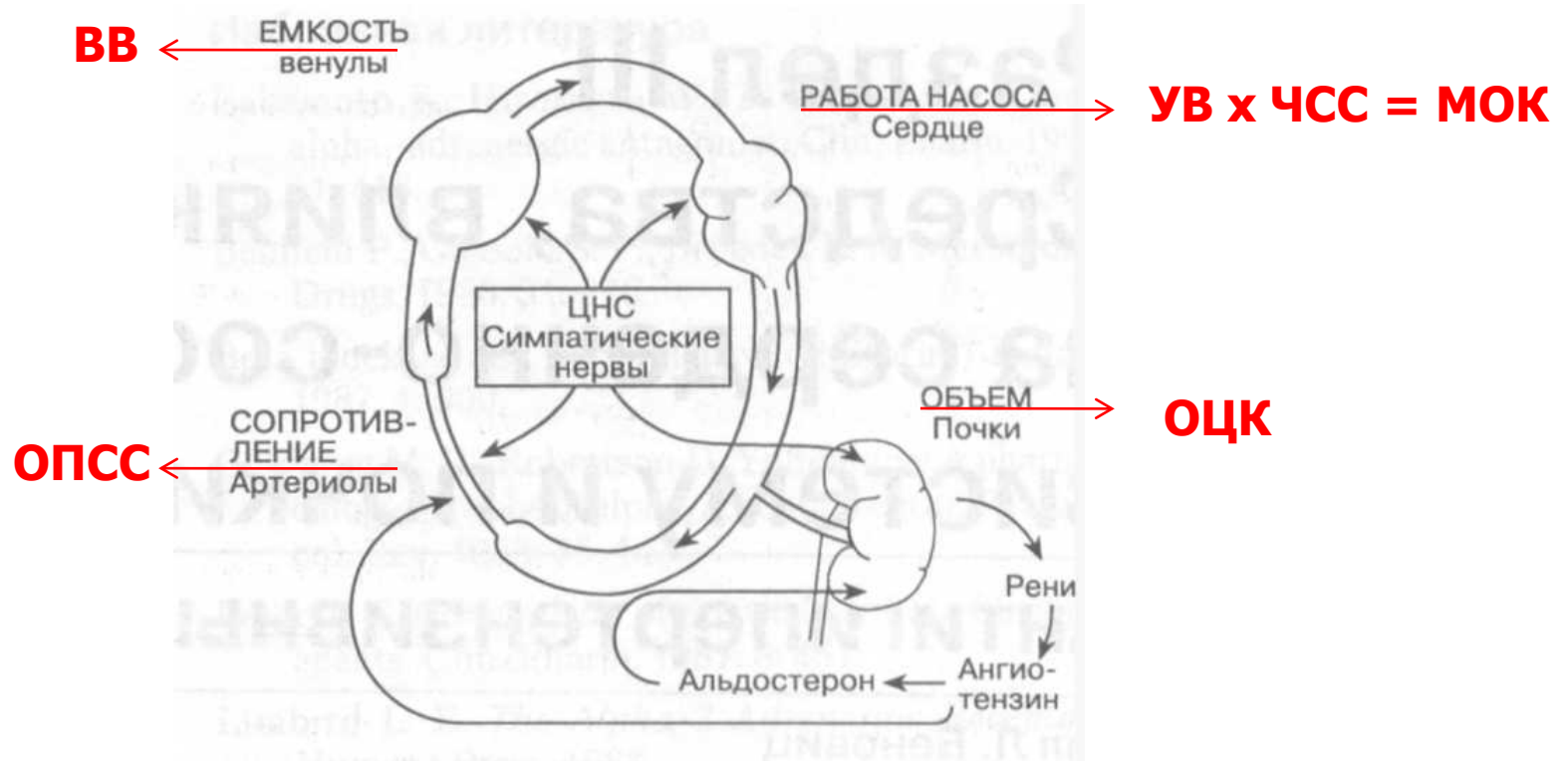




ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Поиск и создание кардиотонических и антиаритмических средств

Анатомические области, функции и регуляция ССС



Основные мишени действия веществ, активных в отношении ССС

■ Сердце

- Бета₁-адренорецепторы
- n. vagus
- трансмембранные ионные токи, обменники, ферменты

■ Сосуды

- альфа-адренорецепторы
- Бета₂-адренорецепторы
- АТ-рецепторы
- Ca²⁺ каналы L-типа
- K⁺ каналы
- Na⁺ каналы
- ФДЭ

Средства, применяемые при нарушениях деятельности сердца

- **при сердечной недостаточности**
 - Кардиотоники
 - Диуретики
 - Вазодилататоры
 - Ингибиторы АПФ
- **при нарушениях ритма сердечных сокращений**
 - Антиаритмики
- **при недостаточности кровоснабжения миокарда**
 - Антиангинальные

Поиск кардиотонических средств

Классификация кардиотоников

- **Гликозидные кардиотонические средства
(сердечные гликозиды)**
 - дигитоксин*
 - дигоксин*
 - строфантин К*
- **Негликозидные кардиотонические средства**
- *Симпатомиметические средства*
 добутамин *, допамин*
- **Другие средства с положительным инотропным действием**
 - *Неспецифические ингибиторы ФДЭ*
 - ксантины
 - *Специфические ингибиторы ФДЭ III*
 - амринон, милринон, эноксимон
 - *Кальциевые сенситайзеры*
 - левосимендан*, пимобендан

* - выделены препараты, входящие в Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, 2015

I этап. Скрининг (первичный отбор) негликозидных веществ с кардиотоническим действием

- 1. Позволяет быстро оценить наличие или отсутствие инотропной активности у большого количества соединений.**
- 2. Наличие эталона.**
- 3. Скрининг целесообразно проводить с использованием простых, легко воспроизводимых и экономичных методов:**
 - *in vitro* на изолированных органах;
 - или *in vivo* с записью параметров, отражающих скорость сокращения и скорость расслабления миокарда (запись ВЖД, регистрации скорости выброса крови в восходящей аорте).

I этап. Скрининг (первичный отбор) негликозидных веществ с кардиотоническим действием

- 4. Анализ зависимости «доза (концентрация)–эффект».**
- 5. Определение эффективной дозы (концентрации) соединений (IC_{50} , ED_{50}).**
- 6. Острая токсичность (LD_{50}).**
- 7. Широта терапевтического действия ($УТИ = LD_{50} / МЭК(ED_{50})$).**
- 8. Условный терапевтический индекс изучаемых соединений сравнивают с аналогичными показателями известных ЛС – препаратов сравнения.**
- 9. По завершении I этапа исследований необходимо отобрать наиболее перспективные соединения.**

Материалы и методы



Установка для исследований UGO BASILE, Италия

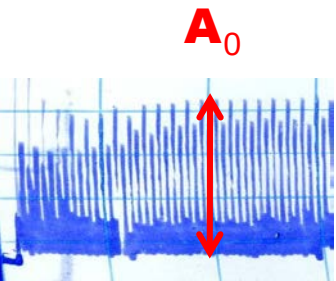
Материалы и методы

Методика	Основана на изучении силы напряжения изолированных предсердий вызванных импульсным током
Среда	Оксигенированный раствор Кребса (NaCl-120 мМ, KCl-4,8 мМ, KH_2PO_4 -1,2 мМ, MgSO_4 -2,5 мМ, NaHCO_3 -25 мМ, CaCl_2 -2,6 мМ, глюкоза-5,4 мМ, pH-7,4.)
Контроль 1 (эталон)	Для негликозидных КТ – Дофамин
Контроль 2 (препарат сравнения)	По предполагаемой фармакологической группе, например: Дофамин (адренергические), Амрион (ингибиторы ФДЭ)
Исследуемые вещества	Добавляют в среду
Исследуемые дозы	10^{-9} – 10^{-3} М
Оборудование	Установка для исследований на изолированных органах UGO BASILE (Италия): изометрический датчик, прибор самопишущий, термостатируемая ванна или термостат. Электростимулятор.
Расчетная величина	Рассчитываемый показатель: IC_{50} – концентрация вещества, при которой сила изометрического сокращения изолированного предсердия увеличивается на 50%
Исследования утверждены локальным Этическим комитетом.	

СКРИНИНГ. Поиск активных соединений

Пример регистрации амплитуды сокращения
изолированных предсердий при введении соединения

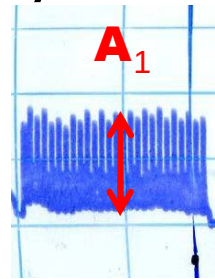
Исход



Введение
Вещества.
Инкубация
5 минут.

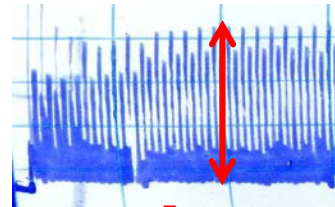
Результат

1



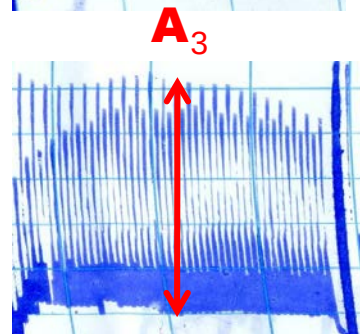
$A_0 > A_1$ – отрицательный
инотропный эффект

2



$A_0 = A_2$ – отсутствие
инотропного эффекта

3

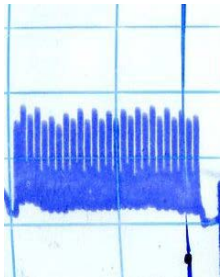


$A_0 < A_3$ – положительный
инотропный эффект

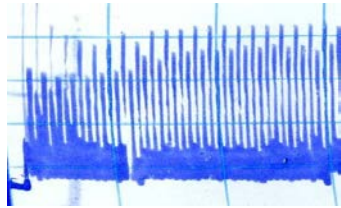
А - амплитуда

СКРИНИНГ. Расчет IC_{50} активных соединений

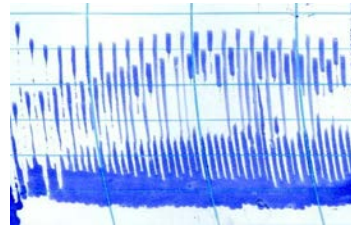
Пример регистрации амплитуды сокращения изолированных предсердий при введении соединения в разных концентрациях



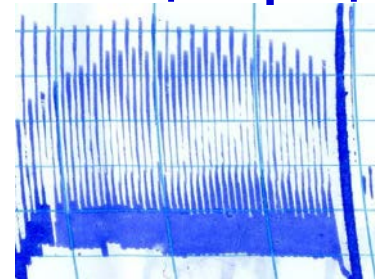
контроль



$1 \cdot 10^{-7}$ моль/л



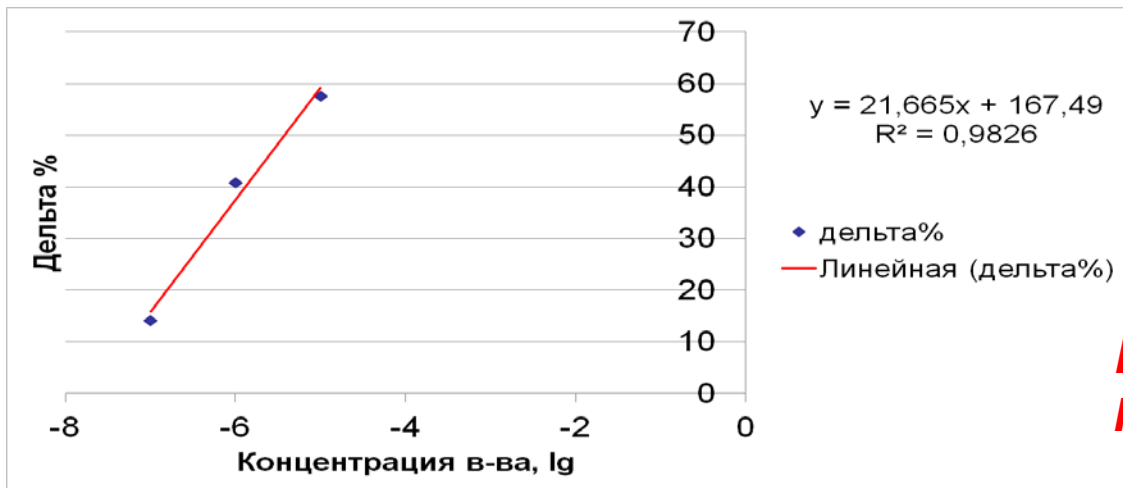
$1 \cdot 10^{-6}$ моль/л



$1 \cdot 10^{-5}$ моль/л

График зависимости кардиотонического эффекта от логарифма концентрации для вещества

Рассчитываем показатель IC_{50} по уравнению



Вещество активное, если IC_{50} вещества $< IC_{50}$ препарата сравнения

II этап. Изучение кардиотонической активности

- Изучение кардиотонической активности отобранных соединений на различных экспериментальных моделях острой и хронической сердечной недостаточности *in vivo* в сравнении с эталонными препаратами.
- По завершении II этапа необходимо определить оптимальный путь введения и схему применения соединений.

Сердечная недостаточность

- **состояние, при котором сердце не способно обеспечить кровоснабжение органов и тканей, соответствующее их метаболическим потребностям, или обеспечивает его за счет повышенной работы**

Актуальность

Основные экспериментальные модели повреждения миокарда



Патогенез острого изоротеренолового повреждения миокарда

**Острая стимуляция β -адренорецепторов
(изопротеренол п/к 20-100 мг/кг 1-3 дня)**



Выраженная тахикардия



Снижение давления в аорте



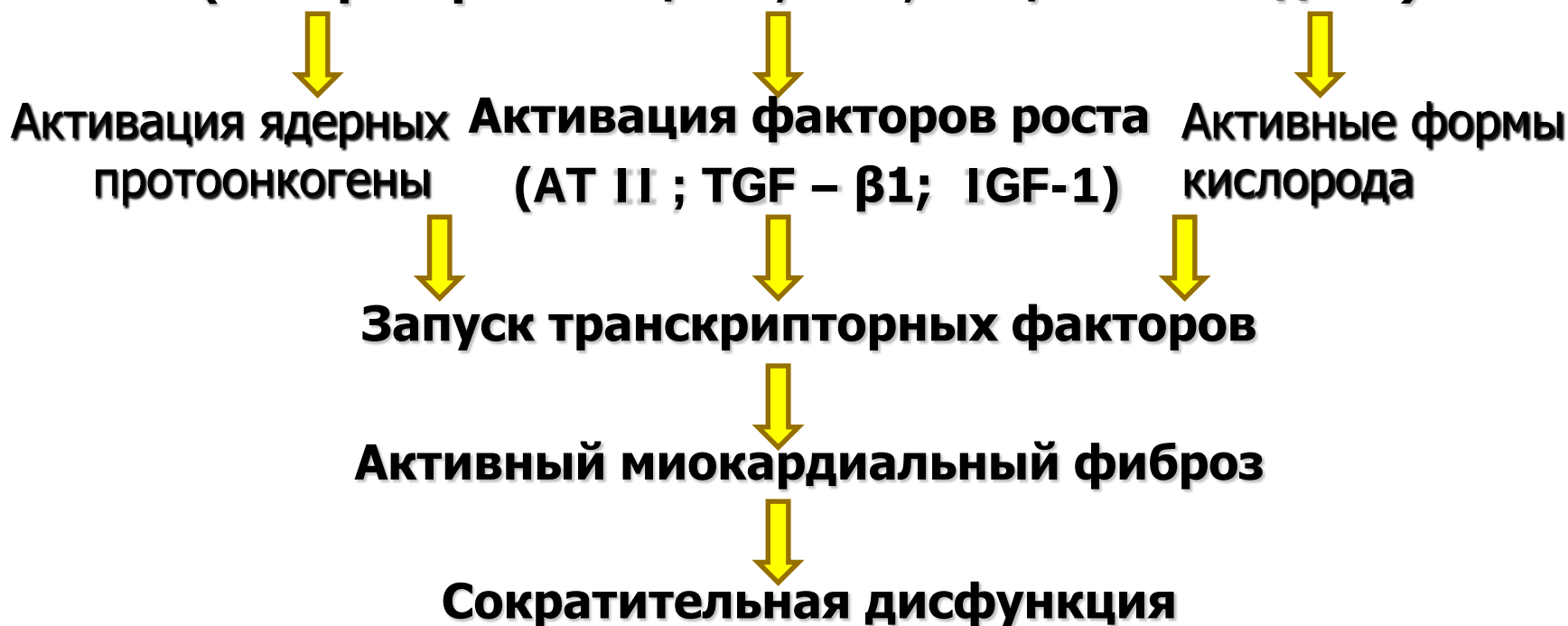
**Несоответствие между потребностью миокарда в
кислороде
и его доставкой**



Ишемия миокарда, инфарктоподобный некроз

Патогенез хронического изоротеренолового повреждения миокарда

**Хроническая стимуляция β -адренорецепторов
(изопротеренол п/к 0,02-3,0 мг/кг 1-4 недели)**



AT II – ангиотензин II; TGF – β 1 - трансформирующий фактор роста β 1; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста

Возможные критерии оценки

- **Маркеры повреждения**

Тропонин I, Креатинкиназа (КК), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ЛДГ-1, аспартатаминотрансфераза (АСТ), гликогенфосфорилаза (ГФ), миоглобин (Мг), КК-МФ, ГФ-ВВ, тропонины, коллаген и др.

- **Продукты перекисного окисления липидов**

Малоновый диальдегид (МДА), Диеновые конъюгаты (ДК) и др.

- **Состояние антиоксидантной системы**

Супероксиддисмутаза (СОД), восстановленный глутатион

- **Электрокардиографические показатели**

- **Макро- и микроморфологические исследования**

Возможные критерии оценки

■ Гемодинамические показатели

- левожелудочковое давление (ЛЖД),
- скорости сокращения ($dp/dt+$) и расслабления ($dp/dt-$),
- частота сердечных сокращений (ЧСС),
- Индексы расслабления и сократимости,
- Индекс функционирования структур
(ИФС) = $\text{ЛЖД} \cdot \text{ЧСС} / (\text{ЛЖ} + 2/3 \text{МЖП})$,
- Артериальное давление

■ Гемодинамические нагрузки

- увеличение преднагрузки (нагрузка объемом)
- увеличение постнагрузки (максимальная изометрическая нагрузка - пережатие аорты)
- тест на адренореактивность
- физические нагрузки (плавание)

Материалы и методы

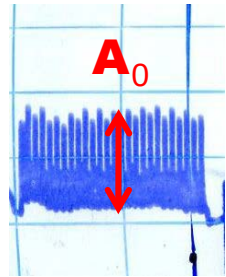
Методики	Изопротереноловое повреждение миокарда у крыс (острая и хроническая модели)
Объект исследования	24 белые беспородные крысы-самки
Наркоз	Хлоралгидрат 400 мг/кг, внутривентриально
Повреждающий агент	β -адреномиметик L-изопротеренола гидрохлорид, Sigma
Способ введения и дозы изопротеренола	I. Острая модель : подкожно, дважды с интервалом 24 часа в дозе 80 мг/кг II. Хроническая модель : внутривентриально, 2,5 мг/кг в сутки в течение 4 недель
Приборы	1. Для гемодинамических исследований: ИВЛ для мелких экспериментальных животных, электрокардиограф компьютерный, компьютерный гемодинамический анализатор. 2. Для биохимических и иммуноферментных исследований. 3. Для морфологических исследований.
Контроль	0,9% раствор NaCl в эквивалентных количествах

III этап. Углубленное изучение кардиоваскулярного действия вещества:

- — влияния на центральную гемодинамику в норме и при экспериментальной патологии;
- — влияния на кровоснабжение жизненно важных органов (сердца, мозга, почек);
- — влияния на изменение чувствительности сердца к действию аритмогенных факторов (химических, физических, нейровегетативных);
- — влияния на потребление сердцем O_2 , утилизацию глюкозы, антиоксидантное действие, митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование;
- — влияния на агрегантные свойства крови и систему гемостаза.

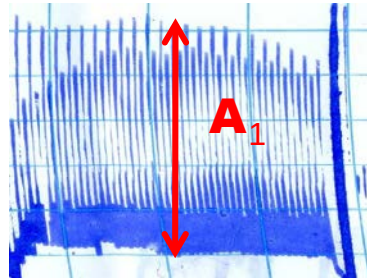
3 этап Изучение предполагаемого механизма действия *in vitro*

Исследования со специфическими агонистами (антагонистами).



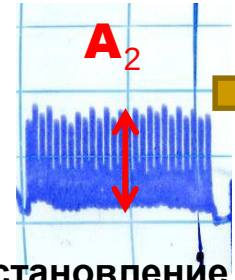
контроль

Введение
Вещества.
Инкубация
5 минут.

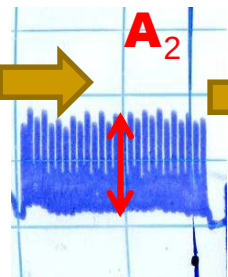


Эффект вещества

«отмыли
от вещества»

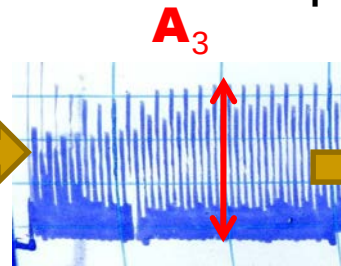


Восстановление
амплитуды: $A_0 = A_2$



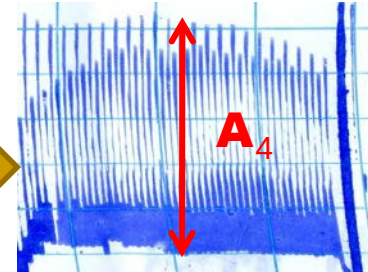
Восстановление
амплитуды: $A_0 = A_2$

Введение
известного
ингибитора
ФДЭ

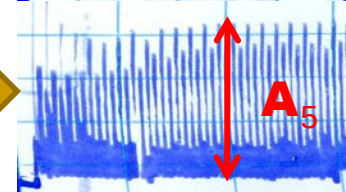


$$A_2 < A_3$$

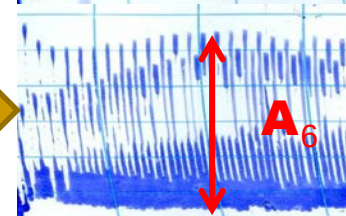
Введение
вещества.
Инкубация
5 минут.



$A_4 = A_1$
Другой
механизм
действия



$A_5 = A_3$, $A_5 < A_1$
Одинаковая
мишень
действия

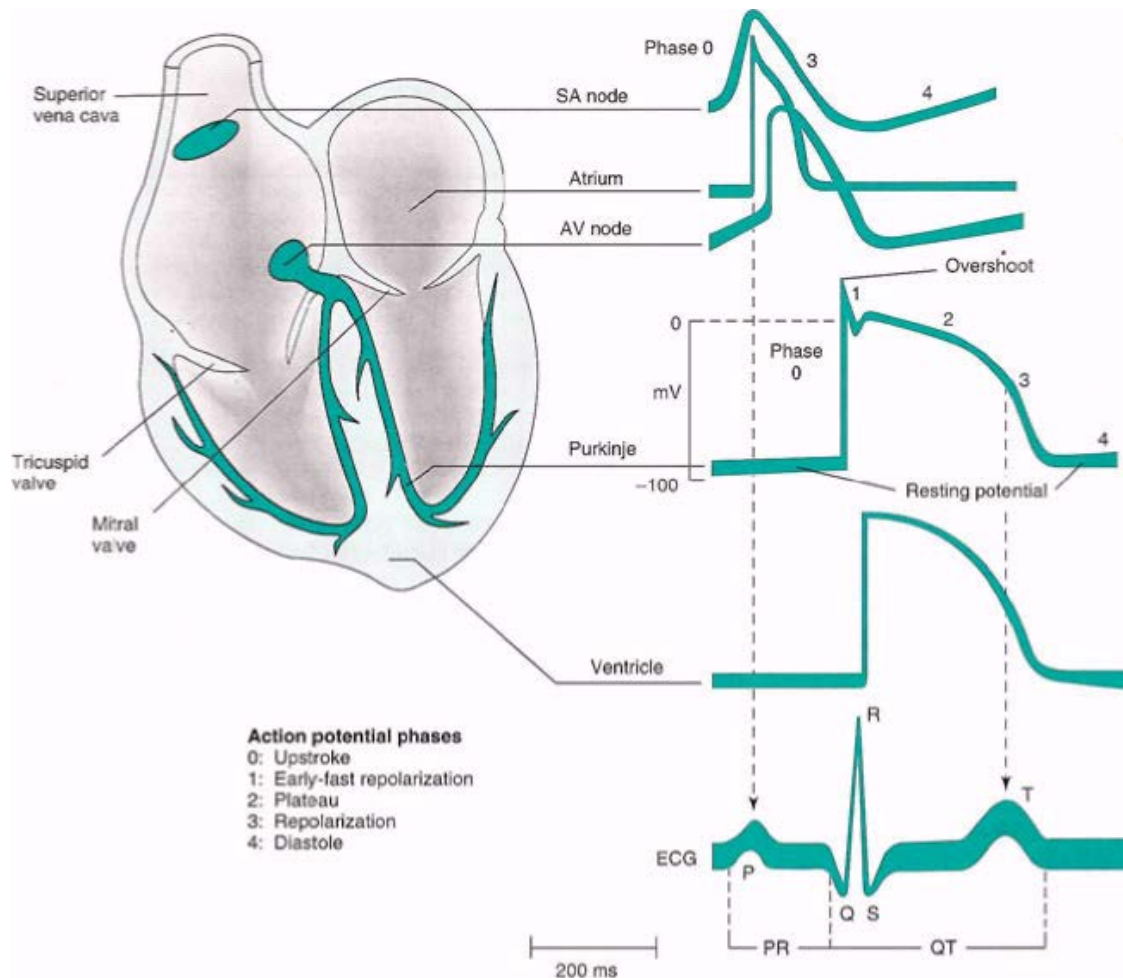


$A_6 > A_3$, $A_5 < A_1$
Неселективное
действие,
частичный
антагонист

Пример регистрации амплитуды сокращения изолированных предсердий при введении соединения на фоне специфического ингибитора ФДЭ

Антиаритмические средства

Электрофизиология нормального сердечного ритма



Импульс генерируется через равные интервалы в СА узле (частота 60-90/мин.)

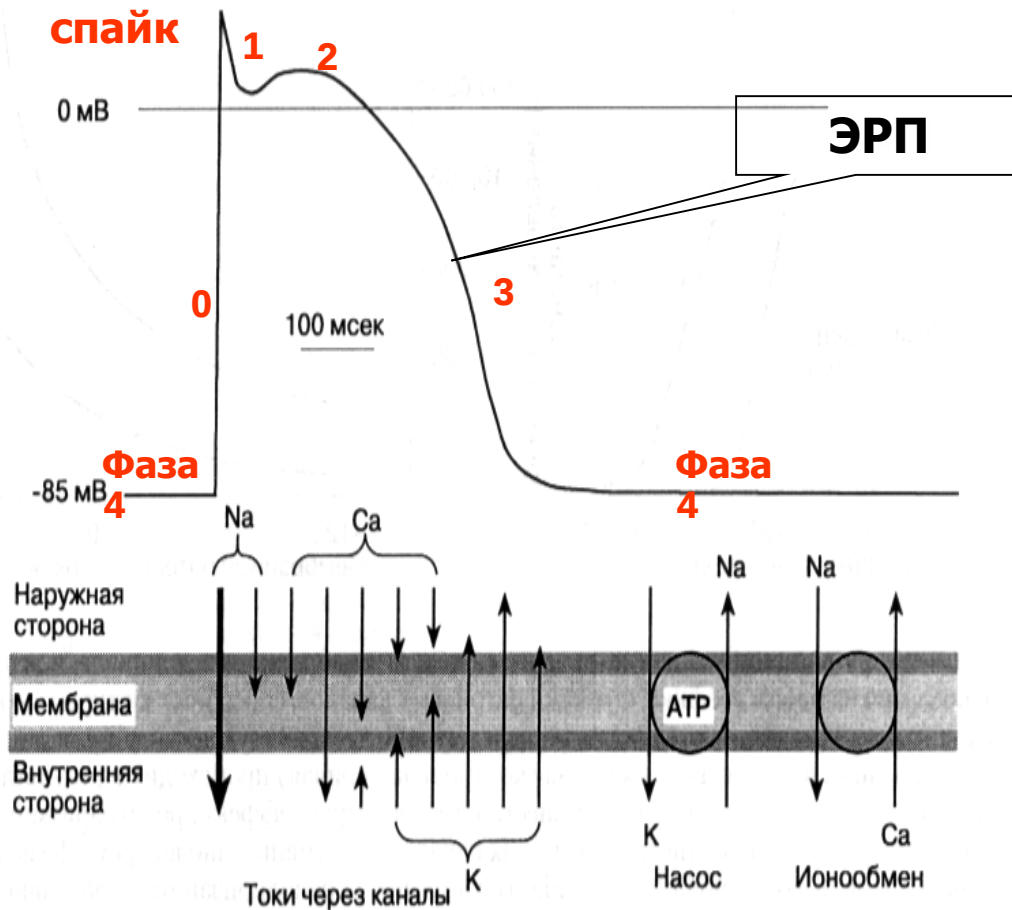
Этот импульс входит в АВ узел (прохождение через узел 0,15 с).

Далее импульс распространяется по системе Пуркинье-Гиса

Синхронное сокращение желудочков

Суммарная биоэлектрическая активность в виде стандартной электрокардиограммы

ПД в клетках Пуркинье, и сократительные кардиомиоциты предсердий и желудочков



Характеризуются быстрым ответом

Фаза 0

Быстрая систолическая деполяризация

Открытие быстрых **Na⁺** каналов (I_{Na})

Ионы поступают внутрь клетки

Фаза 1

Ранней (частичной) быстрой реполяризации

Заккрытие Na^+ каналов. Выход из клетки ионов

K⁺ (I_{to1}) и вход ионов **Cl⁻** (I_{to2})

Фаза 2

Медленной реполяризации

Плато ПД

Открытие медленных Ca^{2+} каналов

Ca²⁺ (I_{CaL}) поступает в клетку, K^+ (I_{to1} , I_K , I_{K1out}) выходит из клетки; Na^+/Ca^{2+} -обмен

Фаза 3

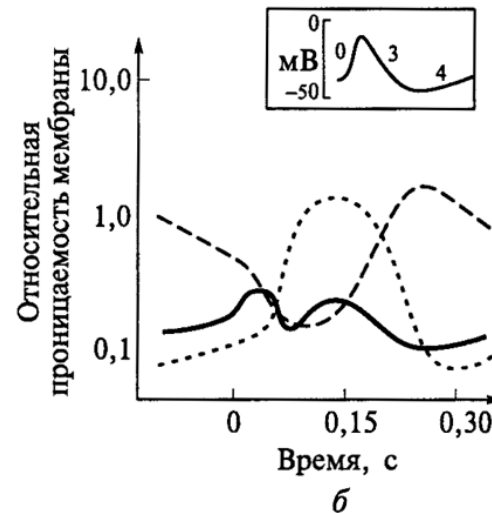
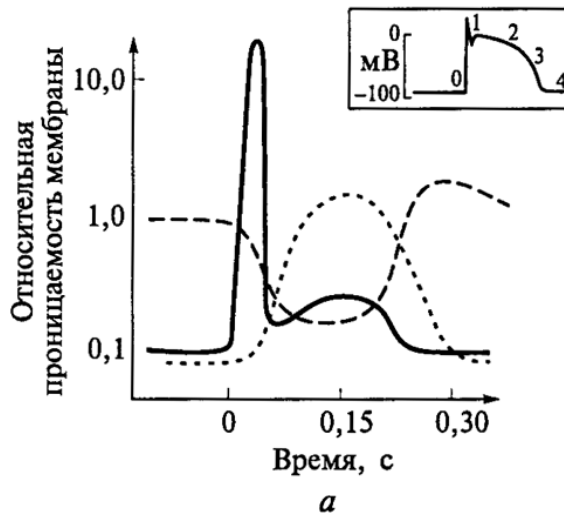
Окончательная реполяризация

Вход ионов Ca^{2+} в клетку уменьшается, выход ионов **K⁺** из клетки возрастает (I_K : I_{Kr} и I_{Ks})

Фаза 4

Диастолический потенциал (потенциал покоя) формируют токи Na^+/Ca^{2+} -обмена ($I_{Na/Ca}$) и Na^+/K^+ -насоса ($I_{Na/K-рптр}$)

ПД в клетках проводящих кардиомиоцитов синоатриального и атриовентрикулярного узлов



Изменение заряда клеточной мембраны во время ПД

а – в сократительных кардиомиоцитах

б – в проводящих кардиомиоцитах

— - ток натрия
 - - - - ток калия
 - ток кальция

Характеризуются медленным ответом

Фаза 0 Быстрая систолическая деполяризация

Медленная, низкоамплитудная. Быстрые натриевые каналы отсутствуют.

Генерируется медленным входящим током Ca^{2+} (I_{CaL}).

Фаза 1 Ранней (частичной) быстрой реполяризации Отсутствует.

Фаза 2 Медленной реполяризации Плато ПД Выражена незначительно и формируется за счет входящего кальциевого тока (I_{CaL}) и выходящих калиевых токов I_K и I_{K1}

Фаза 3 Окончательная реполяризация Не отличается.

формируется теми же трансмембранными токами:

Вход ионов Ca^{2+} в клетку уменьшаться, выход ионов K^+ из клетки возрастает (I_K : I_{Kr} и I_{Ks})

Фаза 4 Диастолический потенциал.

Величина потенциала покоя не поддерживается на постоянном уровне, а постепенно нарастает – пейсмейкерный потенциал (спонтанная диастолическая деполяризация) Na^+ (I_f), Ca^{2+} (I_{CaT}), K^+ (I_K)

Антиаритмические препараты

- группа лекарственных средств, обладающих общим свойством — способностью восстанавливать нормальный ритм сердечных сокращений

Классификация истинных антиаритмиков (Вогхан-Вилльямс)

- 1) I класс — мембраностабилизирующие средства (блокаторы Na^+ -каналов):
 - • IA класс — ЛС, умеренно замедляющие проведение и удлиняющие потенциал действия (**хинидин***, **прокаинамид***);
 - • IB класс — ЛС, минимально замедляющие проведение и укорачивающие потенциал действия (**лидокаин***);
 - • IC класс — ЛС, значительно замедляющие проведение и минимально удлиняющие потенциал действия (**флекаинид**, **морацизин*** (**этмозин**), **пропафенон***, **диэтиламинопропионилэтоксикарбониламинофенотиазин*** (**этацизин**), **лаппаконитина гидробромид***);
- 2) II класс — β -адреноблокаторы (**пропранолол***, **эсмолол***, **метопролол***);
- 3) III класс — ЛС, удлиняющие период реполяризации (**амиодарон***, **соталол***, **бретилия тозилат***, **нитрофенилдиэтиламинопентилбензамид*** (**нибентан**);
- 4) IV класс — блокаторы кальциевых каналов (**верапамил***, **дилтиазем***)

К антиаритмическим препаратам относятся так же **дигоксин***, **аденозин***, **атропина сульфат***, **препараты магния (магния сульфат*)** и **калия**.

* - выделены препараты, входящие в Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, 2010

I этап. Скрининг (первичный отбор) веществ с антиаритмическим действием

- 1. Позволяет быстро оценить наличие или отсутствие антиаритмической активности у большого количества соединений.**
- 2. Скрининг целесообразно проводить с использованием простых, легко воспроизводимых и экономичных методов (обязательно оба метода):**
 - *in vitro* на изолированных предсердиях.
 - *in vivo* на моделях аритмий, вызванных химическими соединениями.

I этап. Скрининг (первичный отбор) веществ с антиаритмическим действием

- 3. Анализ зависимости «доза–эффект».**
- 4. Определение минимальной эффективной дозы соединений (МЭК, ЕД₅₀).**
- 5. Острая токсичность (ЛД₅₀).**
- 6. Широта терапевтического действия (УТИ= ЛД₅₀ / МЭК(ЕД₅₀)).**
- 7. Антиаритмический индекс изучаемых соединений сравнивают с аналогичными показателями известных антиаритмических ЛС.**
- 8. По завершении I этапа исследований необходимо отобрать наиболее перспективные соединения.**

1 этап Скрининг *in vitro* на изолированных предсердиях

1. Позволяет быстро оценить наличие способности влиять на рефрактерность (продолжительность ПД) у большого количества соединений
2. Сравнить с эффектом препарата сравнения

Материалы и методы

Методика	Основана на усвоении изолированными предсердиями ритма навязанного импульсным током
Среда	Оксигенированный раствор Кребса (NaCl-120 мМ, KCl-4,8 мМ, KH_2PO_4 -1,2 мМ, MgSO_4 -2,5 мМ, NaHCO_3 -25 мМ, CaCl_2 -2,6 мМ, глюкоза-5,4 мМ, pH-7,4.)
Оборудование	Установка для исследований на изолированных органах UGO BASILE (Италия): изотонический датчик, прибор самопишущий, термостатируемая ванна или термостат. Электростимулятор.
Контроль	Известный антиаритмик из предполагаемого класса (например амиодарон)
Исследуемые вещества	Добавляют в среду
Исследуемые дозы	$10^{-5} - 10^{-3}$ М
Расчетная величина	МЭК - минимальная концентрация соединения, которая препятствует усвоению навязанного ритма в течении 15 секундного периода.
Исследования утверждены локальным Этическим комитетом.	

Результаты

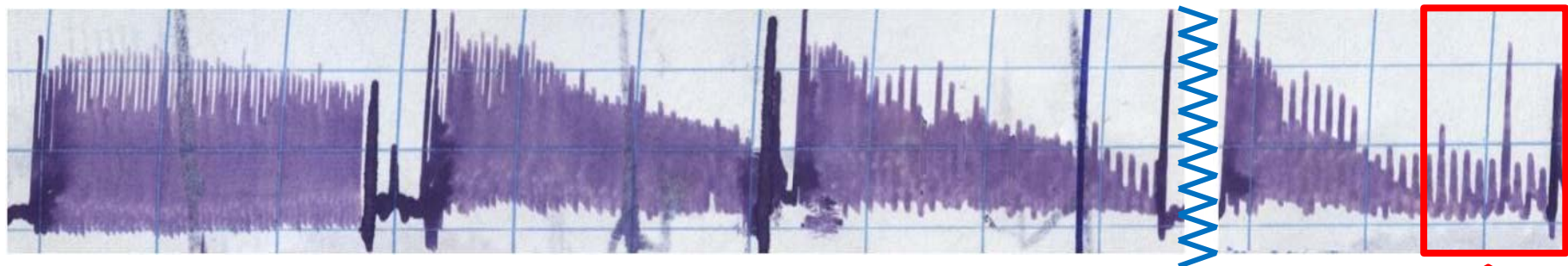


Исход

Изучаемое вещество
 $1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Изучаемое вещество
 $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Изучаемое вещество
 $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$



Нарушение навязывания ритма

Пример записи влияния соединения на усвоение изолированными предсердиями ритма навязанного импульсным током



1 этап Скрининг *in vivo* на моделях аритмий, вызванных химическими соединениями

1. Позволяет быстро оценить наличие антиаритмической активности
2. Предположить механизм действия
3. Сравнить с эффектом препарата сравнения

Основные модели аритмий, вызванных химическими соединениями

1. Аконитиновая модель нарушений сердечного ритма.

В основе аритмогенного действия аконитина лежит его способность нарушать функциональную активность быстрых трансмембранных потенциалзависимых **натриевых каналов**. Модель рассматривают для оценки эффективности антиаритмиков **I класса** по классификации E.M. Vaughan Williams. В качестве референтных препаратов IA - хинидин, новокаинамид, IB – лидокаин, IC - этмозин, этализин и др..

2. Хлоридкальциевая модель нарушений сердечного ритма.

Аритмогенная активность кальция хлорида связана с его способностью существенно повышать содержание **ионов Ca^{2+}** в кардиомиоцитах и тем самым вызывать их асинхронное возбуждение, а также в определенной мере нарушать процессы реактивации **натриевых каналов**. Модель используют для оценки эффективности **антиаритмиков IV и I B классов**. В качестве референтных препаратов антиаритмиков IV класса - верапамил и IB класса - лидокаин.

3. строфантиновая (оубаиновая) модель нарушений сердечного ритма

Аритмогенная активность строфантина связана с его способностью существенно повышать содержание **ионов Ca^{2+}** в кардиомиоцитах через блокаду Na^+/K^+ -АТФазы. В качестве референтных препаратов на этой модели используют **антиаритмики IA и IB класса**.

Основные модели аритмий, вызванных химическими соединениями

4. Адреналиновая модель нарушений сердечного ритма

Аритмогенный эффект вызван повышением активности симпатической иннервации и содержания катехоламинов, в основе которых лежит опосредованная возбуждением **β-адренорецепторов** активация медленных трансмембранных **кальциевых каналов L-типа**. В качестве референтных препаратов используют **антиаритмики II класса** (пропранолол, метопролол и др.) и **IV класса** (верапамил).

5. Хлоридбариевая модель нарушений сердечного ритма

В основе нарушений ритма сердца, вызванных бария хлоридом, лежит блокада трансмембранных потенциалзависимых **калиевых каналов**, в качестве референтных препаратов используют **антиаритмики III класса** (амиодарон, дофетилид, соталол и др.).

Основные модели аритмий, вызванных химическими соединениями

Схема исследования

- **Контроль**
- **Профилактическое введение**
- **Критерии**
- **Лечебное введение**
- **критерии**

II этап. Исследование активности и спектра антиаритмического действия

- 1. Изучение активности отобранных соединений на различных моделях нарушений сердечного ритма, воспроизводящих:**
 - — **наджелудочковые** нарушения сердечного ритма;
 - — **желудочковые** нарушения сердечного ритма;
 - — **реперфузионные нарушения** сердечного ритма;
 - — **фибрилляцию** различных отделов сердца.
- 2. Изучение эффективности изучаемых соединений проводится в сравнении с референтными антиаритмическими ЛС.**
- 3. Поскольку антиаритмические ЛС часто используются у пациентов, страдающих коронарной болезнью сердца, в том числе острым коронарным синдромом, необходимо оценить **антиишемическую активность** отобранных соединений.**
- 4. По завершении II этапа необходимо определить оптимальный путь введения и схему применения соединений.**

Исследование активности изучаемых соединений на наджелудочковых моделях нарушений сердечного ритма

- **Электрические трепетания предсердий.**
- **Трепетание предсердий вызванные аппликацией на правое предсердие аконитина хлорида или бария хлорида.**
- **Порог навязанного ритма (порог фибрилляций).**
- **Нейрогенные (n. vagus) фибрилляции предсердий.**

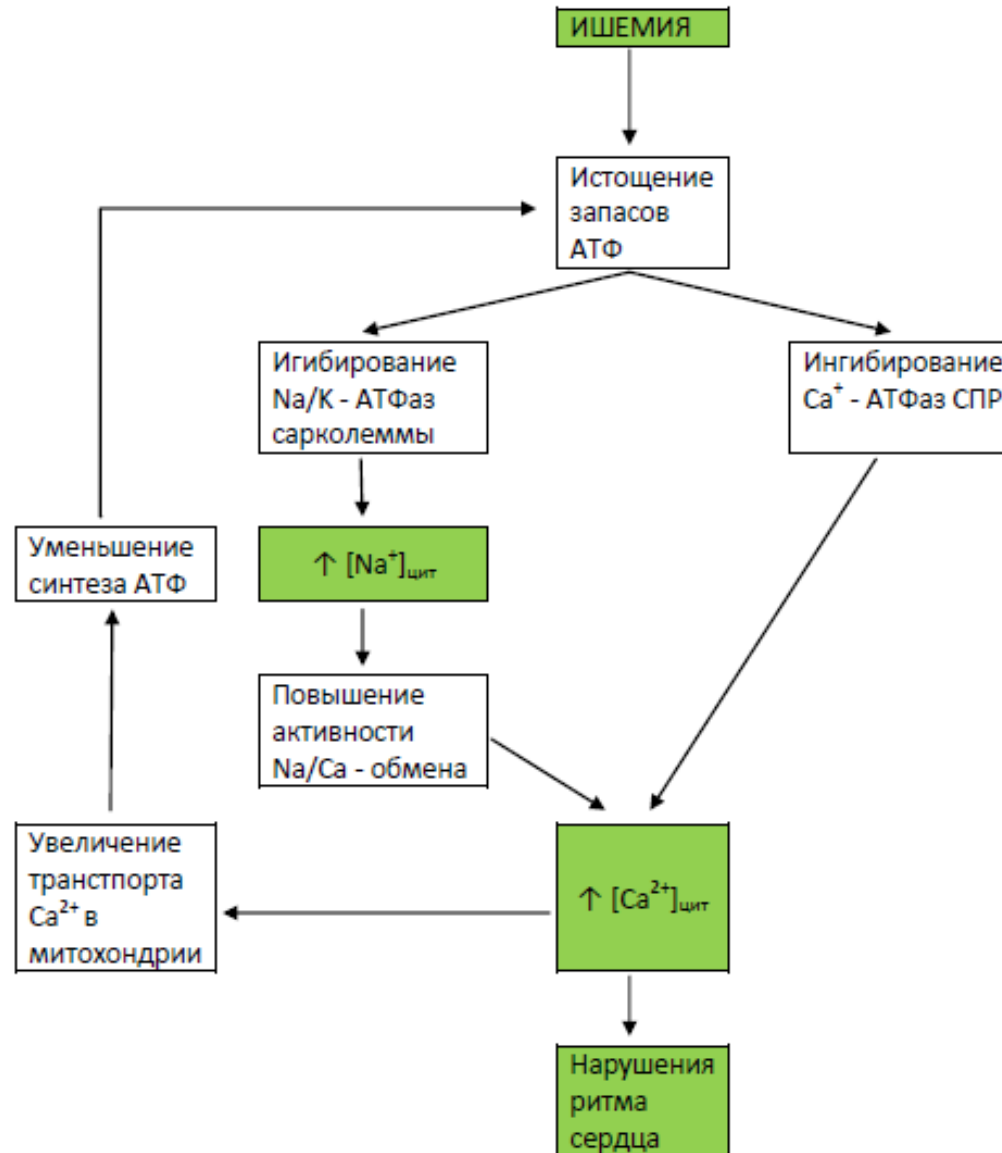
Исследование активности изучаемых соединений на желудочковых моделях нарушений сердечного ритма

- **Исследование эффективности изучаемых соединений на модели двустепенной перевязки коронарной артерии.**
- **Желудочковые аритмии, вызванные цезия хлоридом.**
- **Модели реперфузионных аритмий.**
- **Порог навязанного ритма (порог электрических фибрилляций желудочков).**

Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений при нарушениях сердечного ритма центрального генеза

- **Аритмии, вызванные введением в IV желудочек мозга аконитина, строфантина К и цезия хлорида.**
- **Аритмии, индуцированные электрораздражением нейроструктур головного мозга.**
- **Влияние на центральные звенья симпатической регуляции сердечного ритма.**

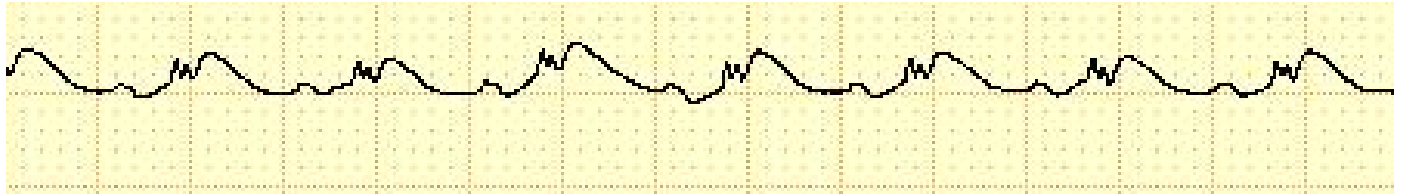
Пример постреперфузионных нарушений ритма. Патогенез.



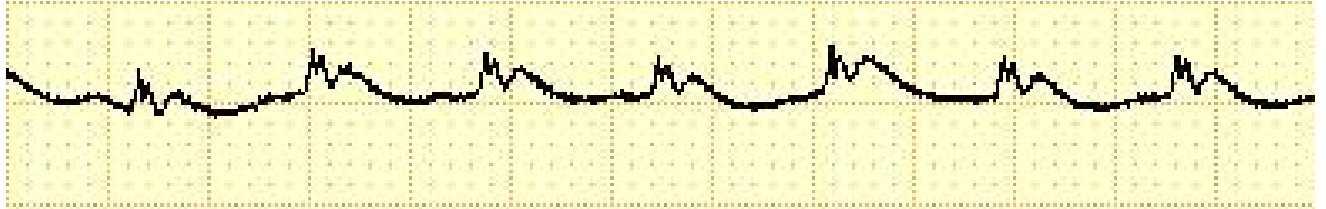
Пример постреперфузионных нарушений ритма. Результаты:

контрольное животное

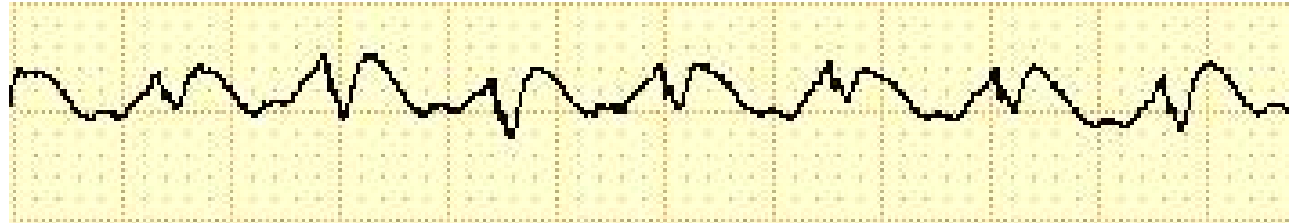
исход



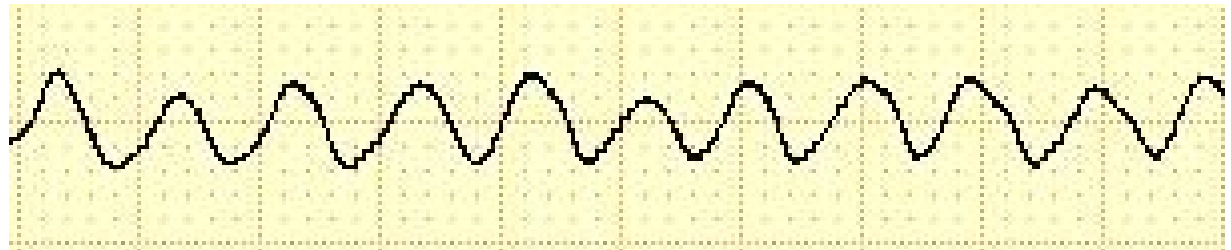
5 минут
после введения
физ.раствора



ишемия 7 минут



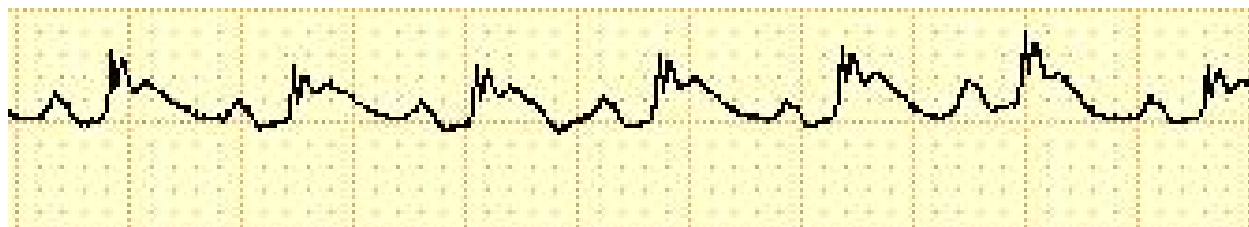
реперфузия
(фибрилляция)



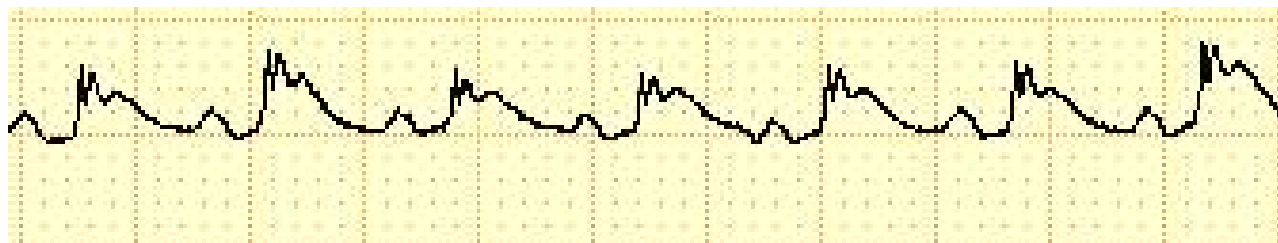
Пример постреперфузионных нарушений ритма. Результаты:

амиодарон в дозе 5мг/кг

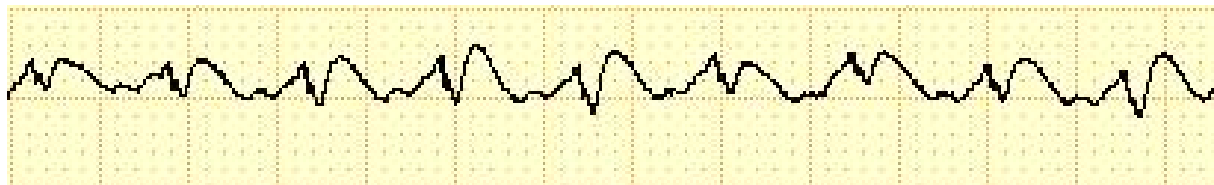
исход



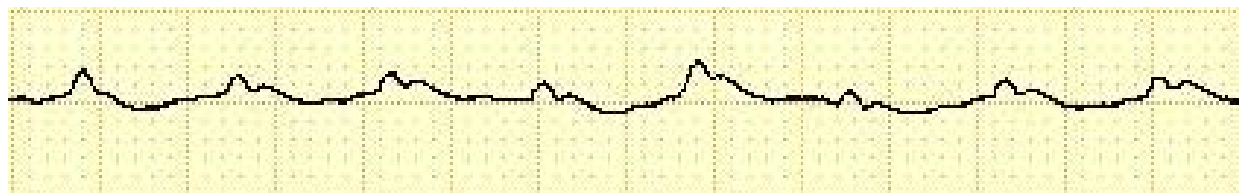
введение
амиодарона



ишемия 7 минут



реперфузия



III этап – Исследование механизма действия соединений *in vivo* и *in vitro* и особенностей их рецепторного действия

- **Параметры ЭКГ.**
- **Трансмембранные ионные токи (Метод patch-clamp).**
- **Влияния изучаемых соединений на ионный гомеостаз в кардиомицитах крыс.**
- **Метод радиолигандного связывания для исследования спектра взаимодействия изучаемых соединений с мембранными рецепторами различных типов.**
- **Исследование проаритмического действия изучаемых соединений.**

Современное оборудование ССС лабораторий

- Система регистрации и автоматизированного анализа ЭКГ у бодрствующих животных.
- Система неинвазивного измерения давления.
- Приборы для телеметрической регистрации биопотенциалов (ЭКГ, ЭМГ, ЭЭГ), давления и активности симпатической нервной системы.
- Гемодинамическая установка с программным обеспечением.
- Лазерный доплерограф .
- Стимулятор электрофизиологический.
- Аппаратура для локальной фиксации потенциала (patch-clamp & voltage-clamp).
- Прибор для работы на изолированных органах.
- Система «работающего сердца».
- Ультразвуковой сканер для изучения сердца и сосудов неинвазивным способом.
- Магнитно-резонансный томограф для малых лабораторных животных.
- ИВЛ для мелких экспериментальных животных.
- Инфузионный насос.
- Система для поддержания температуры тела для крыс.