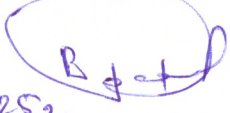


В печать

На правах рукописи

Председатель Диссертационного
совета 68.1.005.01

19.06.2025г.  В. А. Баринков

МЕЛЕХОВА

Александра Сергеевна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА,
ВЫЗЫВАЕМОГО КАРБАМАТАМИ

3.3.4. Токсикология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель: **Зорина Вероника Николаевна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Афанасьев Василий Владимирович**

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры скорой медицинской помощи

Федонюк Владимир Петрович

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты), старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства

Защита состоится «___» _____ 2025 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.005.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте (<http://www.toxicology.ru>) Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Автореферат разослан

«___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 68.1.005.01
доктор медицинских наук, профессор

Луковникова Любовь Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Известно, что от 2 до 5% населения Земли испытывали приступ судорог как минимум один раз в жизни [Кондратьев А.Н., 2017; Phillips H.N., et al., 2020]. Помимо истинной хронической эпилепсии, значительную медико-социальную проблему представляет судорожный синдром на фоне острых интоксикаций химическими веществами нейротропного действия, включая последствия внештатных ситуаций, аварий и нарушений техники безопасности на производстве и при проведении сельскохозяйственных работ, бытовые отравления, передозировку лекарственных средств, террористические акты [Элленхорн М. Дж., 2003; Куценко С.А., 2004; Alozi M., Rawas-Qalaji M., 2020; Mudryanselage A.W. et al. 2023]. Во всем мире отмечается прогрессирующий рост количества как непреднамеренных острых отравлений, так и суицидальных отравлений пестицидами, которые в отдельных странах мира являются одним из самых распространенных способов суицидальных решений [Eddleston M., 2019]. Острые интоксикации пестицидами, гербицидами и инсектицидами на основе ингибиторов холинэстераз составляют до 50% от госпитализаций по причине токсического отравления и часто приводят либо к продолжительной утрате трудоспособности, либо к инвалидности, чем наносят выраженный социально-экономический ущерб [Гладких В.Д., 2014; King A.M., et al. 2015; Alozi M., et al. 2020; Chuang, M.C., et al.; 2018 Jungers G., et al., 2022]. При тяжелой интоксикации ингибиторами холинэстераз значительная часть пострадавших умирает от внебольничной остановки сердца [Курдиль Н.В., 2015; Alozi M., et al. 2020; Reddy B.S., et al 2020]. У переживших острый период интоксикации с выраженным судорожным синдромом наблюдаются проявления нарушений когнитивных и поведенческих функций, обнаруживаются нейродегенеративные изменения в областях мозга, ассоциированных с формированием судорог [Головко А.И. и др., 1996; Mangaly A.J. et al. 2023]. При этом в Российской Федерации за период 2000-2020 гг. объемы применения пестицидов увеличились в 2 раза, площадь обрабатываемых культур – в 3 раза [Михайликова В.В.; 2021].

Сложные эфиры и соли карбаминовой кислоты (карбаматы), как и ФОС, способны ингибировать активный центр ацетил- или бутирилхолинэстеразы (АХЭ и БХЭ соответственно), однако далее наблюдается спонтанное декарбамирование фермента в пределах 4-6 часов, в отличие от ФОС, формирующих необратимую связь [Куценко С.А. 2004]. В настоящее время известны сотни химических веществ класса карбаматов синтетического и растительного происхождения. И, если ингибирующее действие карбаматов как таковое активно используется в бытовой химии и агрохимикатах, то обратимое антихолинэстеразное действие и способность быстро преодолевать гематоэнцефалический барьер у человека широко применяется при разработке лекарственных средств (прозерин, калимин, убретид, экселон и др.) и антидотов (пиридостигмина бромид, аминостигмин). При этом некоторые карбаматы настолько

высокотоксичны, что рассматриваются в качестве потенциальных средств химического терроризма [Софронов Г.А., 2012; Гладких В.Д., 2014; Kumar S., et al. 2023]. В последнее время появляется все больше подтверждений тому, что патогенез отравлений ингибиторами холинэстераз включает проявления нехолинергической токсичности, наблюдаются изменения гормонального фона, отмечается негативное влияние на цикл Кребса и функции митохондрий, при этом особенности механизмов воздействия карбаматов на организм отличаются от ФОС [Leung M.C.K., et al., 2019; Mudyanselage A.W., et al., 2023].

Атропина сульфат является классическим антидотом в случае острой интоксикации ФОС и при отравлении карбаматами [Petreski T., 2020; Silberman J., 2023] совместно с препаратами бензодиазепинового ряда, эффективность которых значительно ограничена во времени (до 15 минут от начала воздействия), при длительной транспортировке пострадавших судороги могут рецидивировать, а повторное введение антидотов уже малоэффективно [Myhrer T., et al., 2014; Одинак М.М., и др., 2015; Jett D.A., et al. 2020].

Таким образом, поиск и разработка новых средств терапии при отравлении карбаматами является актуальной задачей современной токсикологии. Однако при проведении подобных работ необходимо учитывать и особенности патогенеза интоксикаций обратимыми ингибиторами холинэстераз. Соответственно, для экспериментального подтверждения эффективности новых средств терапии судорожного синдрома при отравлении карбаматами необходима адекватная модель на основе карбамата как модельного токсиканта.

Степень разработанности темы. Известно, что симптоматика острых отравлений карбаматами сходна с проявлениями интоксикации ФОС и обусловлена гиперстимуляцией холинергических нейромедиаторных процессов. Одним из основных клинических проявлений тяжёлой формы острого отравления карбаматами является судорожный синдром [Капашин В. П., 2007; Гладких В.Д., 2017; Mudyanselage A.W. et al. 2023]. Развитие судорожного синдрома, обусловленное на начальном этапе холинергической стимуляцией, в дальнейшем сопровождается гиперактивацией глутаматергической нейромедиаторной системы ЦНС. Поскольку используемый при отравлениях антихолинэстеразными веществами в качестве антидота и в нашей стране и за рубежом атропин [Софронов Г.А., 2012; Reddy D.S., et al., 2020] отличается слабо выраженной противосудорожной активностью, связанной с его преимущественно периферической М-холиноблокирующей активностью [Бова А.А., 2005; Куценко С.А. 2004], а бензодиазепины, как и Атропин, медленно преодолевают гематоэнцефалический барьер [Reddy D.S., 2019], различные научные группы разрабатывают новые мультитаргентные препараты, отличающиеся комплексным М-холиноблокирующим и глутамат (NMDA)-блокирующим действием [Raveh L., 2014; Tsai Y.H., 2021], Активно изучаются перспективные противосудорожные средства на основе вальпроевой кислоты при интоксикации ФОС, однако ни одно из них не зарегистрировано как противосудорожное средство или антидот [Haines K.M., 2019; Bibi D., 2020]. Целенаправленной

разработки и тестирования средств терапии отдаленных последствий острой интоксикации фактически не ведется (применяется симптоматическая терапия) [Хоффман Р., и др., 2010; Al-Otaibi F., 2019; Amengual-Gual M., et al., 2019], средств, направленных именно на предотвращение развития нейротоксических нарушений – последствий отравлений конвульсантами также не описано. Обращает на себя внимание, что, при разработке лекарственных средств, применяются экспериментальные модели на основе фосфорорганических БОВ (Зарин, VX), диизопропилфторфосфата или дихлорфоса [Jazayeri A., et al., 2013; Haines K.M., et al., 2019; Reddy D.S., et al., 2020], описания экспериментальных моделей судорожного синдрома на основе обратимых ингибиторов холинэстераз в научной литературе не обнаружено.

Цель и задачи исследования. Цель работы – экспериментальное обоснование эффективности новых средств фармакотерапии токсического судорожного синдрома на модели острого отравления карбаматом.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Оценить характер токсического судорожного синдрома при введении лабораторным животным (крысам) фенилового эфира карбаминовой кислоты (Фенилкарбамата).
2. Разработать модель генерализованного судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом для скрининга новых средств экспериментальной терапии.
3. Оценить эффективность новых перспективных средств купирования судорожного синдрома при острой интоксикации Фенилкарбаматом.
4. Оценить эффективность зарегистрированных лекарственных препаратов для профилактики последствий острой интоксикации Фенилкарбаматом.
5. Сравнить эффективность применения лекарственных средств нейромедиаторного и нейромодуляторного действия профилактики последствий нейротоксических нарушений при отравлении Фенилкарбаматом.

Научная новизна работы. Впервые разработана экспериментальная модель судорожного синдрома, вызываемого внутрибрюшинным введением судорожного агента из группы карбаматов (Фенилкарбамата) лабораторным животным (крысы). Установлено, что судорожный синдром при тяжёлом отравлении экспериментальных животных Фенилкарбаматом по длительности и выраженности соответствует генерализованному судорожному синдрому у человека. Показано, что острая интоксикация Фенилкарбаматом (ФК), помимо развития генерализованного судорожного синдрома, наблюдающегося в течение 1,5 часов, приводит к формированию структурных повреждений головного мозга (нейровоспалению и нейродегенерации), а также к изменению ряда биохимических показателей периферической крови провоспалительной направленности, наблюдаемых в течение длительного времени после полного прекращения судорог (до 14-21 дня). Установлено отсутствие прямой зависимости между степенью угнетения активности АХЭ, выраженностью и продолжительностью судорог при тяжёлом отравлении

Фенилкарбаматом, а также при фармакологической коррекции судорожного синдрома. Впервые показано, что мультитаргетный лекарственный препарат Карамифен (блокатор М-холинорецепторов и NMDA-рецепторов) демонстрирует выраженную эффективность при купировании судорог, развивающихся на фоне введения токсической дозы Фенилкарбамата. Эффективность тригексифенидила, также воздействующего на глутаматергическую нейромедиаторную систему, была выражена в меньшей степени, но статистически достоверна.

Впервые изучено специфическое (противосудорожное) действие аминоэфиров вальпроевой кислоты при тяжёлой форме отравления Фенилкарбаматом в эксперименте. Продemonстрировано, что гидрохлорид N-метилпиперидинового эфира вальпроевой кислоты отличается выраженной терапевтической эффективностью (предотвращает летальность животных, достоверно уменьшает выраженность и продолжительность судорожного синдрома).

Теоретическая и практическая значимость исследования. Разработка новой экспериментальной модели токсического действия производного карбаминовой кислоты на лабораторных животных позволила изучить воздействие ФК на функции живого организма и выявить ряд патогенетических особенностей, включая развитие воспалительных проявлений и метаболических нарушений, влияющих на показатели крови, а также патоморфологические изменения тканей мозга в течение длительного периода наблюдений (до 21 дня) на фоне отсутствия выраженных нарушений поведения и когнитивных функций, что обосновывает необходимость профилактики неврологических нарушений у переживших острую интоксикацию даже в случае, если выраженные нарушения здоровья и поведения отсутствуют. Выявлены новые механизмы лечебного действия ряда лекарственных средств и перспективных субстанций при купировании судорожного синдрома, развивающегося после введения карбамата в организм, обосновывающие новые направления разработки эффективных средств фармакотерапии. При введении крысам Карамифена, Тригексифенидила, Диферидина (нейромедиаторного действия), а также аминоэфира вальпроевой кислоты (вещество нейромодуляторного действия) на фоне тяжёлой интоксикации ФК, экспериментально подтверждена их высокая противосудорожная активность и предупреждение летальности по сравнению с существующими антидотами. По результатам оценки механизмов действия и эффективности гидрохлорида N-метилпиперидинового эфира вальпроевой кислоты установлена перспективность дальнейшей разработки противосудорожных средств на основе солей аминоэфиров вальпроевой кислоты для лечения острых интоксикаций обратимыми ингибиторами холинэстераз.

Методология и методы исследования. Методология включала: поиск и анализ научной информации для постановки научной задачи; выбор методик исследования; планирование и осуществление экспериментов; описание, статистическую обработку и анализ полученных результатов исследования. Методические подходы: экспериментальное моделирование токсического судорожного синдрома с комплексным исследованием влияния токсиканта на

центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему, оценкой клинического состояния животных, биохимических процессов, определением токсикометрических параметров токсиканта, патоморфологических работ, статистическая обработка результатов, обоснование новых подходов к противосудорожной (антидотной) терапии токсического судорожного синдрома с применением оригинальных субстанций и зарегистрированных лекарственных форм с альтернативными показаниями к применению. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с нормативной документацией: ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice (Принципы надлежащей лабораторной практики))», ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, рекомендациями №33 ЕЭК от 14.11.2023 г. «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Положения, выносимые на защиту:

1. Острая интоксикация лабораторных животных (белых крыс) фениловым эфиром диметилкарбоновой кислоты (Фенилкарбаматом) сопровождается развитием токсического судорожного синдрома, соответствующего по продолжительности и выраженности генерализованным судорогам у человека.

2. Разработанная экспериментальная модель генерализованного судорожного синдрома, продемонстрировала, что острая интоксикация Фенилкарбаматом приводит к формированию воспалительных проявлений и метаболических нарушений, влияющих на показатели крови в течение длительного времени, а также к развитию структурных нейрональных повреждений в ЦНС, при этом не выявляется взаимосвязь между степенью угнетения активности ацетилхолинэстеразы, выраженностью и продолжительностью судорог, не наблюдаются выраженные нарушения двигательной активности.

3. Экспериментальная оценка эффективности средств купирования судорожного синдрома и профилактики его последствий с использованием новой модели острой интоксикации Фенилкарбаматом выявила, что наиболее перспективными средствами из числа изученных являются Карамифен и оригинальный аминокэфир вальпроевой кислоты (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид.

4. При профилактике отдаленных последствий острой интоксикации Фенилкарбаматом наилучшее воздействие на поведение животных оказывает Мемантин, снижению выраженности повреждения нейронов головного мозга наиболее эффективно способствуют Ноопепт и Мексидол.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждается достаточным количеством использованных лабораторных животных (аутбредных крыс) в количестве 900 особей и полученных экспериментальных данных, использованием

современного оборудования и адекватных методов исследования, включая методы статистической обработки полученных результатов. Работа одобрена на заседании комитета по биоэтике (Протокол № 17/16 от 29.12.2016, № НИР/3-2018 от 27.12.2018, № 2/23 от 06.04.2023).

Диссертационное исследование выполнено в рамках плановых тем научно-исследовательских работ (НИР) Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России), ныне Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России), включая НИР шифр «Антитон» (2015-2017 гг); НИР шифр «Антитон-2» (2018-2020 гг); НИР шифр «Антистатус» (2020-2023 гг).

Основные теоретические положения и практические результаты работы докладывались на: XI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, 2016 г.; II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты», Томск, 2017 г.; III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», Санкт-Петербург, 2018 г., XVIII ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», Санкт-Петербург, 2022 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в рецензируемых журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией (ВАК), 1 монография «Антиконвульсанты в токсикологической практике» в соавторстве, получено 2 патента РФ на изобретение (Патент РФ № 2714135 С1. «Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью», Патент РФ №2754133. «Гидрохлориды замещенных 2-[(диметил)метил] арилдиметилкарбаматов, обладающие антихолинэстеразной активностью»).

Внедрение результатов. Полученные результаты использованы в Методических рекомендациях «Разработка методологии диагностики и фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия» (МР ФМБА России 12.08-18), утверждённых и введённых в действие Федеральным медико-биологическим агентством «28» февраля 2018 г., внедрены в учебный процесс кафедры военной токсикологии и медицинской защиты федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации в рамках дополнительной профессиональной программы переподготовки по специальности «Токсикология» по теме «Вещества нейротоксического действия, акт внедрения от 02.04.2025.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в: составлении плана работ (80%), поиске и анализе научной литературы (80%), экспериментальных

исследованиях (90%), статистическом анализе полученных данных (80%), подготовке публикаций (80%), написании диссертации и автореферата (100%).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 186 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, главы с изложением материалов и методов исследования, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, который содержит 160 наименований, из них 56 отечественных и 104 иностранных. Работа иллюстрирована 67 таблицами и 56 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор современной научной литературы по проблеме токсического судорожного синдрома, включая описание и анализ механизмов развития и особенностей протекания при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия, а также подходов к его терапии. Во второй главе представлены материалы и методы исследований. В третьей, четвертой и пятой главах представлены результаты исследований. Полученные результаты обобщены в виде заключения, выводов и практических рекомендаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование проводилось в два этапа:

- 1) разработка новой экспериментальной модели судорожного синдрома;
- 2) изучение специфической активности перспективных средств терапии интоксикации производными карбаминовой кислоты.

В экспериментальной работе применялись здоровые аутбредные крысы возрастом от 3 месяцев с массой тела 180-250 г ($n=900$) из питомника Ленинградской области ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Животные содержались в условиях вивария, при контролируемой температуре $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности воздуха 30-70%, световой режим – день/ночь, 12/12 часов в соответствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016, корм и вода выдавались *ad libitum*. Животные распределялись по группам методом стратификации по критерию массы тела. При выведении животных из эксперимента применяли эвтаназию путем ингаляции CO_2 на установке Open Science, Россия.

В качестве модельного токсиканта применялся Фенилкарбамат (фениловый эфир карбаминовой кислоты: гидрохлорид замещенного 2[(диметиламино)метил]арилдиметилкарбамата ($\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$)), вводимый внутривентрикулярно в дозах 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг в виде водного раствора в объёме 0,1 мл/100 г массы тела. Оригинальное соединение синтезировано в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России под руководством Беспалова А.Я. и защищено патентом РФ на изобретение. Для сравнения использовали судорожные агенты: Коразол (Пентилентетразол, 6,7,8,9-тетрагидро-5Н-тетразоло(1,5-а)азепина,

$C_6H_{10}N_4$), производитель Sigma-Aldrich, введение осуществляли подкожно в дозе 40 мг/кг (субсудорожная), 65 мг/кг (судорожная), и Тиосемикарбазид (амид гидразинотионкарбоновой кислоты, CH_5N_3S), ресинтезирован в лаборатории синтеза ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, вводили подкожно (в холку животного) в дозе 5 мг/кг (субсудорожная), 8 мг/кг (судорожная).

Для определения среднесмертельных доз (LD_{50}) фенилкарбамата (ФК) при внутрибрюшинном и внутрижелудочном путях введения использовали табличный экспресс-метод по В.Б. Прозоровскому.

Выраженность судорожного синдрома у животных определяли визуально по модернизированной шкале Racine. Также оценивались: латентный период наступления судорог (в минутах); выраженность судорожного синдрома (в баллах); продолжительность судорог (в минутах); летальность животных при судорогах (в процентах). Для оценки поведения, двигательной активности, памяти использовались тест «Открытое поле» с помощью системы VideoMot2, TSE, Германия, тест «УРПИ» (условной реакции пассивного избегания) в двухкамерной установке PACS-30 (Columbus Instruments, США), тест «ТЭИ» (экстраполяционное избегание), для оценки состояния нейромоторных функций использовали тест «Сила хвата» с помощью анализатора системы хватки «Bioseb GS3». Для оценки деятельности сердечно-сосудистой системы проводили электрокардиографическое исследование (ЭКГ) во II отведении на приборе электрокардиограф ветеринарный «Поли-Спектр-8В».

Исследуемые средства терапии судорожного синдрома вводили однократно, внутрибрюшинно, через 1 минуту после наступления судорог: Атропина Сульфат®, доза 1 мкг/кг; Реланиум®, доза 2 мг/кг; Карамифен, доза 50 мг/кг, Тригексифинидил, доза 47 мг/кг; Дифередин, доза 50 мг/кг; Диметиламиноэтиловый эфир вальпроевой кислоты сукцинат (образец №1), доза 43мг/кг; Йодметилат диметиламино-этилового эфира вальпроевой кислоты (образец №2) доза 43мг/кг; N - метилпиперидиновый эфир вальпроевой кислоты хлоргидрат (образец №3), доза 43мг/кг; Йодметилат N – метилпиперидиновый эфир вальпроевой кислоты (образец №4) доза 43мг/кг.

Средства профилактики и терапии соматогенной фазы острой интоксикации вводили ежедневно в течение 7 дней, внутрижелудочно: Мексидол®, доза 122 мг/кг; Мемантин®, доза 54 мг/кг; Циклодол®, доза 47 мг/кг; Ноопепт®, доза 25,7 мг/кг.

Биохимические показатели крови, а также показатели антиоксидантной системы (АОС), включая восстановленный глутатион (ВГ), малоновый диальдегид (МДА), супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (ГП) в плазме крови и эритроцитарной взвеси изучали на биохимическом анализаторе «А-25» («BioSystems», Испания). Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли по методу Элмана. Гистологические исследования тканей мозга проводили методом люминесцентной микроскопии. Для оценки количества TUNEL -позитивных клеток в

височной коре крыс применялся набор для изучения апоптоза TUNEL In Situ (Green, FITC), One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Elabscience® E-CK-A320). Изображения срезов головного мозга анализировались с обработкой в программе VideoTest Software. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка экспериментальной модели судорожного синдрома при острой интоксикации Фенилкарбаматом. В результате определена ЛД₅₀ Фенилкарбамата (ФК), составившая $1,43 \pm 0,12$ мг/кг при внутрибрюшинном и $10,0 \pm 0,77$ мг/кг при внутривенном введении. На основании полученных данных ФК относится ко 2 классу опасности (высокотоксичные) химической продукции в соответствии с ГОСТ 32419-2022. Для обеспечения воспроизводимости, простоты реализации и минимизации субъективных различий при разработке экспериментальной модели для скрининга фармацевтических субстанций выбрано внутрибрюшинное (в/б) введение.

Изучено влияние четырех доз ФК (0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг) на основные характеристики судорожного синдрома в эксперименте на крысах. В группе, получившей 3 мг/кг, наблюдалась 100 % летальность через час наблюдений, при введении 1 мг/кг – 12,5% (1 гибель в промежутке 40-50 минут), в группах с более низкими дозами летальность отсутствовала.

На рисунке 1 представлена динамика средних значений балльной оценки судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine после введения ФК. По литературным данным судороги 3-4 уровня и выше эквивалентны генерализованным клонико-тоническим судорогам у человека, приемлемый профиль продемонстрировали дозы 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, однако при анализе площади под кривой «судороги в балл-время» значение в группе ФК, 0,5 мг/кг было ниже на 34% в сравнении с группой ФК, 1 мг/кг. Судорожная доза ФК определена на уровне 1 мг/кг.

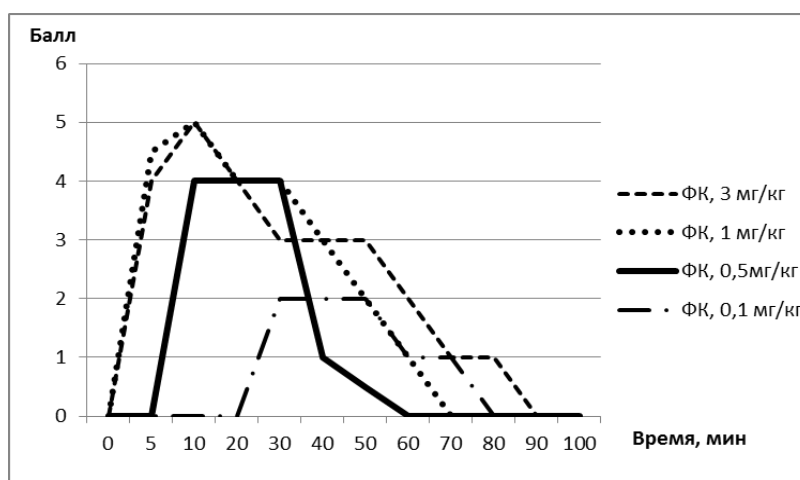


Рисунок 1 – Обобщенные по медиане графики зависимости выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine, баллы, от времени после введения Фенилкарбамата крысам

При сравнении характеристик судорог, вызываемых ФК с Коразолом и ТСК, клонические судороги развивались в 100% случаев во всех группах, тонические – в 25% случаев при введении

ФК, 22% при введении коразола и в 100% при введении ТСК. Латентный период проявления судорог составлял $6,35 \pm 0,33$ мин., $8,11 \pm 0,63$ мин. и $106,8 \pm 7,34$ мин. соответственно. Летальность в группе ФК, 1 мг/кг 15 %, Коразол, 65 мг/кг, 20 %, ТСК, 8 мг/кг 25 %. В среднем, при введении ФК выраженность судорожного синдрома была меньше (5 против 6 баллов по шкале Racine), однако судороги, соответствующие генерализованным у человека (4-6 баллов) в группе ФК были у 98% животных, в то время как при введении Коразола и ТСК – у 95,8% и 90,4%.

Клиническая картина интоксикации ФК: через 2-5 минут после введения наблюдалось снижение двигательной активности, пилоэрекция, саливация и лакримация, появлялись жевательные движения, подергивания усов и ушей. Далее развивался судорожный синдром (вздрагивания, синдром Штрауба и генерализованный тремор при вытянутом лежащем положении). Через 5-15 минут начинались клонические судороги и эпизоды клонико-тонических судорог. Через 2 часа после введения все судорожные проявления полностью прекращались.

При оценке влияния ФК на показатели поведения и двигательной активности через 24 часа после судорог, не выявлено достоверных изменений в тесте «Открытое поле» (при введении Коразола повышалась активность горизонтальных перемещений, при введении ТСК – вертикальных перемещений). Через 48 часов в группе ФК достоверно уменьшалось количество горизонтальных и вертикальных перемещений, средняя скорость и среднее расстояние перемещений, что свидетельствует об особенностях влияния ФК на организм, вероятно вследствие органических повреждений ЦНС. Статистически значимых различий между данными в тесте «Сила хвата» через 24 часа после судорог у групп животных, получавших судорожные и субсудорожные дозы исследуемых судорожных агентов, и контрольной группой не обнаружено.

В тесте «УРПИ» через 2, 24 часа не выявлено достоверных изменений при введении и ФК, и ТСК (Коразол снижал ряд показателей при введении за 24 часа).

Показано отсутствие статистически значимого влияния через 24 часа после судорог на показатели АД во всех исследуемых группах с судорожными агентами. Изучение ЭКГ через 24 часа показало статистически значимое снижение частоты сердечных сокращений в группе ФК по сравнению с контролем. В результате проведения кардиоинтервалографии в группе, ФК, было показано наличие тенденции к уменьшению индексов напряженности через 24 часа после введения, в группе Коразол наблюдалась тенденция к увеличению КИГ, а в группе ТСК отмечено статистически значимое увеличение индекса напряженности, что может свидетельствовать о нарушениях центральной регуляции ритма сердца.

В таблице 1 представлены достоверные изменения биохимического и ионного состава крови, свидетельствующие о негативном влиянии ФК на организм, включая нарушение синтетических функций печени и обмена липидов, а также активизацию распада белков. Также выявлены изменения: в среднем на 18% повышалось содержание АСТ и билирубина через 24 часа, через 48 часов на 31% увеличивалось содержание триглицеридов. Через 7-14 суток имеют место

статистически значимые различия по показателям: альбумин ($\downarrow$), лактатдегидрогениза ($\downarrow$), аланинтрансфераза ($\downarrow$), холестерин ($\downarrow$), щелочная фосфотаза ($\uparrow$), билирубин ($\uparrow$), мочевины ($\uparrow$). Отмечается снижение концентрации ионов натрия и магния в первые 24 ч после отравления.

Таблица 1 – Влияние Фенилкарбамата на состав крови крыс

Период наблюдения	Показатели	Контрольная группа n=24	ФК, 1 мг/кг n=24	Коразол, 65 мг/кг n=24	ТСК 8 мг/кг n=24
24 ч	Триглицериды, ммоль/л	0,32±0,03	0,52±0,05*	0,45±0,06	0,62±0,04*
	Холестерин, ммоль/л	1,61±0,05	1,40±0,08*	1,22±0,08*	1,48±0,08
	ЩФ, ЕД/л	215,8±12,5	179,6±11*	198,1±15,3	277,3±20,4*
	Мочевина, ммоль/л	4,4±0,2	3,6±0,3*	4,0±0,3	4,7±0,3
	Na ⁺ , ммоль/л	160±0,9	155,4±1,2*	153,6±1,5*	157,6±1,4
	Магний, ммоль/л	1,37±0,25	0,27±0,02*	0,35±0,07*	0,94±0,01
48 ч	Мочевина, ммоль/л	4,5±0,3	5,9±0,3*	4,7±0,6	4,2±0,1
	Фосфор, ммоль/л	2,65±0,05	2,94±0,06*	2,69±0,10	2,49±0,03*
	Na ⁺ , ммоль/л	155,3±1,3	159,0±1,0*	157,7±1,7	158,6±1,2
7 сутки	Альбумин, г/л	29,4±0,8	26,2±1,0*	28,2±0,6	25,2±2,4
14 сутки	АЛТ, ЕД/л	55,5±3,2	43,6±2,1*	48,3±1,6	53,3±6,2
	ЛДГ, Ед/л	935,7±67,3	686,8±63,2*	759,4±81,3	783,7±67,4
	ЩФ, ЕД/л	210,4±18,7	306,5±24,7*	301,9±22*	295±46,1
	Холестерин, ммоль/л	1,61±0,07	1,41±0,08*	1,30±0,07*	1,45±0,08
	Билирубин общий, мкмоль/л	12,2±1	17,6±1,8*	18,2±2,7*	14,3±1,3
	Мочевина, ммоль/л	4,2±0,2	5,6±0,3*	4,9±0,2*	3,9±0,3
	СГ, (ммоль/л)	93,8±0,7	96,5±1,1*	92,5±1,4	92,3±1,7
	Фосфор, ммоль/л	2,85±0,08	2,63±0,04*	2,68±0,06	2,65±0,11
	Магний, ммоль/л	0,56±0,03	0,67±0,02*	0,63±0,02	0,57±0,05
Примечание: Данные представлены в формате (M ± m); * – доверительная вероятность различий относительно контрольной группы (p<0,05)					

Выявлен ряд достоверных изменений и в про/антиоксидантной системе. Согласно данным из таблицы 2, в 1, 14 сутки после отравления ФК у животных наблюдаются значительные изменения большинства изученных показателей, наиболее выражены по длительности изменения МДА – маркера образования конечных продуктов перекисного окисления липидов.

Таблица 2 – Влияние Фенилкарбамата на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крови крыс

Изучаемые показатели (М ± m)	Период	Экспериментальные группы			
		ВГ, U/gP	МДА, U/gP	СОД, U/gP	ГП, U/gP
Контроль	24 ч	0,28±0,02	142,3±8,3	22620,9±1026,1	138779,3±5085,7
ФК		0,36±0,02*	79,6±10,9*	26621,0±1416,7	169805,1±10643,2*
Контроль	48 ч	0,13±0,04	188,3±11,8	25498,6±2824,9	110783,9±9639,7
ФК		0,21±0,03	151,3±4,2*	29889,2±3882,5	134915,7±15523,7
Контроль	7 суток	0,41±0,06	122,6±3,9	25957,9±1531,7	143098,1±4084,1
ФК		0,40±0,04	153,1±9,7*	21933,6±1620,7	129235,1±6398,5
Контроль	14 суток	0,39±0,03	164,0±12,2	34055,1±1338,2	142291,7±4510,9
ФК		0,34±0,07	197,6±8,2*	30095,6±1194,8	126446,3±5179,0*
Примечания: указаны средние по группе (М ± m); * – отличия между группами по критерию дисперсионного анализа ANOVA по отношению к контрольным животным					

Поскольку ФК является ингибитором холинэстераз, в рамках разработки экспериментальной модели было продемонстрировано его специфическое действие с подтверждением основного механизма действия. Результаты оценки активности ацетилхолинэстеразы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и в крови крыс после введения Фенилкарбамата

Время отбора	ФК (N=6)		Контроль (N=6)		Ингибирование в крови (%)	Ингибирование в головном мозге (%)
	Кровь, АХЭ (Е/мл)	Головной мозг, АХЭ, (Е/мг)	Кровь, АХЭ (Е/мл)	Головной мозг, АХЭ, (Е/мг)		
1	2	3	4	5	6	7
10 мин	463.1 (365.4;480.5)*	35.1 (32.7; 38.5)*	757.4 (606.4;796.4)	78 (70.7; 80.4)	38.9 (36.6; 51.8)	54.9 (50.6; 58.1)
30 мин	370.9 (328.8;396.2)*	66.3 (59.9; 79.7)*	563.7 (556.9;634.9)	88.4 (87; 92.7)	34.2 (29.7; 41.7)	25.1 (9.9; 32.3)
60 мин	441.1 (292.1; 494.7)	63.4 (51.3; 70.6) *	690.1 (469.2; 700)	92 (90.6; 104.5)	36.1 (28.3; 57.7)	31 (23.2; 44.2)
6 часов	492.4 (418.8; 543.8)	68.1 (55; 86.2)	698.7 (686.8;777.6)	120.3 (108; 144.6)	29.5 (22.2; 56.9)	43.4 (28.3; 54.3)
24 часа	946.3 (398.6; 996.6)	123.9 (111.8; 134.6)	763.6 (629.8;798.3)	117.3 (109.9;126.3)	-23.9 (-30.5; 47.8)	-5.6 (-14.7; 4.8)
Примечание –* – достоверные различия по отношению к контролю ($p<0,05$)						

Изучение гистологических срезов головного мозга у животных, получивших ФК в первые сутки, подтвердило повреждение тканей при острой интоксикации (рисунок 2). Через 72, 96 и 120 часов после введения ФК морфологическая картина в целом сохранялась.

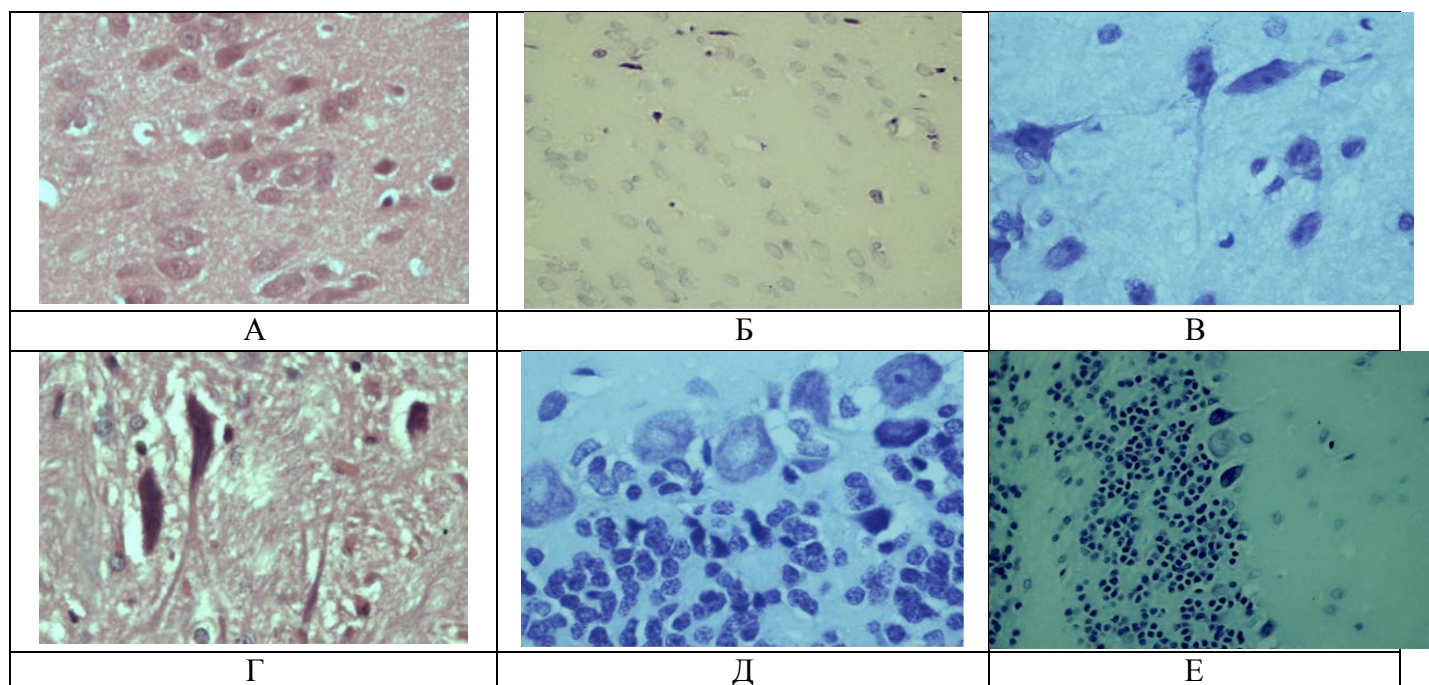


Рисунок 2 – Гистологическое исследование образцов тканей головного мозга крыс.

В, Г, Е – окраска по методу Ниссля X 400. А, Б, Г – окраска гематоксилином и эозином X 400.

В группе Контроль большинство нейронов коры лобной доли имеет типичное строение, светлое ядро и хорошо выраженное ядрышко. Граница между ядром и цитоплазмой четкая. В

стволе головного мозга нейроны типичного строения, волокна нейропилия плотно упакованы. В мозжечке Клетки Пуркинье типичного строения без очаговых выпадений. В зернистом слое клетки плотно прилежат друг к другу (рисунки А, В, Д).

В группе ФК, 1 мг/кг большинство нейронов коры с темной цитоплазмой и ядром, без четкой границы, часть из них вытянутой формы, ядрышко не визуализируется (рисунок Б). В стволе головного мозга нейроны темные, сморщенные, некоторые – в состоянии острого набухания (рисунок Г). В Мозжечке клетки Пуркинье темные, с участками выпадения (рисунок Е).

При оценке TUNEL-положительных клеток в тканях головного мозга, свидетельствующих о наличии нейровоспаления и апоптоза, медианное значение показателя в группе ФК 1 мг/кг было выше на 89% в сравнении с контролем (13,60 против 7,20, $p=0,008$).

При валидации методики экспериментального моделирования судорожного синдрома проведена оценка прецизионности на уровне сходимости (повторяемости) по результатам трех серий экспериментов, выполненных в разные годы (межгодовая прецизионность). По данным 3 лет коэффициент вариации не превышает 24,7%, что говорит об удовлетворительных результатах для работ с живыми организмами.

Таким образом, модель судорожного синдрома на основе ФК подтвердила свою сопоставимость с известными моделями при сопоставлении основных параметров судорожного синдрома, при этом выявила ряд отличий, характерных для судорог, вызываемых карбаматами, что обосновывает необходимость ее применения при разработке средств терапии судорожного синдрома при интоксикации обратимыми ингибиторами холинэстераз, а также средств профилактики неврологических нарушений у выживших.

Экспериментальное обоснование эффективности средств терапии острой интоксикации карбаматом. Известно, что применяемая при острой интоксикации ингибиторами холинэстераз антидотная терапия высокоэффективна только в первые 10-15 минут. Изучены в сопоставимых условиях: два блокатора М-холинорецепторов и NMDA-рецепторов (Карамифен и Тригексифенидил); центральный М- и Н- холиноблокатор и периферический М-холиноблокатор (Дифередин); четыре оригинальных аминокислоты вальпроевой кислоты, с прогнозируемой мультитаргетной активностью (АВК № 1-4). Для сравнения применялся Атропин и Реланиум. При применении «рекомендованных» Атропина и Реланиума наблюдалась смертность животных (13-15%), как и в группе без лечения, АВК №2 и Тригексифенидил, однако при введении других тестируемых веществ летальных исходов не было.

Результаты сравнительной оценки влияния стандартной и экспериментальной терапии судорог при острой интоксикации ФК представлены в таблице 4. После введения ФК доля крыс с выраженными судорогами начинала снижаться с 40 минуты до нуля к 70 минутам, что обосновано механизмом его действия как обратимого ингибитора холинэстераз. При введении Реланиума уровень интенсивности судорог начинал угасать с выраженных клонико-тонических до умеренных

(3 уровень – билатеральный клонус передних и задних конечностей с выраженным тремором) с 20 минуты, а при применении Атропина только с 30 минуты. Наилучшие показатели среди производных вальпроевой кислоты показал АВК №3, остальные образцы данной подгруппы оказались малоэффективными. Среди мультитаргетных средств наибольшее быстрое действие и эффективность (выраженное подавление судорог) показал Карамифен 5 минут, действие Тригексифенидила наступало позднее (с 10 минуты) и Диферидин – еще позднее (с 20 минуты).

Таблица 4 – Влияние исследуемых веществ на летальность и степень выраженности судорог у крыс при интоксикации Фенилкарбаматом

Экспериментальная группа	Доля крыс с выраженными судорогами (n/N) во временных промежутках							
	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин	70 мин
ФК	45/46	46/46	37/41	28/40	9/38	4/38	1/38	0/38
ФК+Реланиум	15/15	11/15*	5/15*	1/14*	1/14	0/14	0/14	0/14
ФК+Атропин	14/14	14/14	9/14*	6/13	0/12	0/12	0/12	0/12
ФК+АВК№3	15/15	4/15*	0/15*	0/15*	0/15*	0/15	0/15	0/15
ФК+АВК№1	11/11	11/11	11/11	9/11	3/11	1/11	0/11	0/11
ФК+АВК№2	11/11	11/11	8/11	6/10	2/9	2/9	1/9	0/9
ФК+АВК№4	11/11	11/11	11/11	7/11	1/11	0/11	0/11	0/11
ФК+Кармифен	7/11*	0/11*	0/11*	0/11*	0/11	0/11	0/11	0/11
ФК+Тригексифенидин	11/11	3/11*	0/9*	0/9*	0/9	0/9	0/9	0/9
ФК+Диферидин	11/11	7/11*	3/11*	0/11*	0/11	0/11	0/11	0/11
Примечание – * – Различия статистически значимы в сравнении с группой Фенилкарбамат (p≤0,05)								

По результатам сравнительной оценки переменной площади под кривой «судороги в балл-время» показали наличие различий между всеми исследуемыми группами, включая достоверные отличия от контроля в группе ФК-Реланиум (p=0,016) и ФК-АВК№3 (p=0,000), значения ниже на 34% и 69% ниже в сравнении с группой ФК, а также в группах ФК+Кармифен (p=0,000), ФК+Тригексифенидил (p=0,000) и ФК+Диферидин (p=0,005) - ниже на 88%, 77% и 39% соответственно. При сравнительной оценке общей продолжительности судорог у крыс показано, что от группы без лечения (ФК) в сторону уменьшения статистически значимо отличались группы ФК+Рел (p=0.004) и высоко значимо ФК+ АВК№3 (p=<0.0001) – уровень показателя был ниже по медиане на 51% и 64%, соответственно, а также показатели ФК+АВК№3 были статистически значимо ниже по медиане на 63 % (p=0.003) в сравнении с ФК+А и не значимо меньше – на 26 %, чем ФК+Рел. Помимо АВК №3, в группах ФК+Кар (p=<0.0001) и ФК+Триг (p=<0.0001), уровень показателя был ниже по медиане на 92%, 71% соответственно. Более низкая продолжительность судорог установлена и при сравнении ФК+Кар (p=<0.0001), ФК+Триг (p=<0.0001), с группой ФК+А: уровень показателя по медиане был ниже на 93%, 72%. Таким образом, по показателю летальности и продолжительности судорожного синдрома при отравлении ФК наиболее выраженной фармакологической эффективностью обладают: Карамифен, аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК №3), Диферидин и Реланиум.

В тесте «Открытое поле» на 1 сутки после введения ФК и средств купирования судорожного синдрома показало наличие статистически значимых различий по показателям: горизонтальные перемещения ($p=0,005$), среднее расстояние ($p=0,020$), средняя скорость ($p=0,027$), общая двигательная активность ($p=0,012$), двигательная активность на периферии площадки ($p=0,011$). Попарный непараметрический дисперсионный анализ горизонтальных перемещений крыс на 1 сутки после судорожного синдрома показал наличие статистически значимых различий ($p=0,003$) между группами ФК и ФК+Карамифен (ниже на 78% по медиане при терапии). Также при сравнении этих групп выявлено снижение среднего пройденного расстояния, ($p=0,008$, ниже на 74%) и средней скорости ($p=0,012$, ниже на 71%), двигательной активности на периферии площадки ($p=0,010$, ниже на 70%), общей двигательной активности ($p=0,009$, ниже на 71%). На 7-е, 14-е и 21-е сутки достоверных различий не зафиксировано. В целом, введение ФК приводит к кратковременному повышению двигательной активности по отдельным показателям в течение первых суток после введения, большинство изученных средств не оказывают существенного влияния на двигательную активность ни в кратковременные, ни в долговременные сроки наблюдения (за исключением Карамифена и тенденции к снижению двигательной активности в группе АВК №3).

По результатам теста «Экстраполяционное избавление» выявлено, что на 7, 14, 28 сутки зафиксировано нарушение воспроизведения памятного следа путем увеличения латентного периода подныривания в группе ФК в сравнении с группами с фармакотерапией и контрольной группой (86 секунд против 14 секунд в среднем) и восстановления до фонового значения не наблюдалось, что косвенно свидетельствует о положительном воздействии терапии на функции мозга (процессы консолидации информации, сохранение памятного следа).

При анализе функции сердца, по показателю частоты сердечных сокращений при снятии ЭКГ на 1 сутки после судорожного синдрома выявлены статистически значимые различия в сторону уменьшения в группе ФК+ АВК №3 ($p<0.021$) в сравнении с ФК+Кар (на 16 % по медиане) и тенденция к снижению ЧСС в сравнении с контролем по медиане (422 против 475 сокращений в минуту). На 7 сутки также выявлены статистически значимые различия в сторону уменьшения в группе ФК+ АВК №3 ($p<0.060$) по сравнению с контролем ниже (на 11 % по медиане) и статистически незначимая, но выраженная тенденция снижения ЧСС в группе ФК+Кар в сравнении с группой ФК по медиане (481 против 531 сокр. в мин).

При анализе крови и ткани головного мозга через 10, 30, 60 минут после возникновения судорожного синдрома, вызванного ФК, не выявлено прямой взаимосвязи между ингибированием АХЭ и противосудорожной активностью АВК №3, Карамифена и Дифередины. При введении Карамифена через 10 мин судороги прекращались, однако процент ингибирования был сопоставим с группой без лечения как в цельной крови (39,2% против 39,4%), так и в головном мозгу (54,7% против 53,5%), при использовании АВК №3 в цельной крови (35,9% против 37,5%) и

головном мозге (32,9% против 22,8%). В случае применения Диферидина противосудорожный эффект наступал через 60 минут, значимых отличий ни в крови (27,1% против 32,5%), ни в головном мозгу (28,8% против 34,2%) по ингибированию АХЭ не наблюдалось. Это можно объяснить как важной ролью нехолинэргических механизмов в патогенезе судорог при интоксикации карбаматами и влиянием на БХЭ, так и комплексным воздействием изучаемых соединений, позволяющим достичь полного купирования судорожного синдрома даже на фоне подавления активности АХЭ.

На рисунке 3 представлены примеры положительного влияния Карамифена и АВК№ 3 на ткани головного мозга после интоксикации ФК. Подобные протективные эффекты зафиксированы и при анализе 2-3 слоев коры головного мозга. В целом, нейропротективный эффект был наиболее выражен при лечении крыс Карамифеном в дозе 50 мг/кг: наблюдалось меньшее количество необратимых изменений нейронов, а также отмечалось возвращение к нормальному состоянию клеток, подвергшихся обратимым изменениям. На 7-е и 14-е сутки наблюдалось увеличение числа неизменённых нейронов, наименьшее количество клеток-теней.

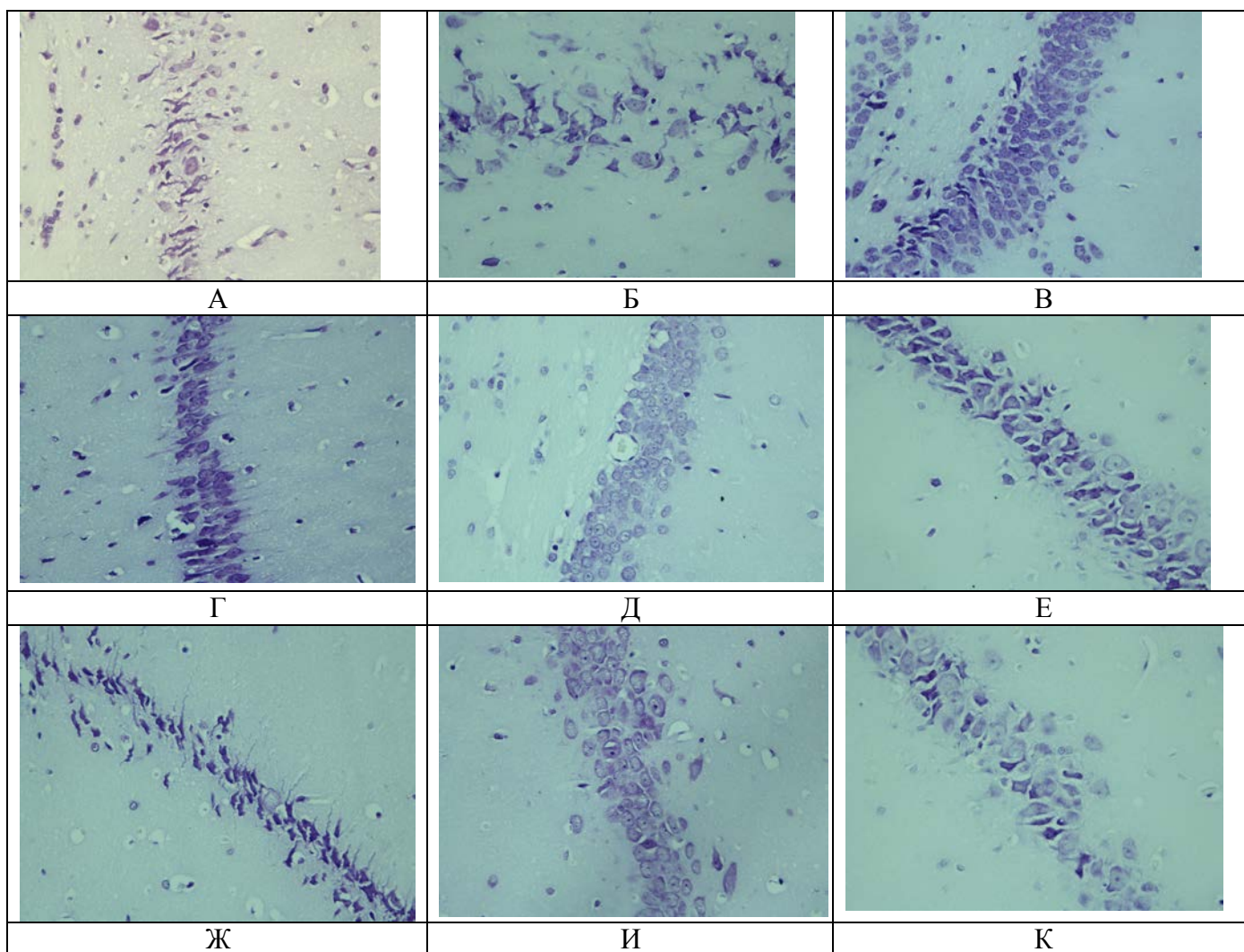


Рисунок 3 – Гистологическое исследование образцов тканей гиппокампа крыс при применении фармакотерапии. Окраска по методу Ниссля. Увеличение 400

В группе ФК на 1 сутки определяются единичные сморщенные нейроны (рисунок А), через 7, 14 суток темные сморщенные нейроны в большом количестве (рисунок Г, Ж). В группе ФК+Карамифен на 1 сутки большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены, такая же картина наблюдается на 7 и 14 сутки (рисунок Б, Д, Ж). В группе ФК+ АВК№3 на 1, 7, 14 сутки большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены (рисунок В, Е, К).

Обобщая результаты сравнительного изучения эффективности средств терапии острой интоксикации Фенилкарбаматом можно заключить, что поскольку Карамифен и АВК№3, не входящие в перечень зарегистрированных антидотов и медикаментозных средств лечения судорожного синдрома продемонстрировали ряд преимуществ, это обосновывает перспективность дальнейшей разработки новых, более эффективных средств лечения острой интоксикации ингибиторами холинэстераз на их основе аналогов для повышения эффективности терапии.

Экспериментальное обоснование фармакологической терапии нейротоксических нарушений, формирующихся после интоксикации Фенилкарбаматом. При оценке влияния средств фармакологической терапии по результатам теста «Открытое поле» через 24 часа показано, что ведение Ноопепта и Мексидола не оказывает терапевтического эффекта на двигательную активность крыс после введения судорожной дозы ФК. Мемантин и Циклодол нормализовал большинство показателей двигательной и исследовательской активности у крыс.

Таблица 5 – Влияние Фенилкарбамата и средств фармакологической коррекции на показатели двигательной активности белых крыс в тесте «открытое поле»

Экспериментальная группа (n=6)	Горизонт перемещ.	Верт. перемещ.	Груминг	Сред. расст.	Сред. скорость	ОДА	ДА в центре	ДА на периф.
Контроль	74.00±9.73	42.33±3.99	44.67±8.04	4.23±0.58	3.50±0.47	116.33±13.42	14.17±4.06	102.17±9.75
ФК	35.40±9.53*	28.00±4.92*	27.80±5.58	1.76±0.47*	1.45±0.39*	63.40±14.18*	6.80±2.07	56.60±12.33*
ФК+Ноопепт	28.40±7.39*	24.00±3.67*	15.00±8.49*	1.72±0.64*	1.43±0.53*	52.40±9.90*	9.60±3.91	42.80±6.71*
ФК+Мексидол	38.00±11.25*	29.40±4.80*	19.80±5.42*	1.62±0.51*	1.35±0.43*	67.40±15.97*	7.80±3.47	59.60±12.70*
ФК+Мемантин	46.20±12.70	29.40±7.81	16.20±9.12*	2.56±0.79	1.92±0.63	75.60±20.18	11.40±6.90	64.20±14.71
ФК+ Циклодол	84.00±9.81^	47.17±2.46^	45.17±8.39	4.13±0.55	3.10±0.51	131.17±11.81	17.50±1.82^	113.67±10.39^

Через 48 часов после введения ФК у крыс фиксировалось только снижение двигательной активности на периферии, купируемое Ноопептом, Мексидолом и Мемантином.

При изучении когнитивных функций в тесте УРПИ через 48 часов количество обученных животных в опытной группе (без фармакологической коррекции) составляло 33%, а при введении Мемантина – 88%.

При гистологическом изучении тканей мозга показано, что через 96 и 120 часов после судорожного синдрома при введении Ноопепта и Мексидола отмечалось сохранение большинства нейронов в коре головного мозга, только единичные нервные клетки были темные и сморщенные

или находились в состоянии набухания. Защитный эффект Мемантина и Циклодола проявлялся в меньшей степени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы. Установлено, что введение токсиканта из группы карбаматов (фенилового эфира карбаминовой кислоты: гидрохлорида замещенного 2[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбамата, (C₇H₇O₂N) или Фенилкарбамата), являющегося обратимым ингибитором холинэстераз, в виде водного раствора в дозе 1 мг/кг внутривенно мелким лабораторным животным (крысам) приводит к развитию генерализованного судорожного синдрома (4-6 уровня по модифицированной шкале Racine), сопоставимого с проявлениями генерализованного судорожного синдрома у человека. Судороги развиваются в 100% случаев, летальность не превышает 30%, длительность и выраженность судорожного синдрома (около 40 минут) позволяют осуществить все необходимые наблюдения как при изучении особенностей патогенеза судорог, так и при тестировании эффективности перспективных средств терапии. Учитывая, что модели на основе ФОС (диизопропилфторфосфата, Зомана, VX) не только малодоступны для широкого применения в связи с невозможностью получения модельных токсикантов и высокими требованиями, предъявляемыми к обеспечению безопасности работ, но и значительно искажают чистоту эксперимента (поскольку предполагают введение атропина, оксимов, а в ряде случаев и бензодиазепинов, помимо тестируемых веществ, для обеспечения приемлемой выживаемости животных), разработанная экспериментальная модель имеет высокую научно-практическую значимость и применимость при изучении патогенеза отравлений ингибиторами холинэстераз и разработке новых подходов к терапии интоксикаций.

Выявленные через 14 дней после введения ФК изменения биохимических показателей (АЛТ, билирубин, холестерин, триглицериды и прочие) свидетельствуют о нарушении синтетических функций печени, липидного профиля и активности ферментов, что может использоваться как дополнительные критерии оценки эффективности перспективных средств терапии судорожного синдрома и профилактики осложнений. Особый интерес представляет сохранение отдельных изменений через 48 часов после прекращения прямого действия токсиканта на мишень, свидетельствующие о системном и комплексном механизме патогенеза неврологических нарушений у выживших после острой интоксикации. Изменения количества TUNEL-положительных клеток, являющихся маркерами активности апоптоза тканей подтверждает наличие органического поражения головного мозга при интоксикации ФК, как причины неврологических нарушений.

Установлено, что Атропин и препараты бензодиазепинового ряда, рекомендованные к применению в первые 15 минут при лечении острого отравления карбаматами и ФОС менее эффективны, чем ряд изученных средств. Полученные результаты подтвердили перспективность

разработки противосудорожных средств на основе аминоксифиров вальпроовой кислоты (гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата в сравнительном исследовании продемонстрировал значительно большую эффективность, чем Атропин и Реланиум), а также Карамифена, являющегося мультитаргетным блокатором М-холинорецепторов и глутаматергических (NMDA) рецепторов головного мозга, но зарегистрированного только как противокашлевое средство.

Выявлено, что при профилактике отдаленных последствий острой интоксикации ФК, наилучшее воздействие на поведенческие функции оказывает Мемантин, однако выраженность повреждения нейронов головного мозга эффективнее купируют Ноопепт и Мексидол, что требует дальнейшего изучения.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанная в данном исследовании модель судорожного синдрома при введении ингибитора ацетилхолинэстеразы Фенилкарбамата может быть использована для дальнейшего изучения патогенеза, механизмов нейротоксичности в рамках изучения отравлении веществами данной группы. Успешная экспериментальная апробация новых подходов в лечении судорожного синдрома при отравлении карбаматами открывает перспективу дальнейшей разработки и проведения доклинических исследований для расширения показаний к применению лекарственного препарата Карамифен, а также для регистрации фармацевтической субстанции оригинального лекарственного средства аминоксифира вальпроовой кислоты (АВК №3 – (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид). Целесообразно дальнейшее изучение механизмов действия Мемантина, Ноопепта и Мексидола при отравлении карбаматами в целях усовершенствования подходов к профилактике неврологических нарушений после острой интоксикации.

ВЫВОДЫ

1. Формирующийся при введении лабораторным животным (крысам) фенилового эфира карбаминовой кислоты (Фенилкарбамата в дозе 1 мг/кг) судорожный синдром, отличается следующими основными характеристиками: летальность составляет 16-20%, латентный период наступления судорожного состояния 5-9 минут, длительность судорожного синдрома до 90 минут, выраженность судорог 4-5 уровень по модифицированной шкале оценки судорог Racine. Клиническая картина характеризуется саливацией, пилоэрекцией, гемолакрией, выраженным тремором всего тела с возникновением судорожных пароксизмов.

2. Токсический судорожный синдром, развивающийся при введении лабораторным животным (крысам) фенилового эфира карбаминовой кислоты, отличается следующими дополнительными характеристиками: при биохимическом анализе крови на 7-14 сутки происходит снижение альбумина, АЛТ, АСТ, холестерина, а также увеличение щелочной фосфатазы, билирубина, мочевины. Гистологическая картина головного мозга крыс характеризуется повреждением нейронов, разрежением нейропиля, выпадением клеток Пуркинье, участками

кровоизлияний в исследуемых структурах мозга, увеличение количества апоптотических TUNEL-положительных клеток на 89% по сравнению с контролем подтверждает выраженное органическое поражение головного мозга и нейротоксичность обратимого ингибитора ацетилхолинэстеразы Фенилкарбамата.

3. Разработанная и валидированная экспериментальная модель генерализованного судорожного синдрома, реализуемая путем введения 1%-ного водного раствора гидрохлорида замещенного 2[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбамата (Фенилкарбамата) крысам, отличается простотой, воспроизводимостью и наличием количественных основных и дополнительных характеристик, позволяющих использовать ее для скрининга новых средств фармакотерапии при интоксикации ингибиторами холинэстераз.

4. При экспериментальной оценке эффективности перспективных средств купирования судорожного синдрома при острой интоксикации Фенилкарбаматом наилучшие показатели по критериям противосудорожной активности, таким как выживаемость, выраженность и продолжительность судорог продемонстрировали Карамифен и оригинальный аминоксифир вальпроевой кислоты №3 (гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата).

5. При экспериментальной оценке эффективности перспективных средств профилактики отдаленных последствий острой интоксикации Фенилкарбаматом наилучшие показатели по критериям предотвращения воздействия нейротоксиканта на когнитивные функции в тесте УРПИ, поведение в тесте открытое поле продемонстрировал лекарственный препарат Мемантин, а для профилактики повреждения нейронов головного мозга крыс более эффективны Ноопепт и Мексидол.

6. Полученные в сравнительном исследовании данные о повышенной, по сравнению со штатным антидотом (Атропина сульфат®), а также с лекарственным препаратом из группы бензодиазепинов – Реланиум® эффективности оригинального аминоксифира вальпроевой кислоты №3 и Карамифена при купировании острых проявлений интоксикации карбаматом обосновывают перспективность дальнейшей разработки препаратов как новых средств фармакотерапии токсического судорожного синдрома на их основе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется внедрить разработанную экспериментальную модель судорожного синдрома на основе Фенилкарбамата как модельного токсиканта в практику фундаментальных и прикладных исследований патогенеза интоксикаций химического генеза, а также в доклинические исследования эффективности и механизмов действия новых противосудорожных средств

2. Рекомендуется применять полученные новые знания о купировании судорог и профилактике осложнений интоксикации ингибиторами холинэстераз после введения 1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорида для развития нового направления

разработки противосудорожных и нейропротекторных лекарственных средств на основе аминоксифированной вальпроовой кислоты.

3. Рекомендуется продолжить разработку отечественного лекарственного средства на основе Карамифена, предназначенного для купирования судорог и профилактики неврологических нарушений при отравлении ингибиторами холинэстераз.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ

1. Петров, А. Н. Проблемы диагностики нейротоксических нарушений – последствий отравлений веществами судорожного действия / А. Н. Петров, К. О. Войцехович, **А. С. Мелехова**, Д. С. Лисицкий, А. В. Бельская, М. В. Михайлова, О. Н. Гайкова // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. – №3, № 59. – С. 211-217.

2. **Мелехова, А. С.** Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом / А. С. Мелехова, А. Н. Петров, А. Я. Беспалов, А. В. Бельская, М. В. Мельникова, Э. П. Зацепин, Г. В. Шестова, А. А. Ганеев // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2019. – Т. 20. – С. 294-306.

3. Зорина, В. Н. Перспективы разработки новых пролонгированных форм производных вальпроовой кислоты для купирования судорожного синдрома / В. Н. Зорина, А. Я. Беспалов, К. А. Краснов, **А. С. Мелехова**, В. Л. Рейнюк // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 7. – С. 14-19.

4. **Мелехова, А. С.** Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и крови крыс при фармакологической коррекции судорог, вызванных карбаматом / **А. С. Мелехова**, Л. Г. Кубарская, А. Н. Петров, А. Я. Беспалов, А. Б. Верведа, А. В. Бельская, М. В. Мельникова // Биомедицина. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 27-31.

5. **Мелехова, А. С.** Изучение противосудорожной активности оригинального аминоксифира вальпроовой кислоты на различных моделях судорожного синдрома / А. С. Мелехова, Е. Б. Шустов, В. Н. Зорина, А. Ю. Беспалов, М. В. Мельникова, А. В. Бельская, А. А. Бондаренко // Токсикологический вестник. – 2023. – Т. 31, №5. – С. 288-296.

6. **Мелехова, А. С.** Оценка эффективности фармакотерапии крыс в условиях экспериментального судорожного синдрома, вызванного обратимым ингибитором ацетилхолинэстеразы (фенилкарбаматом). Патоморфологическое и морфометрическое исследование головного мозга / А. С. Мелехова, О. Н. Гайкова, А. А. Козлов, Е. Д. Бажанова // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2023. – Т. 24, №2 – С. 1308-1322.

7. Гайкова, О. Н. Морфологические изменения головного мозга при токсическом поражении / О. Н. Гайкова, А. А. Козлов, Г. Г. Катрецакая, М. В. Мельникова, **А. С. Мелехова**, Ю. О. Соколова, Е. Д. Бажанова // Биомедицина. – 2024. – Т. 20, №3. – С. 28–31.

8. **Мелехова, А. С.** Экспериментальная модель судорожного синдрома на основе фенилкарбамата / А. С. Мелехова, А. В. Бельская, В. Н. Зорина, М. В. Мельникова, Л. Г. Кубарская, О. Н. Гайкова // Медицина экстремальных ситуаций. – 2024. – Т. 26, № 4. – С. 38–48.

Монография: Антikonвульсанты в токсикологической практике / под ред. проф. В.Д. Гладких. – М.: Комментарий, 2017. – 240 с. (в соавторстве) УДК 615.099.092;615.099.08 ISBN 978-5-94822-088-8

Патент № 2714135 Российская Федерация, МПК C07D 295/03 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01). Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2пропилентаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью / Беспалов А.Я., Прокопенко Л.И., Горчакова Т.Л., Козлов В.К., Петров А.Н., Зайцева М.А., **Мелехова А.С.**, Бельская А.В., Мельникова М.В., Иванов М.Б. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» – 2019137931; заявл. 22.11.2019; опубл. 12.02.2020, Бюл. №5. – 12 с.

Патент № 2754133 Российская Федерация, МПК (2006.01) A61K 31/27 A61K 31/325 A61P 39/02 C07C 271/44. Гидрохлориды замещенных 2-[(диметиламино)метил]арилдиметилкарбоматов, обладающие антихолинэстеразной активностью / Беспалов А.Я., Прокопенко Л.И., Горчакова Т.Л., Козлов В.К., Петров А.Н., Зайцева М.А., **Мелехова А.С.**, Бельская А.В., Мельникова М.В., Иванов М.Б., Чигарева С.М.; заявитель и патентообладатель ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России. – заявл. 04.08.2021; опубл. 27.08.2021, Бюл. 24. – 14 с.

Методические рекомендации: Разработка методологии диагностики и фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия. Методические рекомендации МР ФМБА России 12.08-18. – М., 2018. – 44 с.

Материалы научных конференций

1. Войцехович, К.О. Оценка последствий влияния судорожных агентов на двигательную активность экспериментальных животных / К.О. Войцехович, **А.С. Мелехова**, Д.С. Лисицкий // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных. – Москва, 2016. – 234 с.

2. Петров, А.Н. Фармакологическая коррекция нейротоксических нарушений как последствий отравлений веществами судорожного действия / А.Н. Петров, **А.С. Мелехова**, К.О. Войцехович // Материалы II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты». – Томск, 2017. – Т. 80, № S6. – 25 с.

3 **Мелехова, А.С.** Фармакологическая коррекция нейротоксических нарушений при тяжелом отравлении Фенилкарбматом / А.С. Мелехова Д.С. Лисицкий, К.О. Войцехович, А.В. Бельская, М.В. Михайлова, А.А. Бондаренко // В сборнике: Медико-биологические аспекты химической

безопасности. Сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых. Под общей редакцией А.С. Радилова, В.Р. Рембовского. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 123-124.

4. **Мелехова, А.С.** Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и крови крыс при фармакологической коррекции судорог, вызванных карбаматом / А.С. Мелехова, Л.Г. Кубарская, А.Н. Петров, А.Я. Беспалов, А.Б. Верведа, А.В. Бельская, М.В. Мельникова // Материалы XVII ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование». – Санкт-Петербург, 2022. – Т. 18, № 3. – С. 27-31.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АВК	–	аминоэфир вальпроевой кислоты
АЛТ	–	аланинаминотрансфераза
АОС	–	антиоксидантная система
АСТ	–	аспартатаминотрансфераза
АХЭ	–	ацетилхолинэстераза
БОВ	–	боевое отравляющее вещество
ВГ	–	восстановленный глутатион
ГАМК	–	гамма-аминомасляная кислота
ГП	–	глутатионпероксидаза
ГР	–	глутатионредуктаза
ЛД	–	летальная доза
СОД	–	супероксиддисмутаза
МДА	–	малоновый диальдегид
НИР	–	научно-исследовательская работа
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
УРПИ	–	условная реакция пассивного избегания
ФОВ	–	фосфорорганические вещества
ФОС	–	фосфорорганические соединения
ЦНС	–	центральная нервная система
ЧСС	–	частота сердечных сокращений
ЩФ	–	щелочная фосфатаза
ЭКГ	–	электрокардиограмма
ЭС	–	эпилептический статус
КА	–	каиновая кислота
NMDA	–	N-метил-D-аспартат