264±0,16	2,49±0,86	1,173±0,17	4,19±0,9	1,13±0,2	4,45±1,24	1,16±0,26	4,1±1,18	<0,001
P от исх. #	0,12	<0,001	0,26	<0,001	0,48	<0,001	0,37	<0,001	

* Только для межгруппового сравнения для правого бедра крысы (Хитозоль+ботулотоксин)
Сравнение от исходного к 30 дням наблюдения

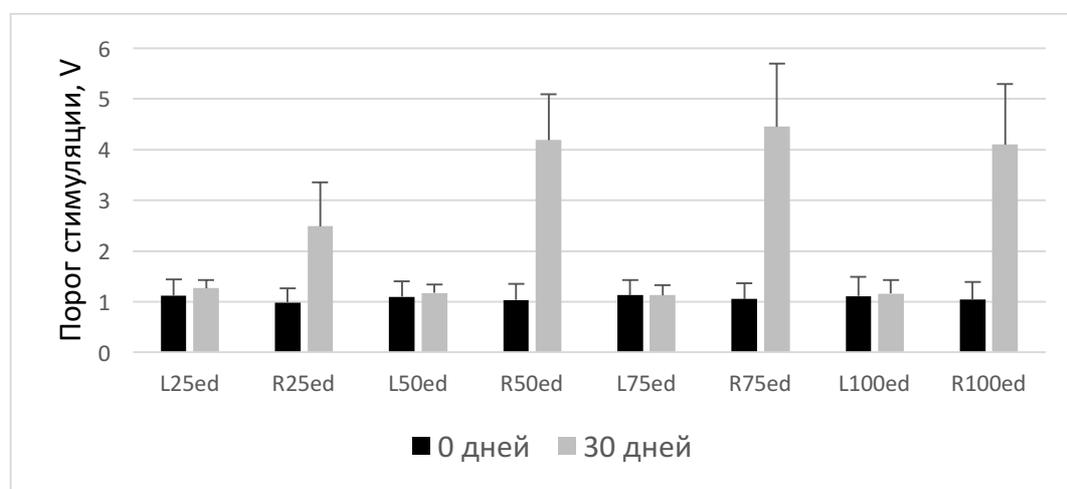


Рисунок 25. Сравнение эффективности эскалации дозы ботулотоксина

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 (Рисунок 26.). Наблюдалось паралич правой задней конечности, передвижение за счет передних конечностей, общая заторможенность, потеря в весе, отказ от пищи и воды.

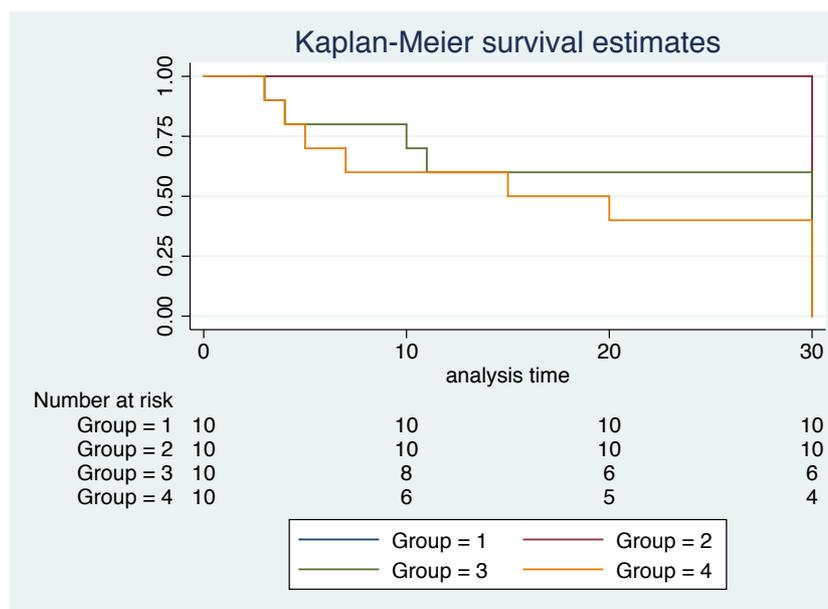


Рисунок 26. Выживаемость крыс после введения соединения различной дозы ботулинического токсина. Группа 1 – 25ЕД; 2 – 50ЕД; 3 – 75ЕД; 4 – 100ЕД ботулинического токсина

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.

Гистоморфологическое 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.

4.5. 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 составе, 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.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель данной работы была определена как разработка метода химической денервации сердца на модели животного. Химическая денервация сердца разрабатывалась как новая и перспективная хирургическая технология профилактики фибрилляции предсердий. Новый метод открывает широкие возможности при профилактике послеоперационной ФП и при лечении ФП у пациентов с первыми, единичными пароксизмами ФП, что при существующих методах лечения было ранее недостижимо или нецелесообразно.

Основные находки данного исследования: ботулинический токсин тип А, при внутрисердечном применении обладает свойствами, характерными для антиаритмических препаратов II, III и IV классов (1); инъекции ботулинического токсина в проекции основных ГС левого предсердия («жировые подушки»), по аналогии с катетерной радиочастотной аблацией ГС, безопасны как при эпикардальном, так и при эндокардиальном подходе, значительно снижают уязвимость предсердия к ФП (2); терапевтический эффект ботулинического токсина и его длительность потенциально можно увеличить за счет его комбинации с природным мукополисахаридом – Хитозолом, выступающим в роли системы медленного высвобождения (3).

Существуют множество фактов, указывающих на то, что причиной большинства заболеваний является нарушение баланса автономной нервной системы (АНС). Избыточная или недостаточная активность АНС запускает каскад нарушений всей сети нервной и гуморальной регуляции, что приводит к ремоделированию электрического, химического и структурного состояния подконтрольного органа или системы органов [122]. Избыточная вагусная стимуляция и введение ацетилхолина радикально меняет электрофизиологию сердца. Стимуляция блуждающего нерва вызывает укорочение относительного и абсолютного рефрактерного периода предсердного миокарда, замедляет и вызывает гетерогенность проведения, что является причиной повышенной уязвимости к индукции ФП [123].

Ряд клинических исследований так же показывают преимущество денервации автономной нервной системы предсердий в устранении фибрилляции предсердий. Часть из них демонстрирует сопоставимую эффективность радиочастотной деструкции основных четырех ганглионарных сплетений АНС левого предсердия по сравнению с общепринятым методом изоляции устьев легочных вен при лечении ФП, и более того сочетанное выполнение данных методик улучшает отдаленные результаты лечения [124, 88, 125, 126, 127, 128].

Автономная нервная система сердца является важнейшим компонентом в цепи физиологических и патологических реакций сердечно-сосудистой системы. Через две свои функциональные ветви, симпатической нервной системы и парасимпатической нервной системы, включая эффекторные молекулы норадреналин и ацетилхолин, она координирует множество событий, которые формируют адекватное кровяное давление, сердечный ритм и вазорегуляторную реакцию на ежесекундные стимулы внешней и внутренней среды. Дисрегуляция этой системы вне зависимости от причины (старение, острый и хронический стресс, органические, идиопатические или другие причины) способствует сердечно-сосудистой патологии, включая гипертонию, ишемическую болезнь сердца, аритмии, застойную сердечную недостаточность и часто фатальным исходам. Несомненно, метод радикальной деструкции основных центров АНС левого предсердия доказал свою клиническую состоятельность, как эффективный и безопасный метод лечения фибрилляции предсердий в среднесрочной перспективе. Однако, деструкция основных центров АНС сердца, определенно, не может являться тактикой первой линии, ввиду того, что отдаленные последствия уничтожение части важной регуляторной системы сердца у людей до сих пор недостаточно изучены.

Для обеспечения эффективной превентивной терапии ФП необходимо идентифицировать степень риска пациента на наиболее ранних стадиях заболевания, до того момента, как патофизиологическое ремоделирования левого предсердия станет необратимым [129].

Процессу обратного ремоделирования как функциональному, так и анатомическому при ФП уделено большее значение [130]. Максимальная длительность Р-волны, дисперсия Р-волны широко использованы в качестве неинвазивной методики оценки функционального ремоделирования левого предсердия при помощи стандартной поверхностной ЭКГ. Проспективные клинические исследования показали, что купирование ФП при помощи даже эпизодической кардиоверсии уже приводит обратному функциональному ремоделированию левого предсердия [131]. До сих пор нет четкого и комплексного понимания развития, как процесса ремоделирования, так и процесса обратного ремоделирования регуляторной системы сердца, однако, существуют неопровержимые данные, доказывающие ключевую роль, как гиперактивации АНС в процессе ремоделирования, так и перезагрузки АНС в процессе обратного функционального ремоделирования [24].

Ботулинический токсин серотип А используется в клинической практике уже более 30 лет во всем мире [132]. На сегодняшний день для клинического применения Ботулинический токсин одобрен в различных областях медицины: косметологии, дерматологии, травматологии, неврологии и урологии [133], однако в кардиологии и в частности внутрисердечно токсин ранее никогда не использовался.

Общепринято считать, что основной терапевтической мишенью ботулинического токсина является нервно-мышечный контакт, в том числе и контакт с АНС. Более детально, блок происходит на уровне синапса за счет разрушения системы высвобождения нейромедиаторов (SNARE-система), которые и вызывают деполяризацию мышечной мембраны. сокращение мышцы. Активная субъединица токсина проникает через мембрану синапса и связывается с одним из белков SNARE-системы, что ведет к необратимому изменению структуры и потере функции белка.

Временная автономная блокада без полного уничтожения основных ганглионарных сплетений левого предсердия при помощи инъекций ботулинического токсина может стать новым альтернативным выбором лечения

ФП на этапе возможного запуска процессов обратного ремоделирования функции как самой АНС сердца, так и непосредственно предсердного миокарда.

Несмотря на наличие большого количества антиаритмических препаратов, поиск новых высокоэффективных и безопасных антиаритмических ЛС является одной из наиболее актуальных задач современной фармакологии. Поиск и доклиническое изучение потенциальных антиаритмических ЛС можно условно разделить на несколько этапов [108]. На первом этапе осуществляется скрининг и первичная оценка механизмов возможного действия препаратов.

Проведенное в ходе работы исследование спектра специфической активности ботулинического токсина тип А на базе стандартных и общепринятых моделей изучения антиаритмической активности [108], вопреки ранее опубликованным работам, описывающих механизм блокирования нейротрансмиссии, раскрыло влияние ботулинического токсина и на другие механизмы функционирования и регуляции сердца. Эпикардальное введение ботулинического токсина серотип А на моделях нарушения ритма сердца, исключая сердечное влияние экстра- и интракардиальной нервной системы, приводит к эффекту свойственному антиаритмическим препаратам II, III, IV классов.

Ранее Тсубой с соавторами [134] испытал метод селективной инъекции ботулинического токсина серотип А в «жировые подушки» предсердия экспериментального животного (собаки) с целью снизить влияние блуждающего нерва и препятствовать вагусной брадикардии. Они продемонстрировали, что ботулинический токсин при селективной инъекции в жировую подушку синоатриального узла ингибирует снижение ЧСС в ответ на раздражение блуждающего нерва, и предположили, что токсин обладает способностью блокировать нейротрансмиссию в ганглионарных сплетениях сердце собаки. В экспериментальном исследовании на собаках, Yu с соавторами [116] использовали синтетический нейротоксин (*N*-изоприлакриламид мономер) для снижения активности переднего и нижнего правых ГС с последующим повышением порога индукции ФП. Группа Ох с соавторами [107] исследовали

кратко- и среднесрочные эффекты ботулинического токсина на подавление активности ГС предсердия собаки и последующего порога индукции ФП, которые достигали максимума на первой неделе после процедуры, и прекращались после третьей недели. Однако в своем исследовании группа Ох воздействовала только на 2 ГС предсердия собаки: эпикардиальная жировая подушка синусового узла и эпикардиальная жировая подушка атриовентрикулярного узла, что не соответствует основным зонам воздействия при методе радиочастотной абляции ГС – верхнее правое, нижнее правое, верхнее левое, нижнее левое ГС левого предсердия, область связки Маршала. Лу с соавторами [135], используя модель частой предсердной стимуляции, четко продемонстрировал роль радиочастотной абляции основных ганглионарных сплетений АНС в подавлении ФП. Они показали, что укорочение рефрактерного периода предсердия, его дисперсия на различных участках, вызывающая особую уязвимость к ФП, может быть обратима, путем радиочастотного уничтожения 4-х основных ганглионарных сплетений АНС предсердий. Последующие клинические исследования так же указывают на эффективность автономной денервации, нацеленной на основные ганглионарные сплетения АНС предсердий [11, 127, 124, 125, 88, 87].

В ходе работе разработаны два новых принципиальных хирургических метода (эпикардиальный и эндокардиальный подход), с направленным воздействием на все основные ГС левого предсердия. При оценке методов было выявлено преимущество по длительности и степени подавления уязвимости к ФП, по отношению к ранее опубликованным подходам [107]. Насколько нам известно, это первая работа, в которой инъекции ботулинического токсина применялись для устранения нарушений ритма сердца методом эндокардиальной инъекции

Описанный группой Ох с соавторами [107] эффект применения внутрисердечного применения ботулинического токсина достигал своего максимума на первой неделе после применения, результаты, полученные в ходе выполнения данной работы указывают на начало снижения эффекта к концу

месяца после инъекции. Помимо всего прочего, при методах эндокардиальной и эпикардиальной денервации основных ГС левого предсердия экспериментальных животных использовались субмаксимальные системные дозы ботулинического токсина, порядка 200 ЕД дозы одномоментной инъекции на одно экспериментальное животное. Данный факт ограничивает потенциальное клиническое применение и требует поиска современных фармакологических подходов в сторону увеличения и продления эффекта действия активной субстанции ботулинического токсина.

В связи со сложной и уязвимой к внешним воздействиям белковой структурой ботулинического токсина, наиболее подходящим веществом в роли системы медленного высвобождения проявил себя природный мукополисахарид – Хитозан в агрегатном состоянии золь. Появление в каждом элементарном звене макромолекулы свободной аминогруппы придает хитозану свойства полиэлектролита, одним из которых является характерный для растворов полиэлектролитов эффект полиэлектролитного набухания - аномального повышения вязкости разбавленных растворов (с концентрацией ниже 1 г/л) при уменьшении концентрации полимера. Этот эффект является следствием увеличения эффективного объема и асимметрии макромолекул в растворе в результате отталкивания одноименных зарядов, возникающих при протонировании аминогрупп [136, 137, 138].

Основными потенциальными сферами клинического применения разработанных методов химической денервации левого предсердия при помощи ботулинического токсина являются:

1. Профилактики и лечение фибрилляций предсердий во время открытых вмешательств на сердце. Аранки с соавторами продемонстрировал, что 70% эпизодов послеоперационной ФП были диагностированы в первые четыре дня послеоперационного периода, 94% в первые 6 дней после операции и только 6% через неделю после операции [139]. Ряд предыдущих исследований показали преимущество профилактической терапии ФП при помощи бета-блокаторов, но из-за их возможных негативных инотропных

эффектов и отсутствия консенсуса в отношении клинических рекомендаций их использование не является универсальным [140]. Кроме того, периоперационная антиаритмическая терапия часто назначается в течение всего лишь нескольких дней, что так же может усугублять риск возникновения отсроченных эпизодов ФП.

2. Интервенционный способ инъекций ботулинического токсина может быть применен и в дополнении к стандартной методике радиочастотной изоляции устьев легочных вен, как профилактическая мера в ранний послеоперационный период («слепой период»), и изолированно в лечении впервые возникших пароксизмальных форм фибрилляции предсердий.
3. Данное направление может послужить новым источником в создании более эффективных и безопасных методов лечения не только предсердной тахикардии, но и таких грозных видов нарушения ритма сердца, как желудочковая тахикардия в целом, и желудочковый электрический шторм в частности.

Ограничения исследования

Несмотря на проведенный спектр исследований специфической антиаритмической активности на различных моделях нарушений ритма сердца, при исследовании методов эпикардальных и эндокардиальных инъекций ботулинического токсина тип А использовались дозы, соотнесенные к ранее опубликованным исследованиями (50 ЕД на 1 ГС) [107, 116]. Возможно более высокие дозы токсина могут быть более уместны в потенциальной антиаритмической терапии. Кроме того, степень снижения уязвимости к ФП на модели животного может не соответствовать степени снижения уязвимости у человека. Однако в данной работе использовались идентичные методы применяемы в клинической практике.

Выводы

1. Эпикардальное введение ботулинического токсина типа А сердца приводит к эффекту свойственному антиаритмическим препаратам II, III, IV классов.
2. Метод эпикардальных инъекций 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. Эпикардиальные инъекции ботулинического токсина следует выполнять в анатомические проекции основных ганглионарных сплетений левого предсердия (верхне-правое, нижне-правое, передне-левое, задне-левое) по 50 ЕД в 1 мл физиологического раствора на одно сплетение.
3. 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.
4. 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 1 мл физиологического раствора на одно сплетение, при помощи специализированного рентгенэндоваскулярного катетера для миокардиальных инъекций.
5. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Ali A. Stroke prophylaxis with warfarin or dabigatran for patients with non-valvular atrial fibrillation-cost analysis // *Age Ageing.*, 2012. 41(5): p. 681-684.
- [2] Andrew N., The prevalence, impact and economic implications of atrial fibrillation in stroke: what progress has been made? // *Neuroepidemiology*, 2013. 40(4): p. 231.
- [3] Zhou Q., A Meta-Analysis of the Comparative Efficacy of Ablation for Atrial Fibrillation with and without Ablation of the Ganglionated Plexi // *Pacing Clin Electrophysiol*, 2011. 34: p. 1687-94.
- [4] Colilla S., Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population // *Am J Cardiol.*, 2013. 12(8): p. 1142-1147.
- [5] Go A., Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*, 2013. 127: p. 246–245.
- [6] Kannel W., Status of the epidemiology of atrial fibrillation // *Med Clin North Am.*, 2008. 92: p. 17-40.
- [7] Mercaldi C., Cost efficiency of anticoagulation with warfarin to prevent stroke in Medicare beneficiaries with nonvalvular atrial fibrillation // *Stroke.*, 2011. 42: p. 112-118.
- [8] Колбин А., Социально-экономическое бремя мерцательной аритмии в Российской Федерации // *Клиническая фармакология и терапия*, 2010. 19: p. 4.
- [9] Ringborg A., Costs of atrial fibrillation in five European countries: results from the EuroHeartSurvey on atrial fibrillation // *Europace*, 2008. 10 (4): p.

403-411.

- [10] Anderson J. L., Management of Patients With Atrial Fibrillation (Compilation of 2006 ACCF/AHA/ESC and 2011 ACCF/AHA/HRS Recommendations): A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // *Circulation*, 2013. 127: p. 1916-1926.
- [11] Scherlag B., Electrical Stimulation to Identify Neural Elements on the Heart: Their Role in Atrial Fibrillation // *J Cardiovasc Electro-physiol*, 2005. 13: p. 37-42.
- [12] Hou Y., Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation // *J Am Coll Cardiol.*, 2007. 50: p. 61-68.
- [13] Schauerte P., Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation // *Circulation*, 2000. 102: p. 2774-2780.
- [14] Lemola K., Pulmonary vein region ablation in experimental vagal atrial fibrillation: role of pulmonary veins versus autonomic ganglia // *Circulation*, 2008. 117: p. 470-477.
- [15] Katritsis D., Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: a randomized study // *Heart Rhythm*, 2011. 8: p. 672-678.
- [16] Calkins H., 2012 HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design // *Europace*, 2012. 14(4): p. 528-606.
- [17] Montecucco C., Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications // *Mol Med Today*, 1996. 2: p. 418-424.

- [18] Chen S., Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments // *Toxins*, 2012. 4: p. 913-939.
- [19] Vaughan Williams E., Classifying antiarrhythmic actions: by facts or speculation // *Journal of clinical pharmacology*, 1992. 32(11): p. 964-977.
- [20] Viskin S., Circadian variation of symptomatic paroxysmal atrial fibrillation. Data from almost 10 000 episodes // *Heart J*, 1999. 20: p. 1429 – 1434.
- [21] Leiria T., Longterm effects of cardiac mediastinal nerve cryoablation on neural inducibility of atrial fibrillation in canines // *Auton Neurosci*, 2011. 161: p. 68–74.
- [22] Richer L., Alpha-adrenoceptor blockade modifies neurally induced atrial arrhythmias // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2008. 295: p. R1175–R1180.
- [23] Tan A., Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines // *Circulation*, 2008. 118: p. 916–925.
- [24] Shen M., Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines // *Circulation*, 2011. 123: p. 2204–2212.
- [25] Chen P., Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines // *Circulation*, 2008. 118: p. 916–925.
- [26] Wang S., Effect of renal sympathetic denervation on atrial substrate remodeling in ambulatory canines with prolonged atrial pacing // *PLoS One*, 2013. 8: p. e64611.
- [27] Janes R., Functional and anatomical variability of canine cardiac sympathetic efferent pathways: implications for regional denervation of the left ventricle // *Can J Physiol Pharmacol*, 1986. 64: p. 958–969.

- [28] Janes R., Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia // *Am J Cardiol.*, 1986. 57: p. 299–309.
- [29] Armour J., Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system // *Anat Rec.*, 1997. 247: p. 289–298.
- [30] Ardell J., The cardiac neuronal hierarchy and susceptibility to arrhythmias // *Heart Rhythm*, 2011. 8: p. 590–591.
- [31] Kawashima T., The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution // *Anat Embryol (Berl)*, 2005. 209: p. 425–438.
- [32] Ellison J., Sympathetic nerve pathways to the human heart, and their variations // *Am J Anat.*, 1969. 124: p. 149–162.
- [33] Baron R., Sympathetic and afferent neurones projecting into forelimb and trunk nerves and the anatomical organization of the thoracic sympathetic outflow of the rat // *J Auton Nerv Syst*, 1995. 53: p. 205–214.
- [34] Taniguchi T., Cutaneous distribution of sympathetic postganglionic fibers from stellate ganglion: a retrograde axonal tracing study using wheat germ agglutinin conjugated with horseradish peroxidase // *J Anesth.*, 1994. 8: p. 441–449.
- [35] Pagé P., Regional distribution of atrial electrical changes induced by stimulation of extracardiac and intracardiac neural elements // *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 1995. 109: p. 377–388.
- [36] Onkka P., Sympathetic nerve fibers and ganglia in canine cervical vagus nerves: localization and quantitation // *Heart Rhythm*, 2013. 10: p. 585–591.
- [37] Park H., Neural control of ventricular rate in ambulatory dogs with pacing-induced sustained atrial fibrillation // *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2012. 5: p. 571–580.

- [38] Henry T., Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation // *Neurology*, 2002. 59: p. S3–S14.
- [39] Randall W., Responses of individual cardiac chambers to stimulation of the cervical vagosympathetic trunk in atropinized dogs // *Circ Res.*, 1967. 20: p. 534–544.
- [40] Armour J., Functional anatomy of canine cardiac nerves» *Acta Anat (Basel)*, 1975. 91: p. 510–528.
- [41] Armour J., Anatomy of the extrinsic efferent autonomic nerves and ganglia innervating the mammalian heart // *Nervous Control of Cardiovascular Function*, W. Randall, Ред., New York, Oxford University Press, 1984. p. 21–45.
- [42] Onkka P., Sympathetic nerve fibers and ganglia in canine cervical vagus nerves: localization and quantitation // *Heart Rhythm*, 2013. 10: p. 585–591.
- [43] Tan A., Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction // *J Am Coll Cardiol.*, 2006. 48: p. 132–143.
- [44] P.-S. Chen, . L. S. Chen, . M. C. Fishbein, S.-F. Lin и . S. Nattel, «Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapy» *Circ Res.*, т. 114 (9), p. 1500–1515, 2014.
- [45] Vracko R., Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium // *Lab Invest.*, 1990. 63: p. 490–501.
- [46] Cao J., Nerve sprouting and sudden cardiac death // *Circ Res.*, 2000. 86: p. 816–821.
- [47] Swissa M., Long-term subthreshold electrical stimulation of the left stellate ganglion and a canine model of sudden cardiac death // *J Am Coll Cardiol.*, 2004. 43: p. 858–864.

- [48] Zhou S., Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs // *Circ Res.*, 2004. 95: p. 76–83.
- [49] Miyauchi Y., Induction of atrial sympathetic nerve sprouting and increased vulnerability to atrial fibrillation by chronic left ventricular myocardial infarction // *Circulation*, 2001. 104: p. II–77.
- [50] Arora R., Recent insights into the role of the autonomic nervous system in the creation of substrate for atrial fibrillation: implications for therapies targeting the atrial autonomic nervous system // *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2012. 5: p. 850–859.
- [51] Volders P., Novel insights into the role of the sympathetic nervous system in cardiac arrhythmogenesis // *Heart Rhythm*, 2010. 7: p. 1900–1906.
- [52] Patterson E., Spontaneous pulmonary vein firing in man: relationship to tachycardia-pause early afterdepolarizations and triggered arrhythmia in canine pulmonary veins in vitro // *J Cardiovasc Electrophysiol.*, 2007. 18: p. 1067–1075.
- [53] Scherlag B., The neural basis of atrial fibrillation // *J Electrocardiol.*, 2006. 39: p. S180–S183.
- [54] Patterson E., Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation // *Heart Rhythm*, 2005. 2: p. 624–631.
- [55] Nguyen B., Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans // *Heart Rhythm*, 2009. 6.
- [56] Ajijola O., Extracardiac neural remodeling in humans with cardiomyopathy // *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2012. 5: p. 1010–1116.
- [57] Nguyen B., Acute myocardial infarction induces bilateral stellate ganglia neural remodeling in rabbits // *Cardiovasc Pathol.*, 2012. 21: p. 143–148.
- [58] Francis G., Modulation of peripheral sympathetic nerve transmission // *J Am*

Coll Cardiol. , 1988. 12: p. 250–254.

- [59] Lympelopoulos A., Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy // *Circ Res.*, 2013. 113: p. 739–753.
- [60] Oberhauser V., Acetylcholine release in human heart atrium: influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age // *Circulation*, 2001. 103: p. 1638–1643.
- [61] Nerbonne J., Molecular physiology of cardiac repolarization // *Physiol Rev.*, 2005. 85: p. 1205–1253.
- [62] Andrade J., The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms // *Circ Res.*, 2014. 114: p. 1453–1468.
- [63] Nattel S., Paroxysmal atrial fibrillation and pulmonary veins: relationships between clinical forms and automatic versus re-entrant mechanisms // *Can J Cardiol.*, 2013. 29: p. 1147–1149.
- [64] Pandit S., Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation // *Circ Res.*, 2013.112: p. 849–862.
- [65] Liu L., Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity // *Am J Physiol.*, 1997. 273: p. H805–H816.
- [66] Barrett C., What sets the long-term level of renal sympathetic nerve activity: a role for angiotensin II and baroreflexes? // *Circ Res.*, 2003. 92: p. 1330–1336.
- [67] Ogawa M., Left stellate ganglion and vagal nerve activity and cardiac arrhythmias in ambulatory dogs with pacing-induced congestive heart failure // *J Am Coll Cardiol.*, 2007. 50 p. 335–343.
- [68] Piccini J., Incidence and prevalence of atrial fibrillation and associated

mortality among Medicare beneficiaries, 1993-2007 // *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2012. 5(1): p. 85-93.

- [69] Wong C., Factors associated with the epidemic of hospitalizations due to atrial fibrillation // *Am J Cardiol*, 2012. 110(10):p. 1496-1499.
- [70] Savelieva I., Quality of life in patients with silent atrial fibrillation // *Heart*, 2001. 85(2):p. 216-217.
- [71] Kalantarian S., Cognitive impairment associated with atrial fibrillation: a meta-analysis // *Ann Intern Med*, 2013. 158(5 Pt 1): p. 338-346.
- [72] Groenveld H., Rate control efficacy in permanent atrial fibrillation: successful and failed strict rate control against a background of lenient rate control: data from RACE II (Rate Control Efficacy in Permanent Atrial Fibrillation) // *J Am Coll Cardiol*, 2013. 61 (7):p. 741-748.
- [73] Skanes A., Focused 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society atrial fibrillation guidelines: recommendations for stroke prevention and rate/rhythm control // *Can J Cardiol*, 2012. 28(2): p. 125-36.
- [74] Haissaguerre M., Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins // *N Engl J Med* , 1998. 339(10): p. 659-666.
- [75] Wazni O., Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of symptomatic atrial fibrillation: a randomized trial // *JAMA*, 2005. 293(21): p. 2634-2640.
- [76] Camm A., 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European heart rhythm association // *Eur Heart J*, 2012. 33(21): p. 2719-2747.
- [77] Calkins H., Treatment of atrial fibrillation with antiarrhythmic drugs or

- radiofrequency ablation: two systematic literature reviews and meta-analyses
// *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009. 2(4): p. 349-361.
- [78] Parkash R. Approach to the catheter ablation technique of paroxysmal and persistent atrial fibrillation: a meta-analysis of the randomized controlled trials
// *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011. 22(7): p. 729-738.
- [79] Olshansky B., The Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study: approaches to control rate in atrial fibrillation
// *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(7): p. 1201-1208.
- [80] Van Gelder I., A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation // *N Engl J Med*, 2002. 347(23): p. 1834-1840.
- [81] Xu Z., Atrial conduction delay predicts atrial fibrillation in paroxysmal supraventricular tachycardia patients after radiofrequency catheter ablation // *Ultrasound Med Biol*, 2014. - p. S0301-5629.
- [82] Cappato R., Updated worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation // *Circ Arrhythm Electrophysiol* , 2010. 3: p. 32–38.
- [83] Ganesan N., Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis // *J Am Heart Assoc*, 2013.
- [84] Ang R., The role of catheter ablation in the management of atrial fibrillation // *Clin Med (Lond)*, 2016. 16(3): p. 267-271.
- [85] Lim P., Stimulation of the intrinsic cardiac auto- nomic nervous system results in a gradient of fibrillatory cycle length shortening across the atria during atrial fibrillation in humans // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 2011. 22.
- [86] Scherlag B., Endovascular stimulation within the left pulmonary artery to induce slowing of heart rate and paroxysmal atrial fibrillation // *Cardiovasc.*

Res., 2002. 54: p. 470–475.

- [87] Pokushalov E., Ganglionated plexi ablation vs linear ablation in patients undergoing pulmonary vein isolation for persistent/longstanding persistent atrial fibrillation: a randomized comparison // *Heart Rhythm*, 2013 : p. 1547–5271.
- [88] Pokushalov E., Ganglionated plexi ablation directed by high-frequency stimulation and complex fractionated atrial electrograms for paroxysmal atrial fibrillation // *Pacing. Clin. Electrophysiol.*, 2012. 35.
- [89] Pokushalov E., Selective ganglionated plexi ablation for paroxysmal atrial fibrillation // *Heart Rhythm*, 2009. 6.
- [90] Katritsis D., Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: a randomized study // *Pacing Clin Electrophysiol.*, 2011. 34: p. 1687-1694.
- [91] Pisani C., Gastric hypomotility following epicardial vagal denervation ablation to treat atrial fibrillation // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 2008. 19: p. 211–213.
- [92] Buccelletti E., Heart rate variability and myocardial infarction: systematic literature review and metanalysis // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2009. 13: p. 299–307.
- [93] Kukreja R., Singh B., The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights // *Research and Reports in Biochemistry*, 2015. 5: p. 173—183.
- [94] Scott A., Rosenbaum A., Collins C., Pharmacologic weakening of extraocular muscles // *Invest Ophthalmol*, 1973. 12(12): p. 924-927.
- [95] Cohen L., Hallett M., Geller B., Hochberg F., Treatment of focal dystonias of the hand with botulinum toxin injections // *J Neurol Nuerosurg Psychiatry*,

1989. 52: p. 355-363.

- [96] U. S. D. o. H. a. H. Services, Docket No. FDA-2008-P-0061 (PDF, 8.2 MB). Food and Drug Administration. 2009. [Электронный ресурс]. Режим доступа:
www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHeathcareProfessionals/UCM143989.pdf.
- [97] Benecke R., Jost W., Kanovsky P., A new botulinum toxin type A free of complexing protein for treatment of cervical dystonia // *Neurology*, 2005. 64: p. 1949-1951.
- [98] Pellizzari R., Rossetto O., Schianvo G. , Montecucco C., Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999. 345: p. 259-68.
- [99] Foran P., Lawrence G., Shone C., Foster K., Dolly J., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release // *Biochemistry*, 1996. 35: p. 2630-6263.
- [100] Binz T., Blasi I., Yamasaki S., Proteolysis of SNAP-25 by type E and A botulinum neurotoxins // *J Biol Chem*, 1994. 269:p. 1617-20.
- [101] Schiavo G., Santucci A., Dasgupta B., Mehta P., Jontes J., Benfenati F., Wilson M. , Montecucco C., Botulinum neurotoxins serotype A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH- terminal peptide bonds // *FEBS let*, 1993.. 335(1): p. 99-103.
- [102] Yamasaki S., Baumeister A., Binz T., Blasi J., Link E., Cornille F., Roques R., Fykse E., Südhof T., Jahn R. , Neimann H., Cleavage of members of the synaptobrevin/ VAMP family by type D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin // *J Biol Chem*, 1994. 269(17): p. 12764- 12772.

- [103] Duchen L., An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse // *J Neurol Sci*, 1971.14: p. 47-60.
- [104] Dressler D., Rothwell J., Electromyographic quantification of the paralyzing effect of botulinum toxin // *Eur Neurol*, 2000. 43: p. 13-16.
- [105] Lange D., Brin M., Warner C., Fahn S., Lovelace R., Distant effect of local injection of botulinum toxin // *Muscle Nerve*, 1987. 10: p. 552 – 555.
- [106] Dressler D., Benecke R., Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis // *Eur Neurol*, 2003. 49: p. 34-8.
- [107] Oh S. Botulinum Toxin Injection in Epicardial Autonomic Ganglia Temporarily Suppresses Vagally Mediated. Atrial Fibrillation // *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2011. 4: p. 560-565.
- [108] Миронов А., Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Миронов.- Москва: Гриф и К, 2012.
- [109] Беленький М., Элементы количественной оценки фармакологического эффекта М. Беленький.- Рига: Медицина, 1959.
- [110] Kleeman A., Syntheses, Patents, Applications // *Pharmaceutical Substances*, 2001. 4: p. 1315-1800.
- [111] Michels G., Direct evidence for calcium conductance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and human native I_f at physiological calcium concentrations // *Cardiovascular Research*, 2008. 78: p. 466-475.
- [112] Лихошерстов А., Синтез и антиаритмическая активность 1-(2,4,6-триметилфенил)-2[(2-гидрокси-3'-фенилокси)-N-замещенных аимнометил] пирролов // *Химико-фармацевтический журнал*, 2003. 37:

р. 8-11.

- [113] Богус С., Антиаритмические свойства производного индола SS-68 в условиях хлоридбариевой и хлоридцезиевой аритмий // Новые технологии, 2012. 4: стр. 7-10.
- [114] Розенштраух Л., Физиологические аспекты тахиаритмий сердца и механизмы действия антиаритмических препаратов в Руководство по нарушениям ритма сердца / Л. Розенштраух, Е. Чазов; под Геотар-медиа ред., 2010. стр. 416.
- [115] Розенштраух Л., Микроэлектродные исследования аконитиновой модели фибрилляции сердца // Физиологический журнал СССР, 1965. 51(9): стр. 1071-1080.
- [116] Yu L., Autonomic Denervation With Magnetic Nanoparticles // Circulation, 2010. 122: p. 2653-2659.
- [117] Liu X., Ablation of ligament of marshall attenuates atrial vulnerability to fibrillation induced by inferior left atrial fat pad stimulation in dogs // J. Cardiovasc. Electrophysiol., 2010. 21: p. 1024-30.
- [118] Кабанов В., Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполиэлектrolитных комплексов // Высокомолек. соед., 1994. 36 (2): стр. 183-197.
- [119] Карпушкин Е., Полиэлектrolитная реакция между частицами противоположно заряженных микрогелей // Высокомолек. соед., 2006. 48 (11): стр. 2053-2057.
- [120] Kalsin A., Ionic-like behavior of oppositely charged nanoparticles // J. Am. Chem. Soc., 2006. 128: p. 15046 – 15047.
- [121] Зезин А., «Полиэлектrolитные комплексы» в успехи химии и физики полимеров / А. Зезин.- Москва: Химия, 1973. стр. 3 - 30.

- [122] Drummond P. Sensory-autonomic interactions in health and disease // *Handb Clin Neurol.*, 2013. 117: p. 309-319.
- [123] Hirose M., Partial vagal denervation increases vulnerability to vagally induced atrial fibrillation // *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002. 13: p. 1272–1279.
- [124] Po S., Localization of left atrial ganglionated plexi in patients with atrial fibrillation // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 2009. 20, p. 1186 –1189.
- [125] Danik S. Evaluation of catheter ablation of periatrial ganglionic plexi in patients with atrial fibrillation // *Am. J. Cardiol.*, 2008. 102: p. 578 –583.
- [126] Pokushalov E., The role of autonomic denervation during catheter ablation of atrial fibrillation // *Curr. Opin. Cardiol.*, 2008. 23: p. 55-59.
- [127] Katritsis D., Autonomic Denervation Added to Pulmonary Vein Isolation for Paroxysmal Atrial Fibrillation: A Randomized Clinical Trial // *J. Am. Coll. Cardiol.* , 2013. 62: p. 2318-2325,
- [128] Артеменко С.Н., Патология кровообращения и кардиохирургия // *Вестник аритмологии*, 2013. 1, стр. 33–37.
- [129] Benjamin E., Chen P., Bild D., Prevention of atrial fibrillation: report from a national heart, lung, and blood institute workshop // *Circulation*, 2009. 119: p. 606–187.
- [130] Wijffels M., Kirchhof C., Dorland R., Allessie M., Atrial fibrillation begets atrial fibrillation – a study in awake chronically instrumented goats // *Circulation*, 1995. 92, p. 68-194.
- [131] Healey J., Theoret-Patrick P., Green M., Lemery R., Birnie D., Tang A., Reverse atrial electrical remodelling following atrial defibrillation as determined by signal-averaged ECG // *Can J Cardio*, 2004. 20:
- [132] Setler P., Therapeutic use of botulinum toxins: background and history // *Clin*

- J Pain, 2002. 18(6): p. 119–124,
- [133] Chen J., Abo-, inco-, ona-, and rima-botulinum toxins in clinical therapy: a primer // *Pharmacotherapy*, 2013. 33: p. 304–318.
- [134] Tsuboi M., Botulinum neurotoxin A blocks cholinergic ganglionic neurotransmission in the dog heart // *Jpn J Pharmacol.*, 2002. 89: p. 249–254.
- [135] Lu Z., Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: autonomic mechanism for atrial electrical remodeling induced by short-term rapid atrial pacing. // *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2008. 1: p. 184– 192.
- [136] Кабанов В., Полиэлектролитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе [Электронный ресурс] /В.А. Кабанов // *Успехи химии.*- 2005. - 74 (1), режим доступа: http://www.uspkhim.ru/ukh_frm.phtml?jrnid=rc&page=paper&paper_id=1165
- [137] Kabanov A., Water-Soluble Block Polycations as Carriers for Oligonucleotide Delivery // *Bioconjugate Chem*, 1995. 6: pp. 639-643.
- [138] Harada A., Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly (ethylene glycol) Segments // *Macromoleeules*, 1995. 28: pp. 5294-5299.
- [139] Aranki S., Shaw D., Adams D., Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources // *Circulation*, 1996. 94(3): p. 390–397.
- [140] Mitchell L., Exner D., Wyse D., Prophylactic Oral Amiodarone for the Prevention of Arrhythmias that Begin Early After Revascularization, Valve Replacement, or Repair: PAPABEAR: a randomized controlled trial // *JAMA*, 2005. 294(24): p. 3093–3100.

СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА

- Рисунок 1.** Изолированная активация блуждающего нерва, ассоциированная с ростом частоты сердечных сокращений. Электрическая активность ЗГ-звездчатый ганглий, БН – блуждающий нерв. ЭКГ – вариация частоты сердечных сокращений..... 16
- Рисунок 2.** Дизайн экспериментального исследования..... 27
- Рисунок 3.** Инъекция раствора ботулинического токсина в жировую подушку крысы 31
- Рисунок 4.** Динамика показателей ЭКГ при внутривенном введении референтных препаратов на адреналиновой модели нарушений ритма ($V=50$ мм/с), А– летальная фибрилляция желудочков, вызванная адреналином (в/в, 100 мкг/кг) после превентивного введения ВТХ (в/в, 0,25 нг/ кг); В – влияние адреналина на сердечную деятельность на фоне метопролола (в/в, 5 мг/кг); С - влияние адреналина на сердечную деятельность на фоне верапамила (в/в, 2 мг/кг) 41
- Рисунок 5.** Влияние субстанции ВТХ на фибрилляцию желудочков сердца, вызванную внутривенным введением адреналина ($V=50$ мм/с), А – фибрилляция желудочков, вызванная адреналином (в/в, 100мкг/кг); В – влияние адреналина на сердечную деятельность спустя 20 минут после имплантации соединения ВТХ (эпикардальная инъекция, 0,1 нг/кг) 43
- Рисунок 6.** Динамика показателей ЭКГ при внутривенном введении препаратов на хлорид-бариевой модели нарушений ритма у кроликов. А-развитие нарушений ритма на фоне субстанции ВТХ (в/в, 0,25 нг/кг); Б-сохранение ритма на фоне амиодарона (в/в, 5 мг/кг) 44
- Рисунок 7.** Сохранение сердечного ритма при эпикардальном введении субстанции ВТХ на хлорид-бариевой модели нарушений ритма. А-ЭКГ крысы в динамике на фоне субстанции ВТХ (доза 0,1 нг/кг); Б-ЭКГ кролика в динамике на фоне субстанции ВТХ (доза 0,005 нг/кг) 45
- Рисунок 8.** Динамика ЭКГ при эпикардальном введении субстанции ВТХ в

сравнении с референтными антиаритмическими препаратами после инъекции аконитина, А – развитие фибрилляции желудочков на фоне субстанции ВТХ (5 нг/кг); Б – сохранение ритма на фоне новокаинамида (в/в, 10 мг/кг); В – сохранение ритма на фоне лидокаина (в/в, 8 мг/кг)..... 48

Рисунок 9. Дизайн исследования метода эпикардиальной денервация автономной нервной системы левого предсердия..... 52

Рисунок 10. Инъекция раствора ботулинического токсина в жировую подушку области устья верхней правой легочной вены 53

Рисунок 11. Временный эпикардиальный электрод для контрольного электрофизиологического исследования в области устья левых легочных вен..... 53

Рисунок 12. *Изменение среднего ЭРП в ответ на вагосимпатическую стимуляцию* 56

Рисунок 13. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий 57

Рисунок 14. Дизайн исследования метода эндокардиальных инъекций ботулинического токсина..... 59

Рисунок 15. Передний (А), верхний (В) и задний (С) вид левого предсердия; верхний вид, в виде сетки (D). На картах розовые 2-мм точки отображают устья лёгочных вен, белые 2-мм точки отображают кольцо митрального клапана, жёлтые 2-мм точки отображают зоны высокочастотной стимуляции с положительным вагусным ответом, голубые точки – зоны с отрицательным вагусным ответом. Тёмно-бордовые 2-мм точки отображают участки интрамиокардиальных инъекций ботулотоксина..... 60

Рисунок 16. Инъекции контраста в эпикардиальные жировые подушки, содержащие верхние правые (А), нижние правые (В) и верхние левые ГС (С) 61

Рисунок 17. Инъекции контраста в эпикардиальные жировые подушки, перфорация иглы эндомиокардиального катетера в полость перикарда 64

Рисунок 18. Эндограмма высокочастотной электрокардиостимуляции эндокардиальной проекции ганглионарного сплетения левого предсердия

собаки (до инъекции ботулинического токсина). Зафиксирован момент положительного вагусного ответа вплоть до асистолии 65

Рисунок 19. Эндограмма высокочастотной электрокардиостимуляции эндокардиальной проекции ганглионарного сплетения левого предсердия собаки (после инъекции ботулинического токсина). Отсутствие эффекта положительного вагусного ответа, невозможность индуцировать ФП 66

Рисунок 20. Изменение среднего значения эффективного рефрактерного периода (ЭРП) в ответ на высокочастотную стимуляцию блуждающего нерва после эндокардиальных, эпикардиальных инъекций ботулинического токсина, инъекции плацебо..... 66

Рисунок 21. Изменение степени индукции фибрилляции предсердий в ответ на эндокардиальные, эпикардиальные инъекции ботулотоксина и инъекции плацебо..... 68

Рисунок 22. Общий дизайн разработки оптимального состава на основе ботулинического токсина типа А для химической денервации сердца 74

Рисунок 23. Выбор оптимального химического соединения в качестве системы медленного высвобождения. ПБ – правая задняя конечность, ЛБ – левая задняя конечность 75

Рисунок 24. Выбор оптимальной дозы ботулинического токсина в новом составе. ПБ – правая бедро, ЛБ – левое бедро 77

Рисунок 25. Сравнение эффективности эскалации дозы ботулотоксина 79

Рисунок 26. Выживаемость крыс после введения соединения различной дозы ботулинического токсина. Группа 1 – 25ЕД; 2 – 50ЕД; 3 – 75ЕД; 4 – 100ЕД ботулинического токсина..... 80

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица 1. Характеристика животных, использованных в эксперименте.....	28
Таблица 2. Данные об исследуемом веществе.....	29
Таблица 3. Распределение животных при подборе дозы адреналина	32
Таблица 4. Распределение животных по группам в опыте по определению ЭД ₅₀	33
Таблица 5. Распределение кроликов при подборе дозы бария хлорида	35
Таблица 6. Распределение животных по группам в опыте по определению ЭД ₅₀ на хлорид-бариевой модели аритмии	36
Таблица 7. Распределение крыс по группам в опыте по определению ЭД ₅₀ на аконитиновой модели аритмии	38
Таблица 8. <i>Данные фармакологической активности референтных антиаритмических препаратов.....</i>	40
Таблица 9. <i>Данные о переносимости адреналин-индуцированной фибрилляции желудочков экспериментальными животными после введения субстанции ВТХ</i>	41
Таблица 10. <i>Данные фармакологической активности эпикардального введения ВТХ</i>	43
Таблица 11. <i>Данные фармакологической активности исследуемых соединений на хлорид-бариевой модели аритмий.....</i>	46
Таблица 12. <i>Данные фармакологической активности антиаритмических препаратов I класса на аконитиновой модели нарушений ритма</i>	47
Таблица 13. <i>Процент изменение ЭРП группы инъекции ботулинического токсина до и после вагосимпатической стимуляции</i>	67
Таблица 14. <i>Порог электростимуляции задней конечности крысы после инъекции ботулотоксина в сочетании с выбранным мукополисахаридом</i>	78
Таблица 15. <i>Средние значения порога электростимуляции при эскалации дозы ботулотоксина.....</i>	79