

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ГОЛИКОВА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи



МЕЛЕХОВА
АЛЕКСАНДРА СЕРГЕЕВНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА,
ВЫЗЫВАЕМОГО КАРБАМАТАМИ

3.3.4. Токсикология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель
Зорина Вероника Николаевна
доктор биологических наук

Санкт-Петербург – 2025

ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	16
ГЛАВА 1 ТОКСИЧЕСКИЙ СУДОРОЖНЫЙ СИНДРОМ И ПОДХОДЫ К ЕГО ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1 Токсический судорожный синдром: определение, характеристики и механизмы развития	16
1.2 Токсический судорожный синдром при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия	21
1.3 Терапия токсического судорожного синдрома при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия	35
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Дизайн исследования	42
2.2 Используемые вещества в исследовании	48
2.2.1 Соединения, применявшиеся для разработки экспериментальной модели судорожного синдрома	48
2.2.2 Соединения, применявшиеся для фармакологической терапии острого токсического судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом	50
2.2.2.1 Зарегистрированные лекарственные препараты сравнения	50
2.2.2.2 Исследуемые перспективные соединения	50
2.2.3 Соединения, применявшиеся для фармакологической коррекции последствий соматогенной фазы после судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом	54
2.3 Животные и их содержание	56
2.4 Определение токсикометрических параметров Фенилкарбамата	58
2.5 Моделирование и оценка судорожного синдрома	58
2.6 Методы оценки поведения, двигательной активности, памяти у экспериментальных животных	59
2.6.1 Тест «Открытое поле»	59
2.6.2 Тест условной реакции пассивного избегания (УРПИ)	60
2.6.3 Тест «Экстраполляциянное избавление (ТЭИ) для оценки когнитивных функций	60

2.7 Оценка состояния нейромоторных функций в тесте «Сила хватки»	61
2.8 Оценка показателей сердечной деятельности.....	61
2.9 Оценка активности ацетилхолинэстеразы головного мозга и цельной крови	62
2.10 Патоморфологическое исследование головного мозга крыс	62
2.11 Биохимическое исследование образцов крови	63
2.12 Изучение показателей антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов	64
2.13 Определение количества TUNEL-позитивных клеток.....	64
2.14 Методы статистической обработки данных.....	65
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФЕНИЛКАРБАМАТОМ.....	66
3.1 Определение острой токсичности Фенилкарбамата	66
3.2 Сравнительная оценка характера судорог при введении различных конвульсантов	68
3.3 Влияние на показатели поведения и двигательной активности.....	77
3.4 Влияние субсудорожных и судорожных доз модельных токсикантов на когнитивные функции экспериментальных животных	81
3.5 Влияние токсикантов судорожного действия на нейромоторные функции.....	85
3.6 Влияние Фенилкарбамата на функцию сердечно - сосудистой системы	85
3.7 Оценка биохимических показателей периферической крови крыс после токсического судорожного синдрома.....	88
3.8 Изучение показателей про/антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов в крови крыс после токсического судорожного синдрома	92
3.9 Патоморфологическая характеристика ЦНС у крыс после интоксикации Фенилкарбаматом	93
3.10 Оценка апоптотических TUNEL-положительных клеток при интоксикации Фенилкарбаматом	104
3.11 Динамика ингибирования активности ацетилхолинэстеразы при отравлении Фенилкарбаматом с возникновением судорожного синдрома у крыс	104
3.12 Валидация экспериментальной судорожной модели	107

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ ТЕРАПИИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ОТЛОЖЕННЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ	109
4.1 Влияние фармакологической терапии на летальность при острой интоксикации Фенилкарбаматом	109
4.2 Эффективность экспериментальной терапии на выраженность судорог при острой интоксикации Фенилкарбаматом	110
4.3 Влияние фармакологической терапии на продолжительность судорог при острой интоксикации Фенилкарбаматом	116
4.4 Влияние фармакологической терапии на поведение и память при острой интоксикации Фенилкарбаматом	119
4.5 Результаты изучения памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление»	128
4.6 Результаты изучения параметров электрокардиографии у крыс	133
4.7 Оценка влияния фармакологической коррекции на степень ингибирования АХЭ при отравлении Фенилкарбаматом с проявлениями выраженного судорожного синдрома	138
4.8 Результаты изучения органа – мишени (головной мозг) с помощью гистологического исследования у крыс	140
ГЛАВА 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ФОРМИРУЮЩИХСЯ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ФЕНИЛКАРБАМАТОМ	150
5.1 Оценка влияния средств фармакологической терапии на двигательную и исследовательскую активность белых крыс	150
5.2 Оценка когнитивных функций у экспериментальных животных при профилактике последствий острой интоксикации карбаматом	152
5.3 Патоморфологическая и гистологическая оценка состояния ЦНС экспериментальных животных (крыс) после фармакотерапии последствий отравления Фенилкарбаматом	154
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	157
ВЫВОДЫ.....	164
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	166

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Известно, что от 2 до 5% населения Земли испытывали приступ судорог как минимум один раз в жизни [25, 132]. Помимо истинной (генетически детерминированной или приобретенной после перенесенной травмы, либо инфекции) 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 [9, 58, 59, 124]. 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 [81]. В последнее десятилетие каждое пятое самоубийство в мире приходится на отравление пестицидами [133].

Ингибиторы холинэстераз, включая необратимые ингибиторы ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы (фосфорорганические соединения или ФОС), а также обратимые ингибиторы (карбаматы, некоторые третичные амины и четвертичные аммониевые соединения) относятся к числу приоритетных химических веществ судорожного действия, требующих оказания медицинской помощи пострадавшим [14, 124].

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 [14, 59, 108]. При тяжелой интоксикации ингибиторами холинэстераз значительная часть пострадавших умирает от внебольничной остановки сердца, ежегодно в мире фиксируется миллион и более смертельных исходов [29, 59, 138]. 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 [17, 118]. При этом в Российской Федерации за период 2000-2020 гг. объемы применения пестицидов увеличились в 2 раза, площадь обрабатываемых культур – в 3 раза [37].

Необходимо отметить, что значительная часть исследований, посвященных патогенезу интоксикаций ингибиторами холинэстераз и разработке средств лечения, проводилась в условиях наличия и хранения в ряде стран боевых отравляющих веществ (БОВ) на основе фосфорорганических соединений, а также активного применения ФОС в составе агрохимикатов. Однако, в условиях запрета на производство и хранение БОВ и ограничения использования ряда агрохимикатов, содержащих ФОС, все более широкое применение находят обратимые ингибиторы холинэстераз, имеющие ряд отличий в механизмах действия от хорошо изученных ФОС. Несмотря на длительное изучение проявлений токсичности ФОС и наличие штатных антидотов, смертность при остром отравлении ингибиторами холинэстеразы может составлять до 50%, даже при наличии высокотехнологичной интенсивной терапии [62, 71, 92, 103, 129].

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 [9]. 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 [14, 55, 109].

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 [111, 124].

Атропина сульфат является классическим антидотом в случае острой интоксикации ФОС и при отравлении карбаматами [131, 144] 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 [41, 102, 126]. Различия в механизмах действия обратимых и необратимых ингибиторов при терапии интоксикаций карбаматами, как правило, не учитываются, что может оказывать негативное влияние на её эффективность.

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 [1, 24, 124]. 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 [55, 138] отличается слабо выраженной противосудорожной активностью, связанной с его преимущественно периферической М-холиноблокирующей активностью [8, 9], а бензодиазепины, как и Атропин, медленно преодолевают гематоэнцефалический барьер [137], различные научные группы разрабатывают новые мультитаргетные препараты, отличающиеся комплексным М-холиноблокирующим и глутамат (NMDA)-блокирующим действием [136, 151], Активно изучаются перспективные противосудорожные средства на основе вальпроевой кислоты при интоксикации ФОС, однако ни одно из них не зарегистрировано как противосудорожное средство или антидот [63, 95]. Целенаправленной разработки и тестирования средств терапии отдаленных последствий острой интоксикации фактически не ведется (применяется симптоматическая терапия) [57, 60, 61], 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, газы VX), диизопропилфторфосфата или дихлорфоса [95, 101, 138], 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.

Установлено, что острая интоксикация Фенилкарбаматом, 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 работы. Разработка новой экспериментальной модели токсического действия производного карбаминовой кислоты на лабораторных животных позволила изучить воздействие Фенилкарбамата 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 лечения. При введении крысам Карамифена, Тригексифенидила, Диферидина (препараты нейромедиаторного действия), а также аминоэфира вальпроевой кислоты (вещество нейромодуляторного действия) на фоне тяжёлой интоксикации Фенилкарбаматом, 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 исследований, 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 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований», Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по

профилактике инфекционных болезней».

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 аминоэфир 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 (протоколы № 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 были доложены 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 28.02.2018, 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ТОКСИЧЕСКИЙ СУДОРОЖНЫЙ СИНДРОМ И ПОДХОДЫ К ЕГО ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Токсический судорожный синдром: определение, характеристики и механизмы развития

В широком понимании термина «судороги» подразумеваются непроизвольные приступообразные мышечные сокращения, вызванные патологической синхронизированной электрической активностью групп нейронов ЦНС вследствие заболеваний (эпилепсия), травматических повреждений головного мозга, а также экзогенных токсических воздействий [57, 70, 110].

В соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10) выделяют две формы судорожных пароксизмов:

- парциальные (фокальные, очаговые) судороги с вовлечением отдельных групп мышц, подразделяются по степени нарушения сознания на простые и сложные (наблюдаются при сохраненном сознании в большинстве случаев);

- сопровождающиеся потерей сознания и охватывающие мышцы всего тела генерализованные судороги, подразделяемые по вовлечению в судорожный пароксизм скелетной мускулатуры на тонические судороги (наблюдается длительное сокращение мышц), клонические судороги (наблюдаются краткие сокращения мышц, следующие друг за другом), смешанные судороги (наблюдаются клонико-тонические проявления), дополнительно выделяют мио-клонические и атонические варианты [1].

Токсические судороги – это судороги, вызванные воздействием экзогенных синтетических и природных химических веществ [1]. Чаще всего судорожный синдром экзогенного происхождения рассматривается как крайняя форма нервного возбуждения [57], клинически проявляющаяся в виде судорог (клонических, либо клонико-тонических) [149], дополнительно регистрируются проявления гипоксии, ишемии, нарушения водно-электролитного баланса и

кислотно-основного равновесия, а также выраженными нарушениями ликвординамики и гемодинамики в ЦНС. Судорожный синдром, вызванный острыми отравлениями конвульсантами, проявляется как общая тонико-клоническая двигательная активность (*grand mal*). Поскольку нейротоксичность (способность вызывать нарушение структуры и/или функций нервной системы) свойственна многим химическим веществам, отдельно выделяют нейротоксиканты, отличающиеся низким порогом чувствительности нервной системы (НС) в сопоставлении с другими тканями-мишенями [9, 31, 110].

В настоящее время установлен широкий круг ксенобиотиков, способных вызывать судороги у человека, включая лекарственные и наркотические средства, токсины растительного или животного происхождения, а также разнообразные промышленные и сельскохозяйственные химикаты (в том числе пестициды и высокотоксичные химические вещества) [9,66]. При этом судороги могут быть как результатом прямого воздействия токсиканта на ЦНС, так и вторичным следствием глубоких системных нарушений, вызванных токсическим агентом (гипогликемия, гемодинамические нарушения, гипоксия) и проявляющимся в поздней соматогенной стадии отравления [6].

Примеры веществ, отличающихся прямой судорожной активностью представлены в таблице 1 [70].

Описаны случаи возникновения судорожных пароксизмов и при отравлении ксенобиотиками, не отличающимися нейротоксичностью и судорожной активностью, вследствие стимуляции первичной или симптоматической эпилепсии [58].

Клинически токсические судороги характеризуются отсутствием чёткой периодичности и асинхронностью самих пароксизмов, способных самопроизвольно заканчиваться [6, 72, 149]. Известно, что острые интоксикации лекарственными средствами чаще всего сопровождаются одиночными приступами судорог (68,6% случаев), однако в ряде случаев фиксируются два или более дискретных судорожных эпизода (27,7% случаев).

В таблице 1 приведён перечень химических агентов, вызывающих прямое судорожное действие в соответствии с данными, приведёнными в руководстве Clinical Neurotoxicology [77].

Таблица 1 – Вещества, вызывающие двигательные расстройства в виде судорог

Назначение группы веществ	Действующие вещества	Механизм судорожного действия
Анальгетические лекарственные средства	Пропоксифен (Propoxyphene), Трамадол (Tramadol), Мепиридин (Meperidine)	Не уточнен
Антимикробные лекарственные средства	Изониазид, (Isoniazid) Пенициллин (Penicillin)	Угнетение синтеза ГАМК Не уточнен
Наркотические средства – стимуляторы	Фенамины (Amphetamines), Кокаин (Cocaine), Фенциклидин (Phencyclidine)	Стимуляция моноаминоергических систем: дофамина, норадреналина, серотонина в ЦНС
Антидепрессанты	Циклические антидепрессанты (Cyclic antidepressants): Амитриптилин (Amitriptyline), Имипрамин (Imipramine), Бупропион (Bupropion)	Угнетение обратного захвата норадреналина и серотонина в синапсах ЦНС
Пестициды	Фосфорорганические соединения (Organophosphates), Карбаматы (Carbamates)	Антихолинэстеразное действие, холинергическое перевозбуждение, гиперактивация глутаматергической медиаторной системы
Растительные токсины	Грибы «Gyrometra esculenta» Цикутотоксин (Вех ядовитый) (Cicutotoxin(water hemlock), Никотин (Nicotine (tobacco))	Угнетение синтеза ГАМК Гиперактивация никотиновых холинорецепторов Гиперактивация никотиновых холинорецепторов
Передозировка лекарственных средств	Антигистаминные (Antihistamines), Кофеин (Caffeine)	Антагонизм с гистамином Антагонизм с аденозином
Синдром отмены (абстинентный синдром)	Противоэпилептические препараты (Antiepileptic medications), Этанол (Ethanol), Бензодиазепины (Benzodiazepines), Баклофен (Baclofen)	Поливалентный: снижение активности ГАМК рецепторов и повышение активности NMDA рецепторов. Понижение активности ГАМК _α и ГАМК _β подтипов рецепторов.

Интоксикации конвульсивными ксенобиотиками могут приводить к формированию тяжёлых эпилептиформных состояний либо в виде одиночного

судорожного приступа с продолжительностью 30 минут и более, либо в виде многократных судорог без полного восстановления сознания в промежутках между приступами (по типу эпилептического статуса или *status epilepticus*) с длительными или многократными судорожными припадками без светлых промежутков [50, 149]. Необходимо отметить, что у 10-25% больных, перенёсших эпилептический статус, существенно снижается умственная и физическая работоспособность, вплоть до инвалидизации, смертность достигает 17-23%. На фоне лекарственных отравлений, формирование *status epilepticus* ассоциировано со смертельным исходом в 50% случаев и даже более в случаях большой продолжительности приступа (более часа) у пожилых людей [116]. Еще в 1990-х годах Savazos и соавторы продемонстрировали, что даже однократно возникающий судорожный синдром приводит к гибели нейронов [28, 68], снижение плотности нейронов гиппокампа отмечается и в результате судорог, индуцированных воздействием электрошока [158].

Известно, что патогенетические механизмы судорожного синдрома ассоциированы со стимуляцией процессов возбуждения, либо с угнетением тормозных путей в ЦНС [132]. Из данных, приведённых в таблице 1, очевидно, что в развитии судорог, вызванных ксенобиотиками, следует учитывать разнообразные механизмы воздействия на нейромедиаторные системы: холинергическую, катехоламинергическую, серотонинергическую, глутаматергическую, гистаминергическую, глицинергическую, адренергическую, дофаминергическую, опиоидную, пептидергическую, пуринергическую и прочие. Среди известных механизмов действия нейротоксичных соединений на рецепторы описано прямое действие на активность их экспрессии и структурную целостность, а также изменения сродства к нейромедиаторам и негативное влияние на синтез, хранение, высвобождение, обратный захват нейромедиаторов. Также описаны изменения во взаимодействии рецептор-лиганд и влияние на механизмы сопряжения с эффекторной системой клетки [9, 42].

Первопричиной генерализованного судорожного синдрома, как результата тяжёлых отравлений приоритетными токсикантами во время чрезвычайных

ситуаций химической природы и при массовых бытовых отравлениях, может быть как резкое увеличение активности холинергической и/или глутаматергической нейромедиаторных систем (вещества антихолинэстеразного действия), так и блокада тормозных процессов в результате угнетения процессов, в которых задействованы гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и глицин, а именно ГАМК-ергической или глицинергической медиации в ЦНС (ГАМК-литики, ингибиторы синтеза ГАМК) [132].

Одной из основных нейромедиаторных систем, ответственных за процессы возбуждения, является глутаматергическая система. Известно, что избыточная активация глутаматных рецепторов, прежде всего типа NMDA-, AMPA- и каинатных рецепторов, вызывает судорожную активность, приводит к нейротоксическим повреждениям, называемым эксайтотоксическими [159]. Клиническим проявлением эксайтотоксичности являются длительные и рецидивирующие судороги по типу эпилептического статуса [3]. Решающая роль в эксайтотоксическом действии глутамата принадлежит NMDA рецепторам. Длительная гиперактивация этого подтипа рецепторов глутамата взаимосвязана с накоплением ионов кальция во внутриклеточном пространстве и ассоциирована с запуском нейродегенеративных процессов, приводящих в итоге к гибели клетки за счет прогрессии процессов апоптоза и некроза [155]. Известно, что в формировании эксайтотоксичности также задействованы каинатные и AMPA подтипы глутаматных рецепторов. Установлено, что эксайтотоксичность, опосредованная AMPA и каинатными рецепторами, способствует демиелинизации и повреждению аксонов в зрелых олигодендроцитах [159]. Описаны и процессы стимуляции каинатных рецепторов, играющие антагонистическую роль в угнетении ионотропных рецепторов ЦНС (в зоне гиппокампа и миндалины, ассоциированных с судорожной активностью) под воздействием ГАМКа [85].

Известно, что судорожная активность может быть результатом:

- 1) гиперактивации потенциалзависимых ионных каналов или повышенной продукции нейромедиаторов возбуждающего действия;

2) блокады процессов восстановления потенциала покоя (реполяризации) мембраны нейрона или подавления активности нейромедиаторов угнетающего действия;

3) сочетанного действия данных факторов.

В частности, агонисты глутамата и симпатомиметики стимулируют возбуждение нейронов за счет увеличения притока натрия, оттока калия, а также уменьшения притока хлоридов в клетки [132]. Подтверждением участия процессов нарушений ионной проводимости в генерации судорог являются клинические и экспериментальные наблюдения, свидетельствующие, что многие химические соединения (карбамазепин, ламотриджин, топирамат, фенитоин, вальпроаты), блокирующие потенциалзависимые натриевые или кальциевые каналы, являются антиконвульсантами и ингибиторами распространения потенциалов действия [1, 50].

Таким образом, токсический судорожный синдром может развиваться под воздействием целого ряда соединений, отличающихся нейротоксичностью, либо опосредованно влияющих на ЦНС. Механизмы действия токсикантов и выраженность влияния на организм могут различаться. При этом, наибольшую угрозу представляют нейротоксиканты прямого действия, приводящие к развитию генерализованного судорожного синдрома и способные спровоцировать развитие тяжелых неврологических нарушений в отдаленной перспективе.

1.2 Токсический судорожный синдром при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия

Природным субстратом ацетилхолинэстеразы – истинной холинэстеразы (АХЭ) является ацетилхолин (АЦХ) – эфир уксусной кислоты и холина.

Депонированный в пресинаптических везикулах АЦХ при выделении в синаптическую щель между нейронами взаимодействует со специфическими рецепторами. Затем, под воздействием фермента (АХЭ) происходит гидролиз данного субстрата, в результате реакции образуется уксусная кислота и холин, а передача сигнала прерывается. В молекуле фермента имеется периферический анионный центр, к которому субстрат имеет более высокое сродство за счёт

положительного заряда на атоме азота. Присоединение субстрата к периферическому центру вызывает активацию АХЭ, в результате чего осуществляется гидролиз АЦХ в активном (эстеразном) центре фермента и происходит ацетилирование АХЭ. Ацетилированная форма фермента с большой скоростью гидролизуется под действием воды и далее освободившаяся молекула эстеразы готова для следующего цикла взаимодействия с субстратом. Высвободившийся холин вновь захватывается пресинаптическими структурами, далее происходит ресинтез АЦХ с участием ацетилкоэнзима А и холинацетилтрансферазы [59]. Структура ацетилхолина и схема его взаимодействия с ацетилхолинэстеразой (АХЭ) представлена на рисунке 1.

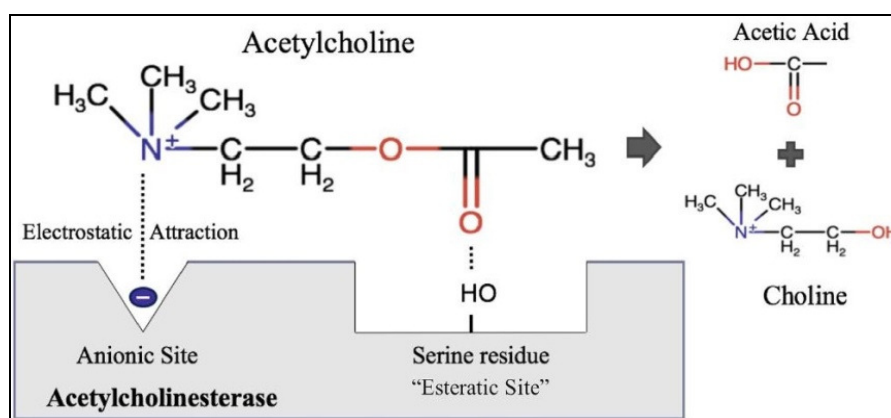


Рисунок 1 – Схема взаимодействия ацетилхолина с ацетилхолинэстеразой [59]

Таким образом, процесс нейромедиаторного действия АЦХ регулируется, предупреждая его избыточное накопление в холинергических синапсах ЦНС и периферической нервной системы.

Многие природные и синтетические соединения являются веществами антихолинэстеразного действия. В число подобных ингибиторов холинэстеразы входят и фосфорорганические соединения (от пестицидов до боевых отравляющих веществ), и производные карбаминовой кислоты (карбаматы), и третичные амины, и четвертичные аммониевые соединения [59]. Однако, прежде всего к приоритетным токсическим веществам прямого судорожного действия, отравления которыми приводят к развитию генерализованного судорожного

синдрома и требуют оказания экстренной медицинской помощи пострадавшим, относятся ФОС и карбаматы.

Наиболее подробно изучены фосфорорганические соединения. К настоящему времени накоплен огромный экспериментальный и клинический опыт, касающийся изучения механизмов действия и диагностики отравлений ФОС. Известно, что мощное антихолинэстеразное действие фосфорорганических токсикантов объясняется тем, что ФОС имеют сходство в строении с естественным субстратом холинэстеразы, однако в процессе фосфорилирования происходит практически необратимое угнетение активности фермента. Необходимо отметить, что ФОС ингибирует не только АХЭ, но и карбоксилэстеразы, задействованные в метаболизме некоторых лекарственных препаратов, а также бутирилхолинэстеразы.

Процесс взаимодействия фосфорорганических соединений (ФОС) с ацетилхолинэстеразой (АХЭ) можно разделить на две стадии, как показано на рисунке 2.

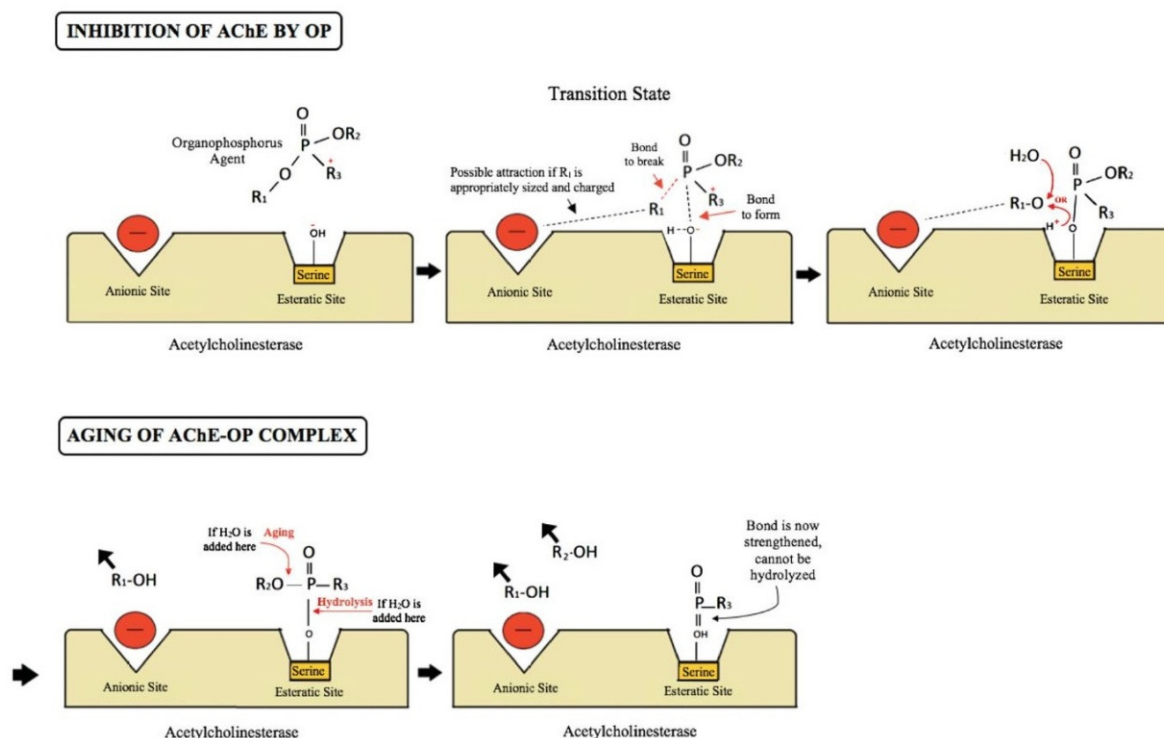


Рисунок 2 – Взаимодействие фосфорорганических соединений с ацетилхолинэстеразой [59]

В активном центре АХЭ есть гидроксильная группа серина, которая может взаимодействовать как с ацетилхолином, так и с ФОС. Основное различие между взаимодействием ацетилхолина и ФОС с АХЭ заключается в скорости реакции. После гидролиза ацетилхолина происходит декарбоксилирование активного центра, и энзим восстанавливает способность взаимодействовать с субстратом. Однако дефосфорилирование происходит медленно.

Обратимая связь фосфорилхолинэстеразы в ряде случаев может подвергаться гидролизу при воздействии антидотов или спонтанно, с восстановлением функции фермента. Однако если группа R «стареет», то фермент необратимо ингибируется. «Старение» фосфорилхолинэстеразы представляет собой процесс, при котором образовавшаяся в первой фазе обратимо фосфорилированная холинэстераза превращается в необратимо ковалентно связанную форму. Переход от обратимого ингибирования к необратимому происходит постепенно и зависит от температуры, структуры и концентрации ингибитора. От самой структуры фосфорорганических соединений, а именно от строения алкильных радикалов, связанных с фосфором зависят скорость «спонтанной реактивации» ацетилхолинэстеразы, самопроизвольное восстановление её активности, а также «старение». Чем «тяжелее» радикалы, тем ниже скорость «спонтанной реактивации» и выше скорость «старения».

Например, старение ацетилхолинэстеразы при отравлении зоманом происходит в течение нескольких минут, заринном – в течение нескольких часов, а веществами VX – в течение нескольких суток. [1, 9, 59, 154]. Известно, что боевые ФОС (зарин), а также диизопропилфторфосфат имитируют сложноэфирную часть молекулы ацетилхолина за счет сходства в поляризации $P=O$ и $C=O$ групп, однако фосфорилхолины имеют сходство и с эфирной и катионной частями медиатора и в этом случае катионный фрагмент ответственен за ориентацию токсиканта (путем взаимодействия с анионным фрагментом фермента), а фосфорсодержащий фрагмент непосредственно взаимодействует с эстеразным центром связывания. Соответственно, увеличение структурного

сходства молекулы ФОС с ацетилхолином напрямую взаимосвязано с повышением токсичности и антихолинэстеразной активности [1, 9].

Дефицит АХЭ, формирующийся на фоне необратимого связывания с ФОС, сопровождается избыточным накоплением молекул ацетилхолина в синапсах периферической и центральной нервной системы (нервных либо мионейрональных) и провоцирует развитие типичных клинических проявлений (формирование токсического холинергического синдрома), включая судороги, бронхоспазм и явления брадикардии. В тяжелых случаях интоксикации наблюдается смертельный исход [15, 59].

Согласно данным научной литературы, формирование судорожного синдрома при отравлениях ФОС проходит несколько стадий. В начальной «холинергической» стадии, продолжающейся в течение нескольких минут после экспозиции к токсическому агенту, возникновение и формирование судорожной активности обусловлено накоплением ацетилхолина вследствие угнетения АХЭ и гиперстимуляцией центральных и периферических М- и Н- (мускариновых и никотиновых) холинергических систем.

В следующей «смешанной» или «промежуточной» стадии холинергическая стимуляция постсинаптических мускариновых рецепторов приводит к повышенному высвобождению глутамата. Возникающая гиперактивация глутаматергической нейромедиаторной системы и прежде всего NMDA рецепторов способствует пролонгации (свыше 40 мин) и рецидивированию судорог вплоть до развития эпилептического статуса (ЭС). В этой, «глутаматергической» стадии как результата эксайтотоксичности, сопровождающейся, в числе прочего проявлениями цитотоксичности, повышением уровня внутриклеточного кальция за счет ингибирования калиевых каналов KCNQ2/3 и развитием воспалительной реакции, формируются структурные нейрональные повреждения в ЦНС [76, 85, 97].

Холинергический кризис приводит к гиперсекреции и формированию судорожного синдрома, далее может следовать развитие комы и летальный исход. Параллельно развивается нейровоспаление с высвобождением

провоспалительных цитокинов и других факторов, способствующих апоптозу нервных клеток и нейродегенерации. Затем развивается вторичное поражение нервных тканей с психоорганическими и неврологическими расстройствами у пострадавших. В числе отдаленных последствий, выявляемых в течение месяцев и даже многих лет: персистирующие когнитивные нарушения, нарушения психомоторных функций, развитие хронической эпилепсии, повышение риска развития рака мозга [59].

Существуют и другие патогенетические механизмы действия ФОС, например, хлорпирифос ингибирует активность других ферментов ЦНС (например, моноацилглицерин-липазы), способствуя увеличению содержания 2-арахидоноилглицерина (2-AG), выполняющего функции каннабиноидного агониста в ЦНС. Профенофос также ингибирует амидгидролазу жирных кислот (FAAH), задействованную в расщеплении эндоканнабиноидов [81].

Таким образом, особенности механизмов действия ФОС на организм достаточно хорошо изучены, однако, в условиях запрета на производство и хранение химического оружия, а также ограничения производства агрохимикатов на основе ФОС, все большую актуальность на сегодняшний день приобретает изучение проявлений токсичности другой группы веществ атнихолинэстеразного действия, а именно производных карбаминовой кислоты (карбаматов).

Карбаматы являются производными карбаминовой кислоты, амино- и карбоксильные окончания которой замещены структурно разнообразными алкильными, арильными или алкил-арильными заместителями и идентифицируются по наличию $-O-CO-NH-$ связи [90]. Замена атома карбонильного кислорода серой приводит к образованию тиокарбаматов, в то время как дополнительная замена алкоксиоксида атомом серы приводит к образованию дитиокарбаматов [69, 90, 117].

Химическая структура биологически активных карбаматов показана на рисунке 3.

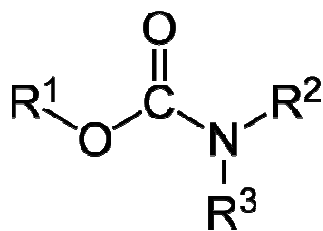


Рисунок 3 – Химическая структура карбаматов

Карбаматная группа состоит из карбонильной группы (C=O), к которой относятся алкоксильная группа (OR₁) и аминогруппа (R₂ NR₃). Карбаматная группа обязана своей функциональностью структурному сходству с амидами (R₂ NR₃-CO-R₁) и эфирами. А именно, карбаматы структурно можно рассматривать как «амидноэфирные» гибриды с химической реакционной способностью, сравнимой с данными двумя функциональными группами. Благодаря этой амидно-сложноэфирной комбинации, карбаматы химически стабильны и способны изменять межмолекулярные и внутримолекулярные взаимодействия [105, 119, 122].

Биологическая активность карбаматов в составе ядовитого растения *physostigma venenosum* из семейства бобовых известна с древних времён. В 1864 году исследователи Иобст и Гессе [16] выделили из произрастающих в Нигерии калабарских бобов алкалоид физостигмин (эзерин), по химическому строению оказавшийся карбаматом. Физостигмин, сначала растительного происхождения, а затем полученный синтетически, стал первым в ряду карбаматов, используемых в качестве лекарственных средств: в 1877 Лакер впервые использовал физостигмин, выделенный из калабарских бобов, для лечения глаукомы [14, 19]. После того, как Седманом и соавторами в 1929 году была раскрыта связь между структурой физостигмина и его активностью, начались исследования ряда других карбаматов и с 1931 г. карбамат неостигмин стали применять для стимуляции перистальтики ЖКТ, а затем болезни Альцгеймера. В таблице 2 представлены используемые в настоящее время в клинической практике лекарственные препараты, содержащие карбаматы в качестве действующего компонента [119].

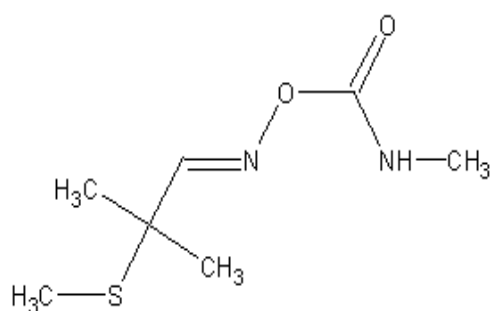
Таблица 2 – Лекарственные препараты – карбаматы

Лекарственный препарат	Применение в лечебной практике
1	2
Физостигмин	В офтальмологии для сужения зрачка и понижения внутриглазного давления при глаукоме(повышенном внутриглазном давлении)
Галантамин (Нивалин)	Деменция альцгеймеровского типа легкой или умеренной степени тяжести, в том числе с хроническими нарушениями мозгового кровообращения
Прозерин (МНН: Неостигмина метилсульфат)	Восстановительный период после перенесенного менингита, двигательные нарушения после травмы мозга, миастения, параличи, полиомиелит, энцефалит; слабость родовой деятельности, открытоугольная глаукома; неврит, атрофия зрительного нерва; атония ЖКТ, атония мочевого пузыря, устранение остаточных нарушений нервно-мышечной передачи недеполяризующими миорелаксантами
Убретид (МНН: Дистигмина бромид)	Показания к применению, как у прозерина. Обладает более длительным действием.
Калимин (МНН: Пиридостигмина бромид)	Миастения, миастенический синдром, атония ЖКТ и мочевого пузыря, в том числе послеоперационная атония кишечника, атонический запор, нарушение опорожнения мочевого пузыря после гинекологических операций и родов; для прекращения миорелаксации при наркозе
Экселон (МНН: Ривастигмин, Неостигмин, Физостигмин, Пиридостигмин)	Нейродегенеративные заболевания, слабая или умеренно выраженная деменция альцгеймеровского типа
Митомицин С, Иринотекан	Химиотерапия
Ритонавир, Ампренавир, Атазанавир, Дарунавир	Ингибиторы протеазы вируса иммунодефицита человека
Фелбамат, Ретигабин, Ценобамат	Противосудорожные средства
Фебендазол, Альбендазол, Фебангельмебендазол	Антигельминтные средства
Метокاربамол, Метоксалон	Миорелаксанты
Иринотекан, Бамбутерол, Габапентин энкабрил, Капецитабин	В составе пролекарств с различным терапевтическим применением, в качестве амидо- или пептидомиметиков для улучшения эффективности, продолжительности действия или целевой специфичности

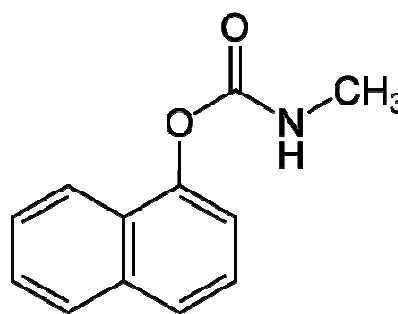
В числе прочего, карбаматы применяются в качестве антидотов при отравлениях веществами, влияющими на холинергическую медиацию. Содержащий четвертичный азот бромид пиридостигмина в ряде стран используется как профилактический антидот при отравлениях ФОС [141]. В нашей стране был разработан и внедрён в практику оригинальный препарат карбаминового ряда – аминостигмин (N,N-Диметил-(2-N,N-диметиламинометилпиридил-3)-карбамат), для использования при отравлениях

атропиноподобными веществами [52]. Благодаря протеолитической, химической и конформационной стабильности карбаматов, а также способности многих из них проходить через клеточную мембрану и гематоэнцефалический барьер, карбаматы все чаще заменяют пептиды в фармпрепаратах [119].

В 1950-х гг. были синтезированы ароматические карбаматы, являющиеся мощными ингибиторами АХЭ и обладающие высокой избирательной токсичностью в отношении насекомых [79, 119], что стало обоснованием для использования карбаматов в качестве инсектицидов [2, 24]. Карбаматы как пестициды – инсектициды стали применяться позже, чем ФОС – инсектициды, примерно с середины прошлого столетия [73], однако ныне большое количество производных карбаминовой кислоты применяются в качестве инсектицидов различного назначения. К наиболее широко используемым в настоящее время карбаматным инсектицидам относятся альдикарб, карбарил, карбофуран, пропоксур [66]. Пример карбаматов инсектицидов представлены на рисунке 4.



Альдикарб



Карбарил

Рисунок 4 – Химическая структура карбаматов – инсектицидов

Некоторые производные карбаминовой кислоты нашли практическое применение в качестве фунгицидов (Манкоцеб, Тирам, пропамокарб гидрохлорид) с торговыми названиями Дитан, Манкоцеб, Пенкоцеб и гербицидов (десмедифам, фенмедфам, просульфокарб) с торговыми названиями Бетанал, Битап, Бифор, Бицепс 22 [29, 38].

Токсичность соединений из группы карбаматов, аналогично ФОС, зависит от структуры радикала (R1), расположенного подле кислородного атома карбамильной группы. В основе механизма действия карбаматов лежит

антихолинэстеразное действие в результате карбомилирования АХЭ. Карбаматы являются обратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы по причине быстрого гидролиза декарбомилированного фермента. Поэтому ингибция АХЭ более кратковременна и её активность в зависимости от поступившей дозы карбамата восстанавливается в пределах нескольких часов. В течение 24-48 часов наблюдается полное восстановление функции АХЭ. Это объясняется тем, что большинство карбаматов являются прямыми ингибиторами АХЭ и для проявления их действия не требуется метаболическая биоактивация. Важно отметить, что карбомилированная холинэстераза, в отличие от фосфорилированной, не подвержена реакции старения [103]. Установлено, что карбаматы также ингибируют бутирилхолинэстеразу (БХЭ); степень этой ингибции варьирует в зависимости от структуры соединений, но в целом степень ингибции БХЭ является менее значимой на фоне отравлений, сопровождающихся существенным угнетением активности АХЭ [80].

Необходимо учитывать, что эффективность карбаматов чаще всего прямо взаимосвязана с их токсичностью. В таблице 3 продемонстрированы значения среднесмертельных доз нескольких карбаматов, подтверждающие их высокую токсичность [11].

Таблица 3 – Среднесмертельные дозы карбаматов при разных путях введения

Карбаматы	ЛД ₅₀
Пиридостигмина бромид (антидот)	1,4-1,5 мг/кг, внутривенно, мыши
Аминостигмин (лекарственное средство)	0,23 мг/кг, внутривенно, мыши; 0,41 мг/кг, внутривенно, крысы; 1,40 мг/кг, внутривенно, собаки;
Альдикарб (инсектицид)	0,8 мг/кг, перорально; 3,2 мг/кг, подкожно, крысы

Токсические эффекты карбаматов в составе лекарственных препаратов могут проявляться, учитывая их высокую токсичность и ограниченную широту терапевтического действия, вследствие низкого терапевтического индекса [52], представляющего собой соотношение количества лекарственного вещества,

вызывающего токсический эффект, к его терапевтической (эффективной) дозе ($ЛД_{50}/ЕД_{50}$).

Широта применения токсичных соединений в составе бытовой химии и агрохимикатов неизбежно сопряжена с риском отравления, включая массовые случаи. Токсическое воздействие карбаматов пестицидов и инсектицидов может происходить при воздействии на кожу, органы дыхания и желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Степень токсичности карбаматных инсектицидов ранжируется от умеренной (карбарил) до чрезвычайно высокой (альдикарб). Описаны случаи отравления людей, ассоциируемые с экспозицией к карбаматам, в особенности карбарилом. Сообщалось о случаях отравления детей, вызванных игрой на спортивной площадке после распыления инсектицидов [66, 98, 145]. За последние 20 лет в различных странах официально зарегистрировано много случаев массовых отравлений пестицидами. По некоторым данным, подобные отравления, часто приводящие к длительной утрате трудоспособности, составляют от 15% до 44% в структуре профессиональной патологии сельскохозяйственных работников [29]. Большинство описанных случаев связано с отравлениями альдикарбом. Это соединение имеет очень высокую острую токсичность ($ЛД_{50}$ 0,8 мг/кг перорально), а также хорошо растворимо в воде. Хотя, в силу этих характеристик, альдикарб в ряде стран официально не разрешён для использования при обработке фруктов и овощей, имеющих высокое содержание воды, он нелегально используется при гидрофильном выращивании огурцов и арбузов, что приводит к вспышкам отравлений [66, 89, 91]. Данные Американской ассоциации токсикологических центров по контролю над отравлениями (AAPCC), собранные в период с 2002 по 2006 год, показали, что отравления карбаматами составляли 14 000 зарегистрированных случаев и имели показатель смертности от 10% до 20%. В 2008 году Достаточно большое количество попыток суицида (около миллиона случаев, в том числе до 200 000 смертельных исходов в год) с применением пестицидов ежегодно фиксируется в странах Азии [145]. Согласно данным, опубликованным ВОЗ в 2019 году, ежегодно в результате самоубийств происходит около 8 тысяч смертей (1 смерть каждые 40 секунд), при этом,

попытки суицида с использованием пестицидов составляют 20% от общего числа смертей [118].

Согласно данным ФГБУ НПТЦ ФМБА России, за период с 2019 по 2021 год было зарегистрировано 541 обращение в информационно-консультативное токсикологическое отделение, связанное с диагностикой, необходимостью госпитализации и/или выбором тактики лечения при остром отравлении пестицидами [53]. Из них 470 обращений пришлось на Москву (87%), 31 – на Московскую область (5,7%), а 40 – на другие регионы России (7,3%), что явно свидетельствует о занижении реальных цифр при удалении от специализированных центров. В 386 случаях (71%) информационно-консультативная токсикологическая поддержка была оказана бригадам скорой медицинской помощи, в 32 случаях (6%) – врачам медицинских учреждений, а в 123 случаях (23%) – частным лицам, что подтверждает востребованность новых разработок именно на догоспитальном этапе. Состав пациентов был следующим: 452 человека (84%) были взрослыми, 89 – детьми; 292 человека были мужчинами, а 256 – женщинами. Целью консультации в 30% случаев были вопросы диагностики и выбора тактики лечения отравлений фосфорорганическими инсектицидами (Т60.0), в 9% – галогенизированными инсектицидами (Т60.1), в 29% – другими инсектицидами (Т60.2), в 7% – гербицидами и фунгицидами (Т60.3), в 8% – родентицидами (Т60.4), в 13% – другими пестицидами (Т60.8) и в 4% – пестицидами неуточнёнными (Т60.9). Госпитализация была рекомендована 118 пациентам (22%), а в отделение общей реанимации – 7 пациентам (1,3%). В 481 случае (89%) наблюдались непреднамеренные отравления, из которых 12 были производственными, а 469 – случайными.

В целом, внешние признаки и симптомы отравления карбаматами такие же, как при интоксикации ФОС, и выражаются комплексом патологических эффектов в виде гиперсекреции, угнетения ритма и проводимости сердца, спазма гладкой мускулатуры сосудов и внутренних органов, нарушения нервно-мышечной проводимости, респираторного дистресс синдрома [9, 34, 77, 107]. При тяжелых отравлениях карбаматами появление симптомов интоксикации у пациентов

возможно в течение первых пяти минут. Время появления симптомов зависит от дозы воздействия и токсичности карбамата, например высоколипофильные соединения быстро перераспределяются в жировые запасы из внеклеточного пространства [33, 145]. Скорость и выраженность действия в значительной степени зависит от способа попадания в организм: после ингаляционного воздействия смерть может наступить в течение нескольких минут, в то время как симптомы трансдермального воздействия высоколипофильных агентов могут быть отложены на срок до 48 часов. Время появления симптомов после приема внутрь больше, чем при ингаляции, клинические эффекты проявляются в течение 30-90 минут. При этом, пероральный путь в большей степени сопряжен с рвотой и другими желудочно-кишечными симптомами, ингаляционный вызывает офтальмологические и респираторные симптомы, а трансдермальный – потоотделение и фасцикуляции [103].

При отравлении соединениями из группы карбаматов, наблюдаются следующие клинические проявления интоксикации [29]:

- Мускариноподобные симптомы: усиление секреции включая бронхиальную, слезо-, пото- и слюноотделение, миоз (сужение зрачков), спазмы (бронхо- и абдоминальные, в виде рвоты или диареи), а также проявления брадикардии и бронхореи, дополнительно может наблюдаться недержание мочи.

- Никотиноподобные симптомы: судог и фасциляции мышц (от мелких до дыхательных), общая слабость, нарушения функции сердца (явления гипертонарии и тахикардия).

- Признаки поражения ЦНС, включая ГАМК-ергические, а также адренергические механизмы: головокружение, головная боль, атаксия, тремор, судорожный синдром, нарушения двигательных и когнитивных функций (эмоциональная лабильность, спутанность сознания, потеря памяти) ассоциированные с возникновением стойких неврологических нарушений в отдаленной перспективе.

- Угнетение деятельности дыхательного центра [118].

В случаях отравления карбаматами могут преобладать и парасимпатические симптомы [57, 113].

Можно выделить четыре условных симптомокомплекса при отравлении: острое отравление (включающее вышеописанные симптомы в различных сочетаниях), проявления хронической токсичности, «промежуточный синдром» и отсроченная нейропатия. «Промежуточный синдром» возникает через 1-5 дней после отравления, наблюдается не у всех пострадавших и характеризуется параличом дыхательных мышц, мышц-сгибателей шеи и проксимальных мышц конечностей. При этом не наблюдается признаков избыточной холинергической активности. Симптомы могут наблюдаться до 7 дней, может потребоваться искусственная вентиляция легких. Сельскохозяйственные рабочие, почти ежедневно подвергающиеся воздействию пестицидов, страдают от проявлений хронической токсичности в виде симметричной сенсомоторной аксонопатии. Обычно данное состояние начинается с судорог ног и прогрессирует до слабости, а затем до паралича, аналогично синдрому Гийена-Барре. Экстрапирамидные симптомы, потеря памяти, перепады настроения, когнитивные нарушения, периферическая нейропатия и вегетативная дисфункция характерны для отсроченной нейропатии [118].

Необходимо отметить, что, несмотря на сходство клинических проявлений и основного механизма действия (связывание АХЭ), карбаматы отличаются от ФОС не только взаимодействием с ферментами без «старения» связи, но и рядом других особенностей, способных повлиять на биологические свойства, в том числе на проявления токсичности. В частности, благодаря комбинации структуры амидов и сложных эфиров, карбаматы химически стабильны и способны влиять на меж- и внутримолекулярные взаимодействия. Карбаматы более электрофильны, чем амиды, и достаточно реакционноспособны, чтобы самопроизвольно реагировать с нуклеофилами. Из-за псевдодвойной связи в структуре, молекулы карбамата могут существовать в виде *цис* и *транс* изомеров, соотношение двух конформаций может изменяться в зависимости от типа и состава растворителей, концентрации солей и pH реакционной смеси. Кроме того,

карбаматы являются полуполярными соединениями, которые могут образовывать водородные связи, как в качестве доноров, так и в качестве акцепторов водорода, и на их О- и N-концах могут происходить различные взаимодействия. Фармакологическая активность карбаматов в основном зависит от скорости и интенсивности их гидролиза, основным путем их гидролиза в физиологических условиях является гидролиз оснований [119]. Установлено, что ФОС и карбаматы по-разному влияют на сперматогенез [82].

Отдельного внимания заслуживает нехолинергическая токсичность ФОС и карбаматов: выявлено ингибирование сериновых гидролаз, играющих ключевую роль в метаболизме липидов, ФОС и карбаматы связываются не только с митохондриальными белками-транслокаторами, но также с рецепторами андрогенов, эстрогенов и глюкокортикоидов, а также с CYP2s, метаболизирующими холестерин. Кроме того, некоторые пестициды структурно сходны с промежуточными продуктами цикла Кребса (включая сукцинилкоэнзим А, ключевой субстрат бета-окисления жирных кислот в митохондриях). ФОС и карбаматы могут негативно воздействовать на функции митохондрий и энергетический баланс, при этом выраженность воздействия у ФОС и карбаматов различается [112]. Высказано предположение, что относительная нейротоксичность ФОС и алдикарба частично отражает нехолинергические механизмы, которые, вероятно, способствуют развитию нейротоксичности [125].

Очевидно, что вышеперечисленные различия следует учитывать при разработке терапевтических подходов к лечению отравлений карбаматами.

1.3 Терапия токсического судорожного синдрома при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия

Изначально подходы к профилактике и лечению отравлений веществами антихолинэстеразного действия разрабатывались с учетом ФОС и, прежде всего, боевых отравляющих веществ на их основе.

Купирование судорожного синдрома и его отдаленных последствий является важным элементом экстренной терапии при интоксикации веществами антихолинэстеразного действия [50]. К мероприятиям экстренной медицинской

помощи относятся: удаление от источника воздействия и прекращение дальнейшего поступления токсиканта в организм больного, обеспечение проходимости дыхательных путей и венозного доступа, инфузионно-детоксикационная терапия, коррекция метаболического ацидоза [77].

Неотъемлемой частью комплексного лечения острых отравлений является антидотная терапия. Являясь этиотропными лекарственными средствами, антидоты способствуют обезвреживанию конкретного яда или предупреждению или устранению вызванного им специфического токсического эффекта [15, 23, 42]. Антидотная терапия относится к методам активной детоксикации и наиболее эффективна в ранней токсикогенной стадии отравлений, поэтому использование антидотов эффективно на первых этапах оказания медицинской помощи пострадавшим, в том числе в порядке само- и взаимопомощи [13, 20, 50]. В начальном периоде экспозиции к высокотоксичным веществам антихолинэстеразного действия (в пределах нескольких минут) для профилактики и купирования судорог традиционно применяются лекарственные препараты и антидоты преимущественно с центральной М-холиноблокирующей активностью [59]. Стандартным антидотом химических соединений с холиномиметической и антихолинэстеразной активностью (преимущественно – ФОС) является тропиновый эфир троповой кислоты – Атропин (торговое название – Атропина сульфат). Выступая как мускариновый антагонист, Атропин способен блокировать М-холинорецепторы и, тем самым, в условиях воздействия на организм антихолинэстеразных веществ защищать рецептор от избыточных концентраций эндогенного ацетилхолина, образующихся в результате угнетения ферментативной активности ацетилхолинэстеразы [86]. В нашей стране и за рубежом Атропин также широко используется для лечения острых отравлений карбатами [32, 48, 66]. Однако, необходимо учитывать, что в спектре фармакологической активности Атропина преобладают эффекты, обусловленные взаимодействием его молекулы преимущественно с периферическими М-холинорецепторами, и как средство фармакотерапии отравлений антихолинэстеразными веществами, включая карбаты, Атропин обладает слабо

выраженной противосудорожной активностью [9, 55]. Клинические и экспериментальные наблюдения свидетельствуют, что применение Атропина при острой интоксикации карбаматами должно осуществляться только при условии контроля уровнем и активностью АХЭ, поскольку вследствие быстрого восстановления активности фермента при взаимодействии с карбаматом возможно появление нежелательных антихолинергических эффектов – признаков переатропинии. Передозировка Атропином приводит к развитию тахикардии, галлюцинаций, паралича аккомодации, при отсроченном введении возможен смертельный исход за счет блокады окончаний блуждающего нерва и фибрилляции желудочков сердца на фоне выраженной гипоксии [9]. В число ряда антидотов ФОС, помимо Атропина, входят реактиваторы холинэстеразы или оксимы (пралидоксим (ПАМ) и другие). Автоинжекторы для антидотной терапии при отравлении ФОС, разработанные для армии США, содержат две секции, обеспечивающие введение комбинации Атропина и 2-ПАМ [59]. Поскольку в ряде стран терапия отравлений ФОС и карбаматами осуществляется по единой схеме, при анализе эффективности лечения в смешанных группах продемонстрировано, что сочетанная терапия Атропином и пралидоксимом более эффективна, чем монотерапия Атропином или применение сочетания Атропин-гликопирролат [137]. Однако, по другим данным, использование реактиваторов АХЭ, таких как 2-ПАМ или карбоксим не рекомендуется при интоксикации карбаматами, поскольку карбомилированный фермент не подвержен реакции «старения», а применение может дополнительно усиливать токсичность карбаматов [67]. Описано повышение инактивации АХЭ при введении пралидоксима в случаях отравления карбарилами [63]. При переходе отравления в «смешанную» стадию, использование холиноблокаторов не устраняет судороги. Длительная, рецидивирующая генерализованная судорожная активность в третьей, «глутаматергической» стадии уже практически не связана с холинергическими механизмами. Для купирования судорожного синдрома на этом этапе применяются бензодиазепины, воздействующие на рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), и способные модулировать нейротрансмиссию

[46, 114]. В научной литературе описаны многокомпонентные укладки с автоинжекторами, содержащие оксим, Атропин и Диазепам (вещество бензодиазепинового ряда) [153]. Препараты имидазобензодиазепинового ряда, в первую очередь Мидазолам, отличаются улучшенной по сравнению с Диазепамом фармакокинетикой [127], однако в целом при отсроченном введении (через 10 минут после воздействия или позже) эффективность бензодиазепинов и Мидазолама значительно снижается, могут развиваться рефрактерные судороги на фоне нейровоспаления [137].

Для купирования генерализованного судорожного синдрома токсического генеза часто применяются лекарственные препараты, используемые в клинической практике для терапии истинной хронической эпилепсии, поскольку патогенез судорожных состояний и в этом случае включает нарушения функций ГАМК-ергической и глутаматергической нейромедиаторных систем, а также изменения физиологического баланса процессов торможения и возбуждения [39, 50, 130]. В частности, для усиления лечебных эффектов антидотов при развитии рефрактерных к бензодиазепинам судорог и в случаях отсутствия средств антидотной терапии применяются такие симптоматические лекарственные средства как Фенобарбитал, Леветирацетам (для подавления высвобождения нейротрансмиттеров), Фенитоин (для стабилизации функции натриевых каналов), Прегабалин (для блокады кальциевых каналов), Пропофол, Кетамин или Лозартан (анестетики) [123, 148], Оксibuтират натрия и другие препараты. В качестве противосудорожных агентов была исследована эффективность применения антагонистов глутаматных рецепторов, в частности, таких блокаторов NMDA-рецепторов как Мемантин и Гациклидин [86, 147].

Вальпроевая (дипропилуксусная) кислота и её различные производные (вальпроаты) уже давно и широко применяются в клинической терапии как средства лечения эпилепсии широкого спектра действия [40, 99]. При изучении механизмов действия вальпроатов установлена их способность блокировать потенциалзависимые Na^+ каналы и Ca^{2+} каналы Т-типа и тем самым угнетать распространение потенциала действия и стабилизировать нейрональные

мембраны [135, 139]. Пре- и постсинаптическая модуляция ГАМК-ергической передачи является одним из основных механизмов действия вальпроевой кислоты и заключается как в прямом в воздействии на рецепторы гамма-аминомасляной кислоты, так и в опосредованном изменении ингибирующей активности ГАМК, включая регуляцию уровней взаимосвязанных с патогенетическими механизмами гормонов (серотонина и дофамина) в гиппокампе и других отделах ЦНС, воздействие на заряд клеточной мембраны. Также описаны эпигенетические функции вальпроатов и их способность влиять на нейрогенез [139], что в совокупности способствует снижению порога возбудимости и уровня судорожной готовности моторных зон ЦНС. К недостаткам вальпроевой кислоты относится высокая эффективная доза, требующаяся при генерализованном судорожном синдроме: согласно опубликованным результатам экспериментов, только дозы от 150 мг/кг и выше способны подавлять генерализованные судороги [96]. В готовых лекарственных формах, содержащих производные вальпроевой кислоты, используется сама кислота и её соли (торговые названия: Конвулекс, Депакин, Ацедипрол) [33]. Недостатком Депакина и других препаратов вальпроевой кислоты является кратковременный лечебный эффект, обусловленный коротким периодом полувыведения действующего начала из организма, что требует повторных введений препаратов [33, 94].

Известен ряд работ по синтезу моноэфиров вальпроевой кислоты и производных амида вальпроевой кислоты и применению этих соединений в качестве «пролекарств», приобретающих целевую фармакологическую активность после биотрансформации в организме [142]. В частности, в Италии зарегистрирована пероральная форма противосудорожного средства на основе вальпромида – производного вальпроевой кислоты действующего именно как «пролекарство» (вальпроевая кислота высвобождается в процессе гидролиза в желудке). [74]. В рамках реализации исследований разработан и запатентован гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропиленаноата, содержащий в качестве фрагментов вальпроевой кислоту и последовательность для воздействия на анионный центр М-холинорецепторов в головном мозге [43].

Ведется активный поиск и разработка средств купирования рефрактерных к стандартной антидотной терапии судорог, включая мультитаргетные лекарственные препараты, способные оказывать М-холиноблокирующее и глутамат-блокирующее действие при отравлениях антихолинэстеразными веществами. Подобное комплексное мультитаргетное действие установлено для таких лекарственных препаратов как Карамифен, Бенактизин, Тригексифенидил (Циклодол) [85, 136, 156]. Имеются экспериментальные доказательства, что подобные препараты проявляют противосудорожный и нейропротективный эффект при их введении в более поздние временные промежутки после экспозиции к ФОС (через 30 и 60 мин) по сравнению с существующими антидотами. Подтверждена высокая противосудорожная активность мультитаргетного препарата Карамифена, рассматриваемого в качестве перспективного антидота ФОС отсроченного действия [85, 121, 136]. Американскими исследователями установлено, что Карамифен проявляет противосудорожный и нейропротективный эффекты в экспериментах по введению крысам зомана в дозе 1,4 ЛД₅₀ даже через 1 час после введения токсиканта [85]. Среди официальных лекарственных препаратов с подобным действием в России выпускались тригексифенидил (Циклодол) и биперидон (акинетон) [100], однако инъекционная форма Циклодола в настоящее время не производится. К числу перспективных средств фармакотерапии токсических судорог с избирательным влиянием на центральные холинорецептивные системы относится и Диферидин – оригинальное вещество из группы ацетиленовых аминоспиртов, способное блокировать центральные М- и Н- холинорецепторы и периферические М-холинорецепторы [30, 51].

Очевидно, что предотвращение прямой угрозы жизни пострадавших является приоритетной задачей при введении антидотов и средств симптоматической терапии в целях купирования длительных или повторяющихся генерализованных судорожных приступов. Однако, контроль судорожных состояний не менее важен и для профилактики нейродегенеративных

повреждений у выживших [1, 13, 27, 47, 50, 135], что обосновывает применение нейропротекторов в составе комплексной терапии.

Таким образом, острые интоксикации производными карбаминовой кислоты, сопровождающиеся развитием судорожного синдрома, получают все большее распространение во всем мире, являются потенциально жизнеугрожающим состоянием и могут приводить к развитию стойких неврологических нарушений в отдаленной перспективе. Соответственно, изыскание и разработка новых лекарственных средств, эффективно купирующих токсические проявления, вызываемые производными карбаминовой кислоты, и особенно судорожный синдром при острых отравлениях карбаматами, является актуальной задачей современной токсикологии. При этом структурные отличия от ФОС и специфические особенности токсического действия карбаматов (обратимая ингибция АХЭ, меньшая продолжительность проявлений интоксикации и другие отличия от воздействия ФОС) требуют разработки экспериментальных моделей, позволяющих оценивать эффективность и безопасность разрабатываемых средств лечения именно при воздействии веществ данного ряда.

При разработке средств купирования судорожного синдрома под воздействием карбаматов особого внимания заслуживают потенциальные противосудорожные средства из следующих фармакологических групп:

- препараты с преимущественным влиянием на холинореактивные системы ЦНС;
- препараты мультитаргетного действия, одновременно блокирующие М-холинорецепторы и NMDA-рецепторы, проявившие высокую защитную эффективность при отравлениях ФОС;
- препараты широкого спектра действия, в частности, используемые в качестве противоэпилептических средств, эффективные при различных формах судорог, включая генерализованные.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

План экспериментального исследования подразделялся на два этапа:

1 Разработка новой экспериментальной модели судорожного синдрома с применением производного карбаминовой кислоты (Фенилкарбамата) в качестве судорожного агента;

2 Изучение специфической (противосудорожной) активности перспективных средств терапии интоксикации производными карбаминовой кислоты на примере Фенилкарбамата.

В свою очередь, второй этап подразделялся на:

а) сравнительное изучение эффективности средств терапии токсикогенной фазы острой интоксикации Фенилкарбаматом;

б) сравнительное изучение эффективности средств профилактики и терапии соматогенной фазы острой интоксикации карбаматом.

На рисунке 5 представлена блок-схема реализации первого этапа.

В качестве модельного токсиканта был выбран Фенилкарбамат (производное карбаминовой кислоты). Для оценки качества и подтверждения применимости новой экспериментальной модели, предназначенной для тестирования лекарственных средств в доклинических исследованиях, её основные характеристики сравнивались с двумя широко известными судорожными экспериментальными моделями, основанными на введении животным коразола и тиосемикарбазида и активно применяющимися при разработке новых противосудорожных средств (преимущественно для лечения истинной эпилепсии). Подробное описание использованных в разработке моделей веществ, провоцирующих развитие генерализованного судорожного синдрома, приведено в разделе 2.2.

Разработка экспериментальной модели проведена на мелких лабораторных животных (половозрелых крысах самцах с массой тела 200-240 г). Животные распределялись по группам методом стратификации с использованием в качестве основного критерия массы тела.

Более подробное описание животных и условий их содержания приведены в разделе 2.3.

Для оценки характера судорожного синдрома лабораторные животные распределены на 3 группы по 20 особей (таблица 4). На этих же животных проведено изучение двигательной активности, нейромоторных функций, сердечно-сосудистой системы (по 10 особей из каждой группы), а также оценка когнитивных функций (по 10 особей из каждой группы). Для проведения биохимического, антиоксидантного исследования крови было сформировано 4 группы по 24 особи и на каждую точку (сутки) было использовано по 6 особей. Для изучения активности холинэстеразы в крови и головном мозге были сформированы 2 группы лабораторных животных по 30 особей (5 точек по 6 особей). В исследовании были использованы крысы – самцы.

Таблица 4 – Схема эксперимента по сравнительному изучению судорожных токсикантов

Группа, доза	Количество животных	Тест «Открытое поле» 24,48 часа	Тест УРПИ 2, 24 часа	ЭКГ АД 24 часа	Тест «Сила хвата» 24 часа	Биохим. анализ 1,2,7, 14 сутки	Гистология 1,3,4,5 сутки	Активность АХЭ 10,30,60 минут, 6, 24 часа
ФК, 0,1 мг/кг	50	10	10	10	10	-	5 шт. на точку	
ФК, 1 мг/кг	105	10	10	10	10	6 шт. на точку	5 шт. на точку	6 шт. на точку
Коразол 40 мг/кг	50	10	10	10	10	-	5 шт. на точку	
Коразол 65 мг/кг	90	10	10	10	10	6 шт. на точку	5 шт. на точку	
ТСК, 5 мг/кг	50	10	10	10	10	-	5 шт. на точку	
ТСК, 8 мг/кг	90	10	10	10	10	6 шт. на точку	5 шт. на точку	
Контроль	105	10	10	10	10	6 шт. на точку	5 шт. на точку	6 шт. на точку



Рисунок 5 – Последовательность разработки новой экспериментальной модели судорожного синдрома и реализации методов оценки токсического действия модельного вещества – Фенилкарбамат

На втором этапе работы, с использованием новой экспериментальной модели проводилось сравнительное изучение эффективности официальных, ресинтезированных и оригинальных средств, перспективных для терапии

судорожного синдрома при острой интоксикации, а также для профилактики и лечения неврологических нарушений в отдаленной перспективе (рисунок 6).

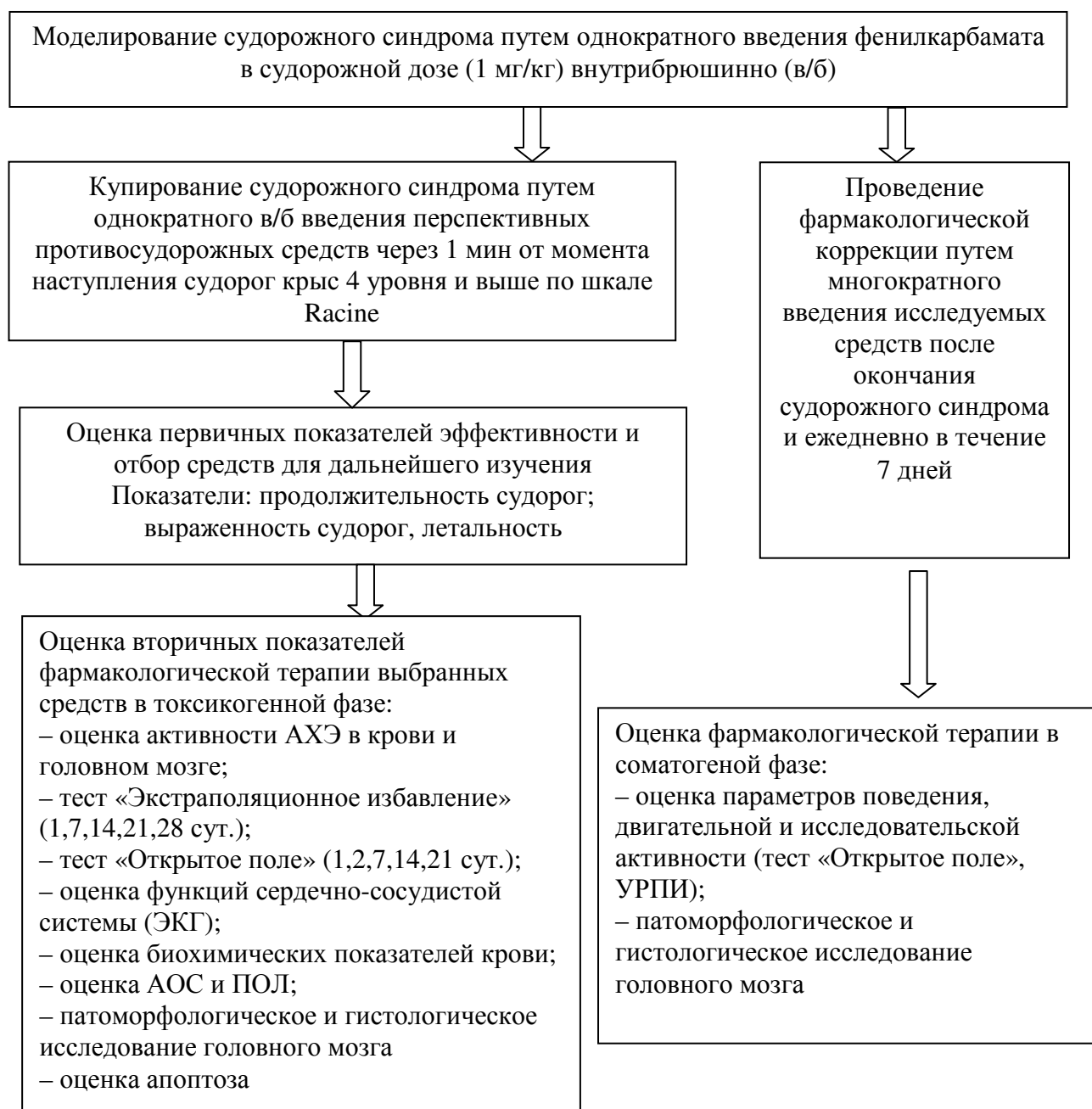


Рисунок 6 – Изучение эффективности средств купирования токсического судорожного синдрома и средств фармакологической коррекции неврологических последствий судорожного синдрома, вызываемого у крыс Фенолкарбаматом

Подробное описание использованных в работе официальных, ресинтезированных и оригинальных средств терапии приведено в разделе 2.2. В таблице 5 схематично представлен эксперимент по сравнительному изучению эффективности терапии судорожного синдрома в токсикогенной фазе с

использованием новой модели на основе Фенилкарбамата (вещества, количество животных, доза введения).

Таблица 5 – Схема эксперимента по сравнительному изучению противосудорожной активности лекарственных средств по сравнению с Атропином, Реланиумом

Группа	Пол	Количество животных	Вещества	Доза, мг/кг
1	самцы	45	Фенилкарбамат (ФК)	1,0
2	самцы	14	ФК+Атропина сульфат (А)	1,0+1,0
3	самцы	14	ФК+Реланиум (Рел)	1,0+2,0
4	самцы	10	ФК+Карамифен (Кар)	1,0+50,0
5	самцы	10	ФК+Тригексифенидил (Триг)	1,0+20,0
6	самцы	10	ФК+Диферидин (Диф)	1,0+2,0
4	самцы	10	ФК+аминоэфир вальпроевой кислоты, образец № 1 (АВК№1)	1,0+43,0
5	самцы	10	ФК+аминоэфир вальпроевой кислоты, образец № 2 (АВК№2)	1,0+43,0
6	самцы	10	ФК+аминоэфир вальпроевой кислоты, образец № 3 (АВК№3)	1,0+43,0
7	самцы	10	ФК+аминоэфир вальпроевой кислоты, образец № 4 (АВК№4)	1,0+43,0

Фенилкарбамат вводился внутривенно, объем вводимого объема рассчитывался исходя из массы тела животного. Растворителем для всех вводимых веществ являлся 0,9% раствор натрия хлорида. Все исследуемые средства терапии вводили через 1-2 минуты после наступления судорог.

Наблюдение за животными после введения судорожного агента и терапии осуществлялось в течение 2 часов. Оценивались следующие скрининговые показатели эффективности применяемой терапии: летальность, выраженность судорожного синдрома в баллах по шкале судорог, продолжительность судорожного синдрома.

После проведения скринингового исследования эффективности выбраны наиболее эффективные средства купирования судорожного синдрома и проведено повторное сравнительное изучение при остром отравлении Фенилкарбаматом с изучением поведенческих, физиологических тестов (таблица 6).

Таблица 6 – Схема эксперимента дополнительного изучения противосудорожной активности и фармакологической активности на крысах наиболее эффективных лекарственных средств

Экспериментальная группа, доза	Количество животных	Пол	Тест «Открытое поле»	Тест «Экстраполяционное извлечение»	Измерение ЭКГ
ФК, 1 мг/кг	45	самцы	Через 24 часа, 7, 14, 21 суток	Через 24 часа, 7, 14, 28 суток	Через 24 часа, 7, 14 суток
ФК+Реланиум 1,0+2,0 мг/кг	14	самцы			
ФК+Карамифен 1,0+2,0 мг/кг	14	самцы			
ФК+Дифередин 1,0+2,0 мг/кг	10	самцы			
ФК+АВК №3 1,0+43,0 мг/кг	10	самцы			

В таблице 7 схематично представлен эксперимент по сравнительному изучению эффективности терапии с нейропротективным эффектом в соматогенной фазе, с использованием новой модели на основе Фенилкарбамата (вещества, количество животных, доза введения)

Таблица 7 – Схема сравнения фармакологической терапии официальных лекарственных препаратов, обладающих нейропротективным эффектом на модели судорожного синдрома отравления Фенилкарбаматом

Экспериментальная группа	Доза, мг/кг	Общее количество животных	Тест УРПИ (2, 24, 48 часов)	Тест «Открытое поле» (24, 48 часов)	Некропсия с гистологией (24 часа, 5, 7 суток)
Контроль (вода для инъекций)	–	25	10	10	15
Фенилкарбамат (ФК)	1,0	25	10	10	15
ФК +Мексидол	122,0	25	10	10	15
ФК+Ноопепт	25,7	25	10	10	15
ФК+Мемантин	54,0	25	10	10	15
ФК+Циклодол	47,0	25	10	10	15

Средства для профилактики неврологических нарушений в отдаленном периоде вводились сразу по окончании судорог у животных и ежедневно в течение 7 дней внутривенно с помощью атравматического металлического зонда.

2.2 Используемые вещества в исследовании

2.2.1 Соединения, применявшиеся для разработки экспериментальной модели судорожного синдрома

При разработке новой экспериментальной модели судорожного синдрома, в качестве судорожного агента применялся обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы из группы карбаматов, а именно: гидрохлорид замещенного 2-[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбамата ($C_7H_7O_2N$) (фениловый эфир карбаминовой кислоты), далее – Фенилкарбамат (рисунок 7).

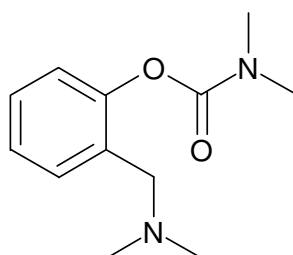


Рисунок 7 – Фенилкарбамат, структурная формула

Фенилкарбамат синтезирован в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России под руководством к.х.н. А.Я. Беспалова и защищен патентом Российской Федерации на изобретение № 2754133 «Гидрохлориды замещенных 2-[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбаматов, обладающие антихолинэстеразной активностью» [44].

Выбор соединения обусловлен тем, что Фенилкарбамат является обратимым ингибитором холинэстераз, разработанным как лекарственное средство для подавления активности холинергических систем головного мозга при дефиците ацетилхолина. Таким образом, данное соединение можно отнести к разряду перспективных субстанций и активных компонентов лекарственных средств, а именно бытовые отравления и передозировки лекарственных средств вносят основной вклад в структуру отравлений веществами антихолинэстеразного действия. Соответственно, модель на основе применения данного соединения будет приближена к «реальным» условиям и востребована как для изучения особенностей механизмов токсического действия карбаматов, входящих в состав

лекарственных средств, на организм, так и для изучения эффективности и безопасности средств купирования генерализованного судорожного синдрома в доклинических исследованиях.

Образец Фенилкарбамата для проведения исследований синтезирован на базе лаборатории синтеза лекарственных соединений ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России. Индивидуальность соединения контролировалась методом ТСХ и подтверждена данными спектроскопии ^1H ЯМР (разрешение 500 МГц, ДМСО), химическая чистота составила 98%. Для подтверждения применимости разрабатываемой модели в целях тестирования новых средств терапии судорожного синдрома в доклинических исследованиях и для оценки сопоставимости ее ключевых характеристик сравнивали с признанными и активно применяющимися экспериментальными моделями судорожного синдрома со следующими химическими веществами:

– Коразол (Пентилентетразол, 6,7,8,9-тетрагидро-5Н-тетразоло(1,5-а)азепина, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4$), антагонист ГАМК-ергического торможения, производитель Sigma-Aldrich, США.

– Тиосемикарбазид (амид гидразинотионкарбоновой кислоты, $\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$), действующий на ГАМК-ергическую медиаторную систему – ингибитор синтеза ГАМК, синтезирован в лаборатории синтеза лекарственных соединений ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Все судорожные агенты вводили однократно исходя из массы тела животного (нелинейные крысы). Условия воздействия представлены в таблице 8. В качестве растворителя использовали 0,9% раствор натрия хлорида.

Таблица 8 – Экспериментальные судорожные агенты и дозы введения

Судорожный агент	Условия воздействия
Коразол	Дозы: 40 мг/кг (субсудорожная), 65 мг/кг (судорожная), подкожно (в холку животного) в виде водного раствора в объеме 1 мл/1000г массы тела
Фенилкарбамат	Дозы: 0,1 мг/кг (субсудорожная), 1 мг/кг (судорожная), в/б в виде водного раствора в объеме 1 мл/1000г массы тела
Тиосемикарбазид	Дозы: 5 мг/кг (субсудорожная), 8 мг/кг (судорожная), подкожно (в холку животного) в виде водного раствора 1 мл/1000г массы тела

2.2.2 Соединения, применявшиеся для фармакологической терапии острого токсического судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом

Для апробации новой экспериментальной модели в условиях сравнительного изучения эффективности купирования судорог в остром периоде интоксикации выбраны следующие зарегистрированные, ресинтезированные и оригинальные средства фармакологической коррекции.

2.2.2.1 Зарегистрированные лекарственные препараты сравнения

– Атропина сульфат®, раствор для инъекций 1 мг/мл (ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России), классический официальный антидот при отравлении антихолинэстеразными веществами, включая карбаматы, в дозе 1 мг/кг.

– Реланиум® (Relanium®), раствор для в/в и в/м введения 5 мг/мл (АО «Варшавский фармацевтический завод Польфа»), зарегистрированный лекарственный препарат «первой линии помощи» бензодиазепинового ряда с противосудорожной активностью, в дозе 1 мг/кг.

2.2.2.2 Исследуемые перспективные соединения

– Карамифен (2-(диэтиламино) этил-1-фенил-циклопентан-1-карбоксилата гидрохлорида), ресинтезирован в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, структура приведена на рисунок 8.

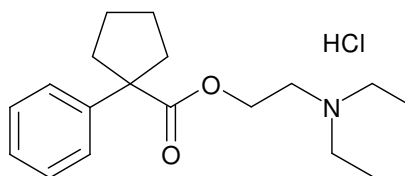


Рисунок 8 – Структурная формула Карамифена

Выбор Карамифена обоснован тем, что, помимо зарегистрированной фармакологической эффективности в качестве противокашлевого средства (внедрён в медицинскую практику в США с конца 1940-х годов), он отличается антагонистическими свойствами к ФОС и рассматривается как перспективный

антидот отсроченного действия при интоксикации необратимыми ингибиторами холинэстераз, способный блокировать и М-холинорецепторы, и NMDA-рецепторы [85, 156].

– Циклодол®, (тригексифенидил) производитель ОАО «Фармстандарт-Лексредства», с описанным мультитаргетным холинолитическим и блокирующим NMDA-рецепторы действием.

– Диферидин (хлоргидрат-1,1-дифенил-4-пиперидино-бутин-2-ола-1), синтезированный в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России и также способный ингибировать М-холинорецепторы и NMDA-рецепторы, структура приведена на рисунке 9.

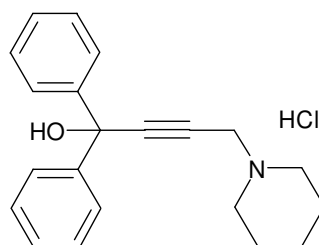


Рисунок 9 – Структурная формула Диферидина

Данный оригинальный ацетиленовый аминоспирт впервые был синтезирован во ФГБУН ИТ ФМБА России в 1960-х годах и исследован фармакологически Разумовой М.А. Установлено, что Диферидин является блокатором центральных М- и Н-холинорецепторов и периферических М-холинорецепторов [30, 51], проявляет фармакологическую активность в небольших дозах, обладает низкой токсичностью. Диферидин входит в состав запатентованной лекарственной композиции, применяемой при перевозбуждении вестибулярного аппарата [45]. Исходя из химической структуры, данное вещество может обладать, наряду с холиноблокирующим и NMDA-блокирующим действием.

– Оригинальные производные солей аминоэфира вальпроевой кислоты:

а) диметиламиноэтиловый эфир вальпроевой кислоты сукцинат (образец №1);
Спектр ЯМР: 4.10(2H, т, CH₂); 3.90(2H, уш.с, 2COOH-соль); 2.41(4H, с, 2CH₂-

соль); 2.56(2H, т, CH₂); 2.32(1H, м, CH); 2.22(6H, с, 2CH₃N); 1.48(2H, м, CH₂); 1.38(2H, м, CH₂); 1.25(4H, м, 2CH₂); 0.87(6H, т, 2CH₃);

б) йодметилат диметиламиноэтилового эфира вальпроевой кислоты (образец №2); Спектр ЯМР: 4.47(2H, т, CH₂); 3.68 (2H, т, CH₂); 3.16 (9H, с, 3CH₃N⁺); 2.38 (1H, м, CH); 1.52 (2H, м, CH₂); 1.43 (2H, м, CH₂); 1.27 (4H, м, 2CH₂); 0.88 (6H, т, 2CH₃);

в) (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид (образец №3); Спектр ЯМР: 11.08(1H, уш.с, N+H); 5.01 (1H, м, CH); 3.30(1H, м, CH); 3.09(2H, м, CH₂); 2.71(3H, с, CH₃N); 2.69(2H, м, CH₂); 2.34(1H, м, CH); 2.02(2H, м, CH₂); 1.87(2H, м, CH₂); 1.50(2H, м, CH₂); 1.41(2H, м, CH₂); 1.24(4H, м, 2CH₂); 0.86(6H, т, 2CH₃);

г) йодметилат N – метилпиперидиновый эфир вальпроевой кислоты (образец №4). Спектр ЯМР: 11.85(1H, с, N+H); 4.46(2H, т, CH₂); 3.92-3.86(4H, м, 2CH₂); 3.37(4H, м, 2CH₂); 3.14(2H, м, CH₂); 2.40(1H, м, CH); 1.52-1.43(4H, м, 2CH₂); 1.24(4H, м, 2CH₂); 0.86(6H, т, 2CH₃);

Структуры аминокэфиров приведены на рисунке 10.

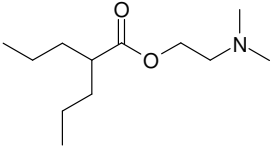
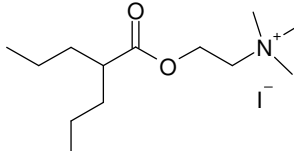
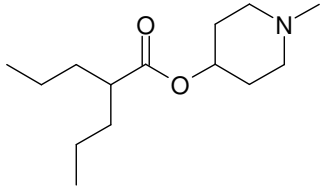
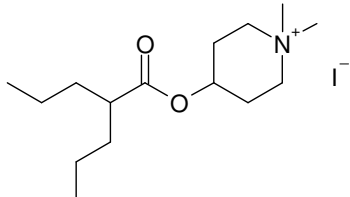
ABK №1		ABK №2	
ABK №3		ABK №4	

Рисунок 10 – Структурные формулы производных солей аминокэфира вальпроевой кислоты

Выбор данной группы соединений обусловлен широким спектром фармакологической активности вальпроевой кислоты и ее производных по данным научной литературы. Известно, что вальпроевая кислота способна ингибировать натриевые потенциалзависимые каналы нейронов и тормозить функции ГАМК-ергической системы, способствует усилению вызываемого

воздействием ГАМК постсинаптического ингибирования. Также описано влияние вальпроевой кислоты на ферменты, задействованные в расщеплении и синтезе ГАМК (ингибирование ГАМК-трансаминазы, активация декарбоксилазы глутаминовой кислоты).

Синтез осуществлен на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России под руководством к.х.н. А.Я. Беспалова. Использован методический подход, разработанный в Институте токсикологии в 1970-х -1990-х годах, заключающийся в химической модификации лекарственных веществ на основе вальпроевой кислоты с целью продления их действия (дизайн пролекарств) [54].

Соответствие химической формуле подтверждено методом хроматомасспектрометрии. Доза 43,0 мг/кг была выбрана на основании инструкции по медицинскому применению у человека лекарственного средства Конвулекс® (Convulex®), раствор для внутривенного введения при в/в введении рекомендованная суточная доза вальпроевой кислоты составляет 5–10 мг/кг. В исследовании за основу расчета эффективной дозы использована средняя дозировка 7 мг/кг.

С учетом коэффициентов пересчета величина терапевтической дозы для крысы составляет $7,0 \times 39$ (коэффициент для человека массой 70 кг) / 6,5 (коэффициент для крысы массой 200 г) ≈ 43 мг/кг.

В таблице 9 приведены сводные данные по используемой фармакологической терапии.

Все исследуемые фармакологические вещества вводили однократно исходя из массы тела животного (нелинейные крысы). Введение осуществлялось после наступления судорог через 1 минуту. В качестве растворителя для субстанций новых веществ использовали 0,9% раствор натрия хлорида. Вещества в готовой лекарственной форме (Атропина Сульфат®, Реланиум®) использовались в нативном виде. Расчет величин тестируемых доз производился с использованием коэффициентов Freireich et al. [88].

Таблица 9 – Экспериментальная фармакологическая терапия

Фармакологические вещества	Условия воздействия
1	2
Атропина Сульфат®	Внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг в виде готовой лекарственной формы – раствор, в объёме 0,1 мл/100 г массы тела
Реланиум®	Внутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг в виде готовой лекарственной формы – раствор, в объёме 0,04 мл/100 г массы тела
Карамифен	Внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
Тригексифинидил	Внутрижелудочно в дозе 47 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
Дифередин	Внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
Диметиламиноэтиловый эфир вальпроевой кислоты сукцинат (образец №1)	Внутрибрюшинно в дозе 43 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
Йодметилат диметиламиноэтилового эфира вальпроевой кислоты (образец №2)	Внутрибрюшинно в дозе 43 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
N - метилпиперидиновый эфир вальпроевой кислоты хлоргидрат (образец №3)	Внутрибрюшинно в дозе 43 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела
Йодметилат N – метилпиперидиновый эфир вальпроевой кислоты (образец №4)	Внутрибрюшинно в дозе 43 мг/кг в виде водного раствора 0,1 мл/100 г массы тела

2.2.3 Соединения, применявшиеся для фармакологической коррекции последствий соматогенной фазы после судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом

К основным патологическим факторам, индуцирующим формирование нейropатологических изменений в отдаленном периоде, можно отнести выявленное ранее нарушение кровоснабжения участков головного мозга под действием конвульсантов, приводящее к окислительному стрессу, вызванному повреждением мембран митохондрий и перекисным окислением мембранных липидов в нейронах головного мозга. Установленные зарубежными и

отечественными исследователями повреждения и гибель нейронов мозга в результате тяжёлых отравлений судорожными агентами, приводящие к функциональным нарушениям, могут быть связаны с глутаматной эксайтотоксичностью [65, 87, 160]. Исходя из этого, отбор официальных лекарственных препаратов с целью их последующего использования для восстановительной терапии в течение поздней соматогенной стадии отравлений веществами судорожного действия проводился среди лекарственных средств, обладающих нейропротективным действием [59].

В результате были выбраны:

- Мексидол® (ФАРМАСОФТ, Россия), являющийся сукцинатсодержащим антиоксидантом (Этилметилгидроксипиридина сукцинат) [10], вводился в дозе 122 мг/кг;
- Ноопепт® (ЗАО «ЛЕККО»), относящийся к дипептидам с ноотропным действием (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) [130], вводился в дозе 25,7 мг/кг;
- Мемантин® (ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России), являющийся блокатором рецепторов NMDA [56], вводился в дозе 54 мг/кг;
- Циклодол® (ОАО «Фармстандарт-Лексредства»), являющийся холинолитиком, способным дополнительно блокировать NMDA (тригексифенидил, структура приведена на рисунке 11), вводился в дозе 47 мг/кг. Выбор данного вещества обусловлен наличием холинолитической активности, наряду с M-холиноблокирующими выявлены также NMDA-блокирующие эффекты [156].

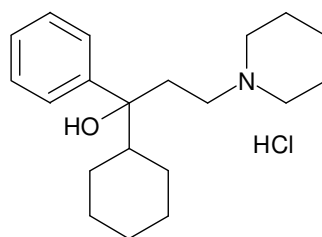


Рисунок 11 – Структурная формула тригексифенидила

При сравнительном изучении эффективности, вышеперечисленные препараты вводились сразу по окончании судорожного синдрома и далее ежедневно в течение 7 дней в дозе, соответствующей суточной дозе у человека, с учетом межвидового пересчёта с человека на крысу [36]. Введение препаратов осуществляли внутривентрикулярно с помощью металлического зонда. В качестве растворителя использовали 1% раствор крахмальной взвеси

2.3 Животные и их содержание

В экспериментальной работе применялись здоровые аутбредные крысы возрастом 3 месяца и массой тела до 250 г ($n=900$) из питомника Ленинградской области ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Количество животных для эксперимента было минимальным и достаточным чтобы получить статистически достоверные результаты изучаемых параметров согласно принципу 3 R [20].

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, в поликарбонатных клетках на подстиле по 6-10 особей (стерилизованные кукурузные гипоаллергенные опилки «Золотой кот»), клетки были покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Питание животных осуществлялось полнорационным кормом для грызунов, приготовленным в соответствии с ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» от 01.10.2020. Животным давали воду *ad libitum*, соответствующую ГОСТ Р 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества».

При проведении экспериментов животные распределялись по группам методом стратификации с использованием в качестве основного критерия массы тела.

Лабораторные животные до начала исследования содержались 5 дней для адаптации. Во время этого периода у животных каждый день контролировалось клиническое состояние путем визуального осмотра.

– Внешний вид животного:

а) положение тела в пространстве (естественное или вынужденное); норма: естественное;

б) упитанность (нормальная, пониженная, повышенная); норма – нормальная;

в) телосложение (сильное, среднее, слабое); норма – среднее.

– Поведение (спокойное, возбуждённое, угнетённое); норма – спокойное.

– Состояние шерсти (длина волос, их направление, блеск, прочность удержание в коже, эластичность); норма – средняя длина и правильная направленность волос, характерные для данного вида животных, шерсть блестящая эластичная, прочно удерживается в коже.

– Состояние кожи:

а) целостность; норма – отсутствие повреждений;

б) цвет (бледно-розовый, бледность, покраснение, синюшность, желтушность); норма – бледно-розовый;

в) влажность (повышенная, умеренная, сухая); норма – умеренно влажная;

г) запах; норма – специфический, характерный для данного вида животных;

д) температура (повышенная, умеренно-тёплая, пониженная); норма – умеренно-тёплая, одинаковая на симметричных участках;

е) эластичность (эластичная, снижение эластичности); норма – эластичная;

ж) наличие/отсутствие новообразований;

норма – отсутствие новообразований.

– Состояние видимых слизистых оболочек:

а) целостность; норма – отсутствие повреждений;

б) цвет; норма – бледно-розовые;

в) влажность; норма – умеренно влажные;

г) наличие/отсутствие выделений;

норма – отсутствие не характерных выделений;

д) наличие/отсутствие новообразований; норма – отсутствие новообразований.

Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Всем животным присваивался индивидуальный номер в виде метки на шерсти животного; фиксировался номер исследуемой группы и название исследования.

Эвтаназия осуществлялась с использованием специализированной установки фирмы Open Science (Россия). В качестве метода эвтаназии использовалась ингаляция CO_2 .

Биоэтической комиссией ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России были рассмотрены и утверждены ветеринарные протоколы по соблюдению биоэтических норм содержания и использования экспериментальных животных в исследовании (протоколы № 17/16 от 29.12.2016, № НИР/3-2018 от 27.12.2018, № 2/23 от 06.04.2023).

2.4 Определение токсикометрических параметров Фенилкарбамата

Эксперимент проводили на белых нелинейных крысах при двух путях введения вещества: внутрибрюшинный и внутрижелудочный. Исследуемую субстанцию вводили однократно. Для определения среднесмертельной дозы (LD_{50}) использовали табличный экспресс-метод по В.Б. Прозоровскому [49].

2.5 Моделирование и оценка судорожного синдрома

Выраженность судорожного синдрома у крыс после введения ксенобиотика определялась визуально по модернизированной шкале Racine [134], выделяющей 7 уровней интенсивности судорожного синдрома:

- Уровень 0 – отсутствие поведенческих изменений.
- Уровень 1 предполагает снижение общей активности животного.
- Уровень 2 – появление кивательных движений головой или жевательных движений.
- Уровень 3 – унилатеральный или билатеральный клонус передних лап без роющих движений, наличие синдрома Штрауба и вытягивание тела.
- Уровень 4 – клонус обеих передних конечностей с роющими движениями.
- Уровень 5 – вытягивание и лежащее положение у животных, клонико-тонические судороги.

– Уровень 6 – высокоинтенсивные тонические судороги и наличие экстензий.

Ранее было установлено, что 4-6 уровни по модернизированной шкале Racine отражают визуально регистрируемые признаки выраженного судорожного синдрома у данного вида экспериментальных животных и сопоставимы с проявлениями генерализованного судорожного синдрома или эпилептического статуса (*Status epilepticus*) у человека [60, 85].

Величина судорожной дозы определялась эмпирическим путем при введении Фенилкабамата в диапазоне доз, не превышавших значения ЛД₅₀.

При моделировании отравления с возникновением судорожного синдрома обратимым ингибитором АХЭ оценивались на протяжении 2 часов следующие параметры:

- латентный период наступления судорог, в минутах;
- выраженность судорожного синдрома, в баллах;
- продолжительность судорог, в минутах;
- летальность животных при судорогах, в процентах.

2.6 Методы оценки поведения, двигательной активности, памяти у экспериментальных животных

2.6.1 Тест «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» проводится в квадратной камере с зачерненными боковыми стенками и дном (50×50×50). Источник света располагается над камерой. С использованием системы VideoMot2 (TSE, Германия) фиксируются характер и количество движений животных, полученные результаты обрабатываются с помощью соответствующего программного обеспечения.

Исследование проводится на белых аутбредных крысах-самцах, в течение 2-х минут фиксируются показатели: горизонтальная и вертикальная активность (количество стоек у животного), груминг, скорость движения и пройденное расстояние в течение эксперимента, общая двигательная активность, количество движений в центре площадки и на периферии.

2.6.2 Тест условной реакции пассивного избегания (УРПИ)

Эксперименты проводили на белых нелинейных крысах-самцах. Состояние процессов памяти у экспериментальных животных как компонента когнитивных функций определяли в двухкамерной установке PACS-30 (Columbus Instruments, США) с помощью оценки условной реакции пассивного избегания болевого раздражения (УРПИ), предполагающей выработку у животных рефлекса на однократный болевой стимул (ток 1 мА продолжительностью 3 секунды в тёмном отсеке камеры, предпочитаемом крысами). Общее время эксперимента для каждого животного – 120 секунд.

До проведения основного эксперимента крыс проверяли на наличие норкового рефлекса, в исследовании использовались только животные у которых время пребывания в светлой камере (латентный период первого захода) не превышало 20 секунд. Обучение животных (болевое раздражение) проводили через 24 часа после введения судорожного агента и наступившего после судорожного синдрома. Воспроизведение проводилось через 2, 24 и 48 часов после обучения. При проведении эксперимента фиксировались следующие показатели: время первого захода в темную камеру – это латентный период, время пребывания в светлой и темной камерах.

2.6.3 Тест «Экстраполяционное избавление (ТЭИ) для оценки когнитивных функций

Данный тест с модификациями Н. Бондаренко [5], используется для оценки когнитивных функций и позволяет изучить индивидуальные различия решения задачи при поиске пути избавления из острой стресс-ситуации. Тестирование животных проводили в установке «Экстраполяционное избавление» для крыс массой 220-350 г, производства НПК Открытая Наука, Москва, Россия.

Установку наполняли водой с температурой 22-24°C, прозрачный цилиндр внутри установки был погружен в воду на 2,5 см. Крыса помещалась во внутрь цилиндра хвостом вниз, что позволяет имитировать падение в воду.

Время тестирования – 2 минуты.

Оцениваемые показатели: латентный период двигательной активности, латентный период подныривания под край цилиндра, число и длительность аверсивных реакций в форме карабканий и прыжков внутри цилиндра.

2.7 Оценка состояния нейромоторных функций в тесте «Сила хватки»

Эксперименты проводили на белых нелинейных крысах-самцах. Нарушение нейромоторных функций после судорог клинически выражаются общей слабостью, астенией. Физиологический тест «Сила хвата» проводился с применением прибора для определения силы хвата Gripstrengthmeter 303500 series, TSE (Германия). Регистрировали максимальную силу (р), прикладываемую животным при отпуске решетки, на которой установлен высокочувствительный датчик. Сила хватки измеряется в ньютонах. Измерения повторяли 3 раза, медианное значение было использовано для статистической обработки результатов.

2.8 Оценка показателей сердечной деятельности

Эксперименты проводили на белых аутбредных крысах-самцах с применением ветеринарного электрокардиографа «Поли-Спектр-8В» (Нейрософт, Россия).

Систолическое (САД) и диастолическое (ДАД) артериальное давление измеряли на приборе для неинвазивного измерения АД «NIPB-8» (Columbus Instruments, США). Животные предварительно помещались в restrейнеры, устанавливали в термостанции «Tail Warmer» при температуре 37°C на 20 минут для разогрева хвостовой артерии. После этого с помощью резиновой (латексной) манжеты производили пережатие хвостовой артерии и измеряли давление путём её постепенного ослабления (метод Короткова) [26]. Измерение проводили 3 раза.

– Регистрация электрокардиограммы во II-ом стандартном отведении.

При проведении исследования животные предварительно помещались в restrейнер. Электроды вводились крысам подкожно. ЭКГ записывали, используя стандартные отведения. Показатели ЭКГ рассчитывали по II стандартному

отведению. Обработка полученных результатов производилась в прилагающемся к оборудованию программном обеспечении «Поли-Спектр».

2.9 Оценка активности ацетилхолинэстеразы головного мозга и цельной крови

Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах. Получаемые от животных образцы крови и ткани головного мозга (по 6 животных на одну точку временного интервала) анализировались на активность ацетилхолинэстеразы по методу Элмана [83]. Временные точки забора биоматериала выбирались на основании полученных экспериментальных данных о прекращении судорог у животных при воздействии фармакологической коррекции. Головной мозг промывали в 0,9% растворе хлорида натрия, высушивали и выдерживали при температуре 5-10°C до проведения процедуры гомогенизации.

Для определения активности фермента исходный гомогенат с концентрацией 111 мг/мл и цельную кровь разводили в 25 раз К-Na-фосфатным буфером 1/15N с pH 7,4 для гомогената из головного мозга и pH 7,8 для цельной крови. На анализ отбирали по 0,2 мл разведения, реакцию проводили на водяной бане при 37°C. После добавления 0,05 мл 0,035N раствора субстрата ацетилтиохолина через 15 мин проводили ингибирование реакции 0,1 мл раствора эзерина (1% раствор), пробы доставали из водяной бани и добавляли 2 мл 0,01% раствора 5,5'-Дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) в соответствующем буфере. В контрольные пробы для определения спонтанного гидролиза ацетилтиохолина сначала добавляли ингибитор АХЭ, затем субстрат. После инкубации пробы фотометрировали при длине волны 412 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

2.10 Патоморфологическое исследование головного мозга крыс

Забор гистологических образцов тканей головного мозга у животных был проведен в разные временные промежутки после введения судорожных агентов и средств фармакологической коррекции. Головной мозг крыс помещали для фиксации в 10 % раствор нейтрального формалина.

Затем осуществляли проводку, после чего препараты заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали в соответствии с методами Ниссля и Шпильмейера, гематоксилином и эозином. Изображения образцов фиксировались с применением фотокамеры (Nikon DS-Fi1c) и люминесцентного микроскопа (Nikon Eclipse 80i), оснащённого объективом Plan Fluor 20x/0.50 DIC N2 ∞ /0.17 WD 2.1 и окуляром x10. Увеличение объектива составило x100, x400. Выдержка при съёмке составила 1/150 секунды. Снимки делались в высоком (2560x1920 пикселей) разрешении.

2.11 Биохимическое исследование образцов крови

Для проведения биохимического анализа осуществлён отбор биологического материала (крови) у животных в пробирки через определённые временные интервалы: 24, 48 часов и 7, 14 суток.

Отобранный биологический материал подвергался процессу центрифугирования (центрифуга Z 326 K, производства Германия, серийный номер 66110159). Центрифугирование осуществлялось при следующих параметрах: 3000 оборотов в минуту, температура 4°C, продолжительность – 10 минут. Для дальнейших исследований отбирали надосадочную жидкость – сыворотку. Исследовали прозрачную сыворотку без признаков гемолиза. Определение биохимических показателей проводили на анализаторе А-25 («BioSystems», Испания) с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (Россия). В исследовании определяли показатели: триглицериды, общий холестерин, общий билирубин, альбумин, мочевины, креатинин, а также активность ряда ферментов (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, щелочной фосфатазы). Калибровку анализатора и внутренний контроль качества исследований производили на калибровочных и контрольных материалах АО «Вектор-Бест» (Россия).

2.12 Изучение показателей антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов

Чтобы исследовать антиоксидантную систему (АОС), использовали плазму крови и эритроцитарную взвесь. Эритроцитарную взвесь получали, центрифугируя цельную кровь при 3000 g в течение 3 минут. Затем трижды промывали эритроциты физиологическим раствором и снова центрифугировали. Из отмытых эритроцитов готовили гемолизат, используя специальные методы для каждой методики. В гемолизате эритроцитов определяли показатели антиоксидантной защиты, в частности супероксиддисмутазу (СОД), защищающую клетки от повреждения супероксидными радикалами [35], а также глутатионпероксидазу (ГП), глутатионредуктазу (ГР) [93]. Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали путем определения концентраций восстановленного глутатиона (ВГ) [84], а также малонового диальдегида (МДА) как стабильного конечного продукта ПОЛ [152]. Исследование проводилось на биохимическом анализаторе «А-25» (BioSystems Испания).

2.13 Определение количества TUNEL-позитивных клеток

Для изучения количества TUNEL-позитивных клеток в височной коре крыс образцы фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин. Стандартные срезы толщиной 5-6 мкм сделаны на ротационном полуавтоматическом микротоме RWD Minux S700 и помещены на предметные стёкла производства фирмы BioVitrum размером 26×76×1 мм, с адгезивным покрытием PCI, со шлифованной кромкой, с колорированным белым краем в количестве 10 штук на стекло для последующей окраски методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Для выполнения исследований применялся «Набор для изучения апоптоза TUNEL In Situ (Green, FITC), One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit» (Elabscience® E-CK-A320). Окрашенные препараты накрывали покровным стеклом размером 24x50 мм производства BioVitrum с монтирующей средой Mowiol. Изображения срезов головного мозга были получены с помощью

микроскопа Nikon Eclipse 80i с цветной камерой Nikon DS-Fi1c при увеличении $\times 100$ для анализа и $\times 200$ для фотоматериалов в разрешении 1280×960 пикселей программой NIS-Elements AR 4.20.00. Для последующей работы с изображениями использовалась программа VideoTest Software. Подсчёт апоптотических TUNEL+-клеток проводился на 4-5 срезах височной коры головного мозга каждого животного, и далее рассчитывали среднее количество на группу.

2.14 Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка результатов исследования была проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0. Этот процесс включал в себя несколько этапов: определение размера выборки, определение типа данных, анализ распределения количественных данных, представление данных и выбор методов анализа.

Для сравнения нескольких независимых выборок, представленных количественными переменными, был применён непараметрический ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA). Результаты были представлены двумя типами данных: количественными (данные исследования) и качественными (доля животных с отклонениями изучаемых признаков).

Помимо медианы (Me), в работе приведены минимальное (Min) и максимальное (Max) значения, либо квартили (LQ, UQ), а также численность выборки (N). Для дополнительного выявления различий между отдельными группами применялся апостериорный метод «Сравнение средних рангов для всех групп» (непараметрический Dunn test).

Для представления данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, не приводилось среднее арифметическое значение (M) и стандартное отклонение (SD). Качественные данные были представлены в виде абсолютной частоты (n), а также указывалась численность выборки (N).

Полученное значение p -уровня для подтверждения нулевой гипотезы должно было быть больше 0,05. Если $p \leq 0,05$, нулевую гипотезу отклоняли, а при $p > 0,05$ – принимали.

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФЕНИЛКАРБАМАТОМ

3.1 Определение острой токсичности Фенилкарбамата

Для разработки экспериментальной модели прежде всего необходимо было оценить острую токсичность нового модельного соединения Фенилкарбамата (гидрохлорид замещенного 2[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбамата, $C_7H_7O_2N$) при различных путях поступления в организм.

Эксперименты проводили на белых нелинейных крысах массой 180-220 г (4 группы животных по 3 особи в каждой). Фенилкарбамат вводили однократно, внутрибрюшинно (в/б). Индивидуальный объем вводимой дозы (объем) для каждого животного рассчитывался исходя из значения массы тела.

Определение проводилось при помощи табличного экспресс-метода по В.Б. Прозоровскому [49]. В соответствии с таблицами выбирали значения 4-х соседних доз.

Определение среднесмертельной дозы (LD_{50}) Фенилкарбамата было проведено при двух путях введения вещества: внутрибрюшинном и внутривентрикулярном. Для оценки токсических эффектов Фенилкарбамата (LD_{50} и способность вызывать гибель животных) при однократном введении, с учетом того, что по данным литературы проявления токсического действия карбаматов выявляются быстро и некоторые представители группы обладают высокой токсичностью [9], были выбраны 4 последовательные дозы:

- при внутривентрикулярном введении: 8.0, 10.0, 12.6, 15.8 мг/кг;
- при внутрибрюшинном введении: 1.0, 1.26, 1.58, 2.0, мг/кг.

Результаты скринингового исследования по определению количественных характеристик острой токсичности Фенилкарбамата представлены в таблицах 10-11.

Таблица 10 – Результаты оценки острой токсичности (гибели) при внутрибрюшинном введении Фенилкарбамата белым нелинейным крысам-самцам

Экспериментальная группа	Выбранные (натуральные) значения доз (мг/кг)				Последовательность реакций
	1,0	1,26	1,58	2,0	
Фенилкарбамат	Количество погибших животных (пало/общее число животных в группе)				0,1,2,3
	0/3	1/3	2/3	3/3	

При внутрибрюшинном введении Фенилкарбамата установленное распределение гибели животных позволяет определить величину $ЛД_{50} = 1,43 \pm 0,12$ мг/кг.

Таблица 11 – Результаты оценки острой токсичности (гибели) при внутривентрикулярном введении Фенилкарбамата белым нелинейным крысам-самцам

Экспериментальная группа	Выбранные (натуральные) значения доз (мг/кг)				Последовательность реакций
	8,0	10,0	12,6	15,8	
Фенилкарбамат	Количество погибших животных (пало/общее число животных в группе)				0,1,2,3
	0/3	1/3	2/3	3/3	

При внутривентрикулярном введении Фенилкарбамата установленное распределение гибели животных позволяет определить величину $ЛД_{50} = 10,0 \pm 0,77$ мг/кг.

На основании полученных данных при внутривентрикулярном введении можно сделать вывод, что Фенилкарбамат может быть отнесен ко 2 классу опасности (высокотоксичные) химической продукции в соответствии с ГОСТ 32419-2022 Классификация опасности химической продукции. Общие требования, введен с 01.01.2023; 5 классов опасности, $ЛД_{50}$ в пределах 5-50 мг/кг.

По классификации И.В. Березовской [4] на основании полученных данных ФК относится ко 2 классу токсичности (высокотоксичные – $ЛД_{50}$ 0,3-10 мг/кг при внутрибрюшинном введении).

Поскольку при разработке экспериментальных моделей для скрининга линеек новых фармацевтических субстанций важны такие характеристики как воспроизводимость, простота реализации и минимизация субъективных различий

(за счет индивидуальных особенностей функции ЖКТ животного и пр.), наиболее перспективным признано внутрибрюшинное (в/б) введение.

3.2 Сравнительная оценка характера судорог при введении различных конвульсантов

Для оценки поведенческих, нейрофизиологических и вегетативных функций у крыс, подвергшихся токсическому действию Фенилкарбамата, судорожный агент вводили внутрибрюшинно однократно, в установленной минимальной судорожной дозе. Для оценки эффективности модели ее ключевые параметры сравнивались с эффектами, возникающими при введении известных модельных токсикантов: коразола (в/б) и тиосемикарбазида (подкожно) в минимальной судорожной дозе.

При разработке экспериментальной модели животным вводили две дозы (субсудорожная и судорожная), выбранные на основе предварительной серии экспериментов по подбору дозировок и данных, полученных при исследовании острой токсичности. В предварительном эксперименте по подбору доз Фенилкарбамата были взяты 4 дозы: 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг. В каждой группе было по 8 особей нелинейных крыс. Фенилкарбамат вводили внутрибрюшино.

В таблице 12 приведены данные о доле погибших крыс при введении доз, вызывавших судороги.

Таблица 12 – Влияние введения Фенилкарбамата в исследуемых дозах на смертность крыс

Группа	Доля погибших крыс (n/N) во временных промежутках											
	0 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин	70 мин	80 мин	90 мин	100 мин
ФК, 3 мг/кг	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8*	0/4	2/4	1/2	1/1	–	–	–
ФК, 1 мг/кг	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
ФК, 0,5 мг/кг	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
ФК, 0,1 мг/кг	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Примечание – * – Различия статистически значимы в сравнении с группой Фенилкарбамат, 1 мг/кг ($p \leq 0,05$)												

Анализ данных таблицы показал, что в группе ФК 3 мг/кг наблюдалась 100% летальность через час наблюдений, в группе ФК 1 мг/кг в промежутке

40-50 минут была 1 гибель, в остальных группах с более низкими дозами летальность отсутствовала.

Была проведена оценка влияния Фенилкарбамата на выраженность судорог в разных дозах. В качестве показателя степени выраженности судорог использовали балльную оценку по модифицированной шкале Racine. Судороги 3 или 4 уровня и выше, эквивалентные генерализованным клонико-тоническим судорогам у человека, относились к категории выраженных.

Оценка выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine любой степени выраженности (от 0 до 6 баллов) проводилась на протяжении 90 минутного наблюдения в точках 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 минут. На рисунке 12 представлена динамика средних значений балльной оценки после введения Фенилкарбамата в 4-х дозах, которая иллюстрирует целесообразность использования дополнительных показателей для интегральной оценки их эффективности с учетом динамичности и неравномерности процесса судорожного синдрома, оцениваемого в баллах.

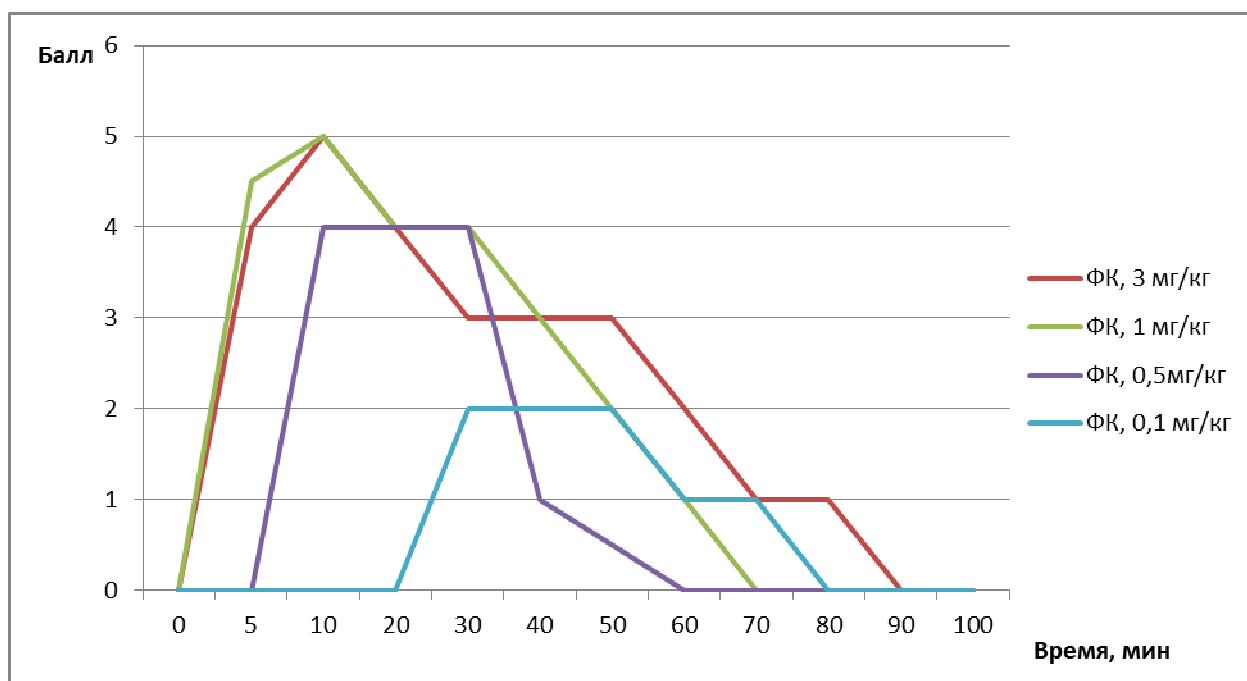


Рисунок 12 – Обобщенные по медиане графики зависимости выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine (баллы) от времени после введения Фенилкарбамата самцам крыс

С целью интегральной оценки динамики изменения выраженности судорог для каждого животного в представленных временных точках рассчитывали взвешенную по времени сумму баллов интенсивности судорог (ВВСБ), которая представляла собой площадь под кривой «судороги в балл-время» (из расчетов были исключены погибшие особи, в частности вся группа Фенилкарбамат, 3 мг/кг).

Результаты сравнительной оценки переменной площади под кривой «судороги в балл-время» (таблица 13) с применением Kruskal-Wallis ANOVA не показали наличие статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами.

Таблица 13 – Сравнительная оценка площади под кривой «судороги в балл-время», баллы/мин, у самцов крыс после введения Фенилкарбамата в исследуемых дозах

Группа	Значения переменной				p ¹
	N	Me	LQ	UQ	
ФК, 1 мг/кг	7	211,1	207,5	192,5	0,002*
ФК, 0,5 мг/кг	8	138,4	118,8	95,0	
ФК, 0,1 мг/кг	8	78,8	80,0	70,0	
Примечания 1 ¹ – p-значение межгрупповых различий 2 * – Различия статистически значимы (p<0.05)					

Поскольку анализ результатов выявил статистически значимые различия, дополнительно было проведено попарное сравнение для выявления различий между отдельными группами (таблица 14).

Таблица 14 – Квадратичная матрица апостериорных сравнений (p-значения) ВВСБ самцов крыс после введения Фенилкарбамата с использованием Dunn test

Группа	ФК, 1 мг/кг	ФК, 0,5 мг/кг	ФК, 0,1 мг/кг
ФК, 1 мг/кг	–	0,252	0,001*
ФК, 0,5 мг/кг	0,252	–	0,159
ФК, 0,1 мг/кг	0,001*	0,159	–
Примечание –* – Различия для группы в строке статистически значимы по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце (p<0,05)			

Анализ данных таблицы 14 выявил статистически значимые различия между группами ФК, 1мг/кг и ФК, 0,1 мг/кг (p=0,000) – уровень медианного значения ВВСБ в группе ФК, 0,1 мг/кг был ниже на 63% ниже в сравнении с группой ФК, 1 мг/кг. Между группами ФК, 1 мг/кг и ФК, 0,5 мг/кг статистически

значимых различий зарегистрировано не было, однако медианное значение площади под кривой «судороги в балл-время» в группе ФК 0,5 мг/кг было на 34% ниже результатов по ФК 1 мг/кг. В свою очередь, результаты по ФК 0,1 мг/кг были ниже на 43% при сопоставлении с ФК 0,5 мг/кг.

В результате проведенного исследования была выбрана судорожная доза ФК – 1 мг/кг (с минимальным процентом гибели), а также субсудорожная доза ФК – 0,1 мг/кг (не вызывает гибели, проявляется невыраженный судорожный синдром).

Поскольку модель разрабатывается прежде всего для скрининга специфической активности (эффективности) новых соединений, в качестве способа введения был выбран не самый распространенный при интоксикациях у человека (пероральный), а внутрибрюшинный, как наиболее легко воспроизводимый в эксперименте и в меньшей степени зависящий от индивидуальных особенностей функции желудочно-кишечного тракта у животных (что особенно важно для соблюдения биоэтических норм, требующих использовать по-возможности меньшее количество животных в доклинических исследованиях).

При проведении эксперимента с вышеописанным дизайном и методическими подходами, клиническая картина интоксикации для ингибитора холинэстеразы Фенилкарбамата была следующая: через 2-5 минут после введения у животных наблюдалось снижение двигательной активности, пилоэрекция, саливация и лакримация, появлялись жевательные движения, а также подергивания усов и ушей. Далее начинал развиваться судорожный синдром, который выражался в появлении вздрагиваний, синдрома Штрауба и генерализованном треморе, крысы при этом находились в вытянутом лежащем положении. Через 5-15 минут у крыс начали наблюдаться клонические судороги и эпизоды клонико-тонических судорог. У некоторых животных наблюдалась хромодакриорея, а также хрипы в легких. Все судорожные проявления полностью прекращались через 2 часа после введения токсиканта. Частота возникновения вышеупомянутых изменений представлена в таблице 15.

При изучении токсикантов групп сравнения, ведение субсудорожной дозы Коразола не влияло на поведение животных, отсутствовали клинические проявления интоксикации. Введение судорожной дозы Коразола приводило через 8 минут (в среднем) к возникновению вздрагиваний, переходящих в клонические и клонико-тонические судороги. Тонических судорог и экстензий задних конечностей не наблюдалось. Через 2 часа после введения токсиканта судороги прекращались, поведение всех животных полностью нормализовалось.

Введение субсудорожной дозы Тиосемикарбазида способствовало лишь тенденции к снижению поведенческой и двигательной активности. В среднем, латентный период составлял около 106 минут. Клонические и тонические судороги, экстензии задних конечностей фиксировались у всех животных данной группы. На протяжении 8 часов после введения токсиканта наблюдалось повторение судорожных пароксизмов.

Ввиду того, что интенсивность судорожного синдрома 4-6 уровня по модернизированной шкале Racine [134] аналогична проявлениям генерализованного судорожного синдрома у человека [60, 85], судорожной дозой считалась наименьшая из приводящих к развитию судорожного синдрома соответствующего уровня у большинства крыс на фоне наименьшей летальности. Временной промежуток от момента наступления признаков судорожного синдрома 4 уровня и до окончания судорог (0 уровень) оценивался как продолжительность судорог. Летальность оценивали как долю погибших животных в группе (в%) при наблюдении в течение 24 часов после введения.

Таблица 15 – Сравнительная оценка типа судорог при введении судорожных агентов в судорожной и субсудорожных дозах

Судорожный агент	Доза, мг/кг	Латентный период проявления судорог (мин)	Тип судорог				Летальность (в %)
			Жевательные движения и подёргивания головой (в %)	Клонические (в %)	Тонические (в %).	Экстензии, (в %)	
Фенилкарбамат	0.1 мг/кг (n=10)	9,00±0,79	100	0	0	0	0
	1 мг/кг (n=8)	6,35±0,33	100	100	25	0	12,5
Коразол	40 мг/кг (n=10)	0	0	0	0	0	0
	65 мг/кг (n=9)	8,11±0,63	0	100	22	11	11
Тиосемикарбазид	5 мг/кг (n=8)	0	0	0	0	0	0
	8 мг/кг (n=12)	106,8±7,34	0	100	100	100	33,3

Количественные показатели выраженности судорожного синдрома при введении судорожных агентов (% от общего количества особей в группе животных) представлены в таблице 16. Для каждого животного определялись максимальные уровни развития судорог. Показатели латентного периода наступления различных уровней судорожной активности приведены в таблице 17.

Таблица 16 – Оценка судорожного действия конвульсантов по шкале Racine

Судорожный агент	Доза, мг/кг	Уровни интенсивности судорожного синдрома, % от количества животных							Летальность
		0	1	2	3	4	5	6	
Фенилкарбамат (n=102)	1 мг/кг	0%	100%	0%	2,0%	7,8%	64,7%	25,5%	12,7% (let – 13)
Коразол (n=71)	65 мг/кг	0%	0%	1,4%	2,8%	19,7%	11,3%	60,6%	20% (let – 14)
Тиосемикарбазид (n=105)	8 мг/кг	0%	3,6%	1,2%	4,8%	9,6%	10,8%	65,1%	23,8% (let – 25)

Продemonстрировано, что, при введении Фенилкарбамата, у подавляющего большинства крыс (64,7%) степень выраженности судорожного синдрома не превышала 5-й уровень по шкале Racine, однако именно в этой группе гибель животных была максимальной (9 из 13 животных).

Таблица 17 – Оценка латентного периода наступления судорог в соответствии со шкалой Racine (минуты, средние по группе, $M \pm m$)

Судорожный агент	Доза, мг/кг	Уровни интенсивности судорожного синдрома						
		0	1	2	3	4	5	6
Фенилкарбамат (n=102)	1 мг/кг	0±0	0±0	6±0,4	5±0,3	7±0,4	10±0,6	13±1,5
Коразол (n=71)	65 мг/кг	0±0	4±0,3	10±1,2	10±1,3	11±1,3	11±1,9	12±1,0
Тиосемикарбазид (n=105)	8 мг/кг	0±0	83±1,1	92±2,3	107±9,5	128±6,7	129±9,0	150±7,1

Более выраженные клонические или тонические судороги (6-й уровень по шкале Racine) фиксировались только у 25,5% животных. Генерализованный тремор наблюдался в группах с 4 по 6 уровня судорог по шкале Racine. Проявления судорог заканчивались через 2 часа. Данные результаты подтверждают выраженное влияние Фенилкарбамата как токсиканта из группы

обратимых ингибиторов холинэстераз на центральную и периферическую нервную систему.

Большинство крыс, получавших Коразол, достигало максимально выраженного судорожного синдрома: у 60,6% животных наблюдались интенсивные тонические судороги и экстензии. Время наступления наиболее тяжелых симптомов судорожной активности (уровни 2-6) в среднем составило около 11 минут после введения. Такой малый латентный период связан с механизмом действия коразола, который заключается в блокаде хлоридного канала ГАМК_A-рецептора в головном мозге [18]. Гибель животных наблюдалась только при наличии максимальных проявлений судорожной активности (6 уровень), зачастую после интенсивной экстензии. Полное завершение судорожного синдрома наступило через 1,5 часа после того как был введен коразол.

При введении Тиосемикарбазида у 65% животных наблюдались судороги 6 уровня, латентный период возникновения судорог составлял около 83 минут. У всех животных отмечалось последовательное усиление симптоматики: через 92 минуты развивались кивательные движения головой, через 107 минут отмечался клонус передних лап без роющих движений, через 128 минут фиксировались роющие движения, через 129 минут животные принимали лежачее положение, через 150 минут наблюдались интенсивные тонические судороги без экстензий и активные перемещения животных по клетке (манежный бег). В целом, выраженные изменения поведенческой активности наблюдались у 85,5% крыс. На протяжении 8 часов после введения проявлялись повторные судороги на фоне снижения двигательной активности. Столь длительная продолжительность наблюдаемых изменений очевидно взаимосвязана с механизмом действия тиосемикарбазида, способствующего ингибированию синтеза ГАМК в ЦНС. Наибольшее количество погибших животных (16 из 18) наблюдалось на максимальном уровне интенсивности судорожного синдрома.

В целом, при введении судорожной дозы Фенилкарбамата судороги развивались в 100% случаев, как и в группах сравнения. Латентный период был

сопоставим с коразоловой моделью. Летальность, в отличие от модели с применением коразола наблюдалась, но была меньше, чем при введении тиосемикарбазида. Уровень интенсивности судорожного синдрома в баллах по шкале Racine был, преимущественно, в районе 5 (при введении других конвульсантов – около 6), однако и 5 уровень соответствует генерализованному судорожному синдрому у человека. К преимуществам данной модели можно отнести то, что, в отличие от Коразола и Тиосемикарбазида, при введении Фенилкарбамата у 100% животных наблюдались судороги не менее 3-его уровня. Длительность судорожного синдрома в Фенилкарбаматной и коразоловой моделях были сопоставимы и уступали показателям модели на основе тиосемикарбазида. Однако, чем длительнее судорожный синдром в экспериментальном моделировании, тем сложнее становится процесс наблюдений и оценке специфической активности противосудорожных лекарственных препаратов.

Таким образом, продемонстрировано, что применение Фенилкарбамата в качестве модельного токсиканта (в/б введение) позволяет воспроизводить развитие генерализованного судорожного синдрома у животных (крыс) в эксперименте. Основные характеристики судорожного синдрома (длительность, выраженность, летальность) вполне сопоставимы с широко применяемыми моделями на основе коразола и тиосемикарбазида, при этом позволяют оценить другой механизм действия, что перспективно для внедрения в экспериментальные и доклинические исследования специфической активности новых средств терапии судорожного синдрома и неврологических нарушений в отдаленной перспективе.

Основные характеристики новой экспериментальной модели острой интоксикации ингибитором холинэстераз:

- Вид экспериментальных животных: здоровые нелинейные белые крысы самцы с массой тела 200-240 г.
- Количество животных в группе: не менее 10.
- Токсикант для моделирования судорожного синдрома: обратимый ингибитор холинэстеразы Фенилкарбамат, применяемый в дозе 1 мг/кг.

- Контрольная группа: вода для инъекций или 0,9% раствор натрия хлорида.
- Способ введения вещества: внутривентрикулярный.

Фиксируемые параметры судорожного синдрома:

- латентный период наступления судорожного синдрома составляет до 10 минут;
- выраженность судорожного синдрома не ниже 4-5 уровня по модифицированной шкале оценки судорог Racine;
- длительность судорожного синдрома не менее 40 минут;
- гибель животных не должна превышать 30%.

Длительность наблюдений: до 2 часов.

3.3 Влияние на показатели поведения и двигательной активности

Очевидно, что целью терапии интоксикаций судорожными агентами является не только купирование судорожного синдрома как такового, но и минимизации прямого и опосредованного влияния токсиканта на все органы и системы, а также на общее самочувствие (в том числе на поведение и двигательную активность) и, что особенно важно при отравлении нейротоксикантами, на когнитивные функции.

Соответственно, в рамках изучения Фенилкарбамата как модельного токсиканта поведение и двигательная активность крыс оценивались через 24 часа после введения в дозах 1 мг/кг и 0,1 мг/кг. Группы сравнения получали Коразол (доза 65 мг/кг и 40 мг/кг) и Тиосемикарбазид (доза 5 и 8 мг/кг), контрольной группе вводили 0,9 % раствор натрия хлорида аналогичному пути введения токсиканта. Через 48 часов исследования проводились только в группах с судорожными дозами токсикантов. Результаты фиксировались с применением многоцелевой системы открытого поля для изучения поведенческих реакций мелких лабораторных животных (TSE, Германия). В таблицах 18 и 19 приведены результаты оценки параметров двигательной активности и поведения крыс после введения судорожных агентов.

Продемонстрировано, что при введении Фенилкарбамата не наблюдается статистически значимых различий изученных показателей с контролем через

24 часа, отмечена тенденция к повышению двигательной активности в группе, получившей 1 мг/кг Фенилкарбамата по сравнению с контролем.

Введение Коразола в дозе 65 мг/кг через 24 часа приводило к статистически достоверному повышению количества горизонтальных перемещений (в 4,5 раза по сравнению с контролем). При введении дозы 40 мг/кг через сутки также росло количество горизонтальных перемещений (в 3,3 раза). Помимо этого, при введении дозы 65 мг/кг зафиксировано повышение количества актов груминга (в 2 раза).

При введении Тиосемикарбазида в судорожной дозе (8 мг/кг) достоверно увеличивалось количество стоек, среднее расстояние и средняя скорость передвижения, двигательная активность на периферии.

Через 48 часов после введения Тиосемикарбазида сохранялось достоверное повышение двигательной активности в сравнении с контрольной группой, включая такие показатели как среднее расстояние, средняя скорость, горизонтальные перемещения, двигательная активность на периферии. По показателям исследовательской активности (вертикальные перемещения, движения в центре площадки) и эмоционального ответа в виде груминга не выявлено достоверных различий.

Через 48 часов после введения Коразола не наблюдалось выраженных изменений в двигательной, исследовательской, эмоциональной активности.

Через 48 часов после введения Фенилкарбамата в судорожной дозе 1 мг/кг зафиксировано достоверное подавление двигательной активности, включая снижение количества горизонтальных перемещений крыс, средней скорости, пройденного животными расстояния, активности на периферии. Снижалась и исследовательская активность – уменьшалось количество вертикальных стоек по сравнению с животными контрольной группы.

Таблица 18 –Параметры двигательной активности крыс в тесте «открытое поле» через 24 часа

Группа, доза	ОДА, акты	Горизонт. перемещение	Вертик. перемещение	Груминг	Сред. расстояние, м	Средняя скорость, см/мин	ДА в центре, акты	ДА на периферии, акты
Фенилкарбамат								
Контроль (n=10)	96,4±29,4	55,8±17,9	28,6±10,7	40,6±12,2	2,3±0,8	1,9±0,6	18,8±5,7	77,6±26,5
Субсудорожная (n=10)	121,7±9,6	72,7±8,3	28,3±3,8	49,0±2,4	2,9±0,4	2,4±0,3	13,8±4,9	107,8±6,0
Судорожная (n=8)	129,8±35,2	81,6±23,9	35,8±15,1	48,2±11,8	3,1±0,9	2,6±0,7	11,2±3,7	118,6±32,6
Коразол								
Контроль (n=10)	86,9±17,3	18,8±3,5	15,3±3,6	53,6±11,2	2,0±0,5	1,7±0,4	12,0±4,5	70,0±16,3
Субсудорожная (n=10)	180,4± 23,4**	59,6±4,4**	26,5±6,8	94,3±12,9	2,2±0,7	1,8±0,5	14,5±4,7	78,8±21,2
Судорожная (n=9)	208,6± 21,1**	80,8±3,6**	16,6±6,8	111,2±11,0**	1,6±0,6	1,3±0,5	8,0±4,4	62,6±18,5
Тиосемикарбазид								
Контроль (n=10)	140,7±34,8	16,7±4,1	12,8±3,6	51,8±11,7	1,7±0,5	1,4±0,4	8,7±4,3	67,3±17,1
Субсудорожная (n=10)	97,9±13,2	20,0±3,0	20,6±4,1	57,3±7,7	2,2±0,5	1,8±0,4	10,3±2,6	79,1±13,1
Судорожная (n=7)	169,9± 24,8*	31,6±4,6*	40,3±8,0**	97,4±12,7*	4,3±0,6**	3,6±0,5**	19,7±3,0	158,0± 23,9**
Примечания 1* – Тенденция к увеличению по сравнению с фоном (при $p \leq 0.05$) 2** – Достоверные отличия от фона (при $p \leq 0.01$)								

Таблица 19 – Влияние судорожных доз коразола, тиосемикарбазида и Фенилкарбамата на показатели двигательной активности белых крыс в тесте «открытое поле» через 48 часов (данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$))

№ п/п	Экспериментальная группа	Горизонт. перемещ.	Вертик. перемещ.	Груминг	Сред. расст.	Сред. скорость	ОДА	ДА в центре	ДА на периф.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Контроль (n=12)	31,08±5,10	22,92±3,02	19,58±3,60	1,72±0,31	1,42±0,25	54,00±7,84	7,83±1,93	46,17±6,47
2	Коразол, (n=9)	47,00±11,72	30,67±6,05	18,00±4,12	2,66±0,67	2,20±0,55	77,67±17,62	12,50±4,36	65,17±13,64
3	Контроль (n=12)	47.80±5.08	32.00±2.07	27.40±4.20	2.49±0.32	2.04±0.27	79.80±6.57	3.80±0.58	76.00±6.50
4	Тиосемикарбазид (n=7)	92.00±13.22 *	47.40±5.95	47.60±9.34	4.80±0.68*	3.97±0.58 *	139.40±18.9 0*	19.20±5.96	120.20±15.08*
5	Контроль (n=12)	74.00±9.73	42.33±3.99	44.67±8.04	4.23±0.58	3.50±0.47	116.33±13.4 2	14.17±4.06	102.17±9.75
6	Фенилкарбамат, (n=10)	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*
Примечание – * – Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$)									

В целом, не выявлено выраженного воздействия Фенилкарбамата как модельного токсиканта на результаты оценки когнитивных функций в тесте Открытое поле. При этом Коразол на 1 сутки после отравления и перенесенного судорожного синдрома приводит к ряду достоверных изменений. Однако, имеется тенденция к изменению поведения в сторону возбуждения, согласно своему механизму действия восстанавливать через 8-12 часов ацетилхолинэстеразу. Также Фенилкарбамат влияет на большую часть оцениваемых показателей через 48 часов в сторону угнетения, что может говорить о начинающихся органических повреждениях ЦНС и достаточно важно в плане перспективности использования новой модели для оценки отдаленных последствий, когда прямое действие токсиканта на организм уже прекращается.

3.4 Влияние субсудорожных и судорожных доз модельных токсикантов на когнитивные функции экспериментальных животных

Известно, что тест УРПИ позволяет оценить выраженность повреждающего воздействия токсикантов на различные этапы формирования следа памяти, включая процессы регистрации, фиксации (консолидации) и воспроизведения. Совокупность процессов, способствующая перемещению информации (условная связь, энграмма) из нестабильной кратковременной в долговременную стабильную память и рассматривается как консолидация следа памяти. Соответственно, воспроизведение следа памяти зависит от способности центральной нервной системы считывать эту информацию и от его связи с механизмом воспроизведения навыка. Как правило, нейротоксическое поражение ассоциировано с нарушениями взаимосвязи механизма воспроизведения со следом памяти.

Тестирование (проверка навыка обучения) проводили через 2 и 24 часа после первого обучения в группах судорожной (1 мг/кг) и субсудорожной (0,1 мг/кг) доз Фенилкарбамата, а также судорожной (65 мг/кг) и субсудорожной (40 мг/кг) доз Коразола, судорожной (8 мг/кг) и субсудорожной (5 мг/кг) доз

Тиосемикарбазида. Крысы контрольной группы получали 0,9% раствор хлорида натрия.

Реализовано 2 варианта оценки показателей УРПИ:

- обучение через 24 часа после введения токсикантов и прекращения судорожного синдрома;
- обучение проводилось за 24 часа до введения судорожных агентов с регистрацией сохранения УРПИ после проявления судорожного синдрома.

Оценка параметров условной реакции пассивного избегания болевого раздражителя (УРПИ) при действии исследуемых конвульсантов приведено в таблице 20.

В результате серии экспериментов установлено, что Тиосемикарбазид и Фенилкарбамат в указанных дозах не оказывали выраженного влияния на обучение животных, ни при введении до обучения, ни при введении после обучения. Коразол, введенный за 24 часа до обучения в обеих исследованных дозах, вызывал дозозависимое нарушение краткосрочной памяти по механизму влияния на процессы введения информации в головной мозг. Введение Коразола сразу после обучения не влияло на показатели УРПИ, что может быть показателем отсутствия его влияния на процессы консолидации памяти.

Таким образом, Фенилкарбамат как модельный токсикант вызывает генерализованный судорожный синдром, но не приводит к развитию нарушений когнитивной функции в ранние сроки наблюдений до 3 суток, по крайней мере в части, оцениваемой в тесте УРПИ, что, видимо, связано с особенностями воздействия данного судорожного агента на организм.

Таблица 20 – Влияние введения судорожных и субсудорожных доз судорожных агентов на выполнение УРПИ (данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$))

№	Судорожный агент	Доза	До обучения	Через 2 часа после обучения			Через 24 часа после обучения		
			Латентный период первого захода в темную камеру, сек	Латентный период первого захода в темную камеру, сек	Время пребывания в светлой камере, сек	Время пребывания в темной камере, сек	Латентный период первого захода в темную камеру, сек	Время пребывания в светлой камере, сек	Время пребывания в темной камере, сек
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Введение за 24 часа до обучения									
1	Коразол	Субсудорожная (n=10)	26.5±8.1	23.3±16.2*	55.8±10.2*	64.2±10.7*	28.7±19.0	41.5±19.5	78.5±19.5
		Судорожная (n=10)	18.8±6.9	26.0±13.0*	45.0±11.8*	75.0±11.8*	26.4±13.6	40.9±13.4	79.1±13.4
		Контроль (n=10)	34.6±9.4	79.0±18.9	95.6±18.9	24.4±14.3	34.6±21.6	71.4±18.2	48.6±18.2
Введение через 24 часа после обучения									
2	Коразол	Субсудорожная (n=10)	24.5±5.9	65.2±20.1	89.2±12.1*	30.8±12.1	56.5±21.8	75.5±20.9	44.5±20.9
		Судорожная (n=8)	15.5±3.9	39.5±27.0	80.3±14.3	39.7±14.3	33.3±12.1	57.5±12.3	62.5±12.3
		Контроль (n=10)	34.6±9.4	79.0±18.9	95.6±18.9	24.4±14.3	34.6±21.6	71.4±18.2	48.6±18.2
Введение за 24 часа до обучения									
3	Тиосеми-карбазид	Субсудорожная (n=10)	36,6±9,8	30,5±11,1	72,3±7,5	47,7±7,5	21,6±11,4	69,2±9,0	50,8±9,0
		Судорожная (n=10)	50,8±21,9	50,5±25,8	74,3±22,9	45,7±22,9	44,5±26,6	77,3±16,0	42,7±16,0
Введение через 24 часа после обучения									
4	Тиосеми-карбазид	Субсудорожная (n=10)	15,7±5,4	-	-	-	5,9±1,0	38,2±7,1	81,8±7,1

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Судорожная (n=8)	11,4±2,9	-	-	-	28,0±10,7	48,6±11,8	71,4±11,8
		Контроль (n=10)	24,7±4,6	-	-	-	32,5±11,5	67,4±8,9	52,6±8,9
Введение за 24 часа до обучения									
5	Фенил-карбамат	Субсудорожная (n=8)	25,0±6,2	72,5±18,4	72,5±18,4	47,5±18,4	82,3±18,2	87,5±15,8	32,5±15,8
		Судорожная (n=8)	17,3±2,9	61,6±18,0	66,3±17,1	53,7±17,1	64,3±18,8	70,0±16,8	50,0±16,8
		Контроль (n=8)	16,9±4,3	40,9±17,9	53,1±15,4	66,9±15,4	48,1±21,1	63,7±18,4	56,2±18,4
Введение через 24 часа после обучения									
6	Фенил-карбамат	Субсудорожная (n=8)	12,9±3,0	98,2±10,9	106,0±9,2	14,0±9,2	85,5±17,02	90,9±14,8	29,1±14,8
		Судорожная (n=8)	12,4±2,7	86,9±14,0	91,9±12,0	28,1±12,0	64,9±18,4	67,9±17,2	52,1±17,2
		Контроль (n=8)	16,9±4,3	40,9±17,9	53,1±15,4	66,9±15,4	48,1±21,1	63,7±18,4	56,2±18,4
Примечание – *– Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы (p<0,05)									

3.5 Влияние токсикантов судорожного действия на нейромоторные функции

Проведена оценка силы хвата через 24 часа после введения судорожной и субсудорожной доз Фенилкарбамата, а также Коразола и Тиосемикарбазида (таблица 21).

Таблица 21 – Оценка состояния силы хвата передними конечностями крыс после введения конвульсантов

№	Судорожные агенты	Сила хвата, ньютоны		
		Контроль	Субсудорожная доза	Судорожная доза
1	Фенилкарбамат	11,2±0,5 (n=10)	13,3±1,1 (n=10)	12,3±1,2 (n=8)
2	Коразол	9,7±3,3 (n=10)	13,2±4,4 (n=10)	11,8±3,9 (n=9)
3	Тиосемикарбазид	10,8±0,4 (n=10)	11,3±0,5 (n=10)	11,2±0,7 (n=7)

Статистически значимых различий между показателями силы хвата у групп, получавших судорожные и субсудорожные дозы исследуемых судорожных агентов, и контрольной группы не обнаружено.

3.6 Влияние Фенилкарбамата на функцию сердечно - сосудистой системы

Изменения общего самочувствия в значительной степени взаимосвязаны с функциональными или патологическими нарушениями в сердечно-сосудистой системе, возникающими как от прямого воздействия токсиканта, так и опосредовано. Для сравнительной оценки влияния Фенилкарбамата как модельного токсиканта с другими судорожными агентами, оценка параметров артериального давления (АД) (систолическое и диастолическое артериальное давление) проводилось через 24 часа после введения судорожной и субсудорожной доз (таблица 22). Установлено, что введение как судорожной, так субсудорожной доз изученных веществ не оказывало статистически значимых эффектов на показатели АД.

Состояние электрофизиологических показателей сердечно-сосудистой системы белых крыс (ЧСС, величина зубца R, интервалов PQ и QT) также оценивалось через 24 часа после введения судорожной и субсудорожной доз

(таблица 23). Статистически значимые отличия в сторону уменьшения от контрольных значений при введении Фенилкарбамата наблюдаются по показателю частоты сердечных сокращений. У группы животных, которым вводили коразол в судорожной дозе 65 мг/кг, через 24 часа не выявлено достоверных отличий ЧСС от контрольной группы, но отмечалась тенденция к уменьшению зубца R по сравнению с контролем. Данные в таблицах 22-25 представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Таблица 22 – Оценка показателей артериального давления

№	Судорожный агент	Доза	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.
1	Фенилкарбамат	Субсудорожная (n=10)	134,9±7,9	111,9±8,1
		Судорожная (n=8)	130,1±3,3	104,9±3,6
		Контроль (n=10)	135,0±3,0	115,4±2,3
2	Коразол	Субсудорожная (n=10)	132,0±3,3	108,6±2,5
		Судорожная (n=9)	122,3±5,5	117,0±14,2
		Контроль (n=10)	126,8±5,1	99,3±2,0
3	Тиосемикарбазид	Субсудорожная (n=10)	127,6±1,3	101,6±1,6
		Судорожная (n=7)	132,0±7,8	101,3±7,5
		Контроль (n=10)	126,8±5,1	99,3±2,0

Таблица 23 – Оценка показателей функционирования сердечно-сосудистой системы

№	Судорожный агент	Доза	ЧСС в мин	R, мВ	PQ, мВ	QT, мВ
1	Фенилкарбамат	Субсудорожная (n=10)	498,3±7,1	0,40±0,02	44,3±1,6	66,0±5,2
		Судорожная (n=8)	464,4±25,9*	0,47±0,06	43,4±1,1	69,3±5,1
		Контроль (n=10)	514,0±11,2	0,49±0,07	43,9±1,1	71,6±6,9
2	Коразол	Субсудорожная (n=10)	501,8±8,8	0,72±0,05	46,4±1,6	71,2±3,7
		Судорожная (n=9)	524,0±13,7	0,40±0,04*	48,6±2,6	68,3±2,8
		Контроль (n=10)	493,8±15,5	0,73±0,10	47,3±2,1	81,8±9,1
3	Тиосемикарбазид	Субсудорожная (n=10)	487,4±7,1	0,43±0,07	42,2±2,3	76,6±3,5
		Судорожная (n=7)	488,3±6,7	0,33±0,05	45,3±1,3	81,0±7,9
		Контроль (n=10)	493,8±15,5	0,73±0,10	47,3±2,1	81,8±9,1

Примечание – * – Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Оценка ритмограммы сердца с помощью кардиоинтервалографии (КИГ) по Баевскому на фоне судорожных и субсудорожных доз исследованных конвульсантов через 24 часа после введения приведена в таблице 24.

Таблица 24 – Изменения индексов напряженности у крыс после введения судорожных агентов по данным КИГ

№	Судорожный агент	Доза	Индексы напряженности, у.е.	
			Фон	24 часа
1	Фенилкарбамат	Субсудорожная (n=10)	35536,9±16401,0	32728,3±9553,1
		Судорожная (n=18)	47715,2±10714,0	13889,6±4623,0*
2	Коразол	Субсудорожная (n=10)	5415,3±1953,0	23775,3±7504,4*
		Судорожная (n=9)	30918,3±13051	30559,7±22517,6
3	Тиосемикарбазид	Субсудорожная (n=10)	36058,8±18827,9	29430,8±6928,1
		Судорожная (n=7)	14814,5±6278,8	7374316103,0**
Примечания: 1* – Тенденция к увеличению по сравнению с фоном (при p≤0.05) 2** – Достоверные отличия от фона (при p≤0.01)				

В результате проведения кардиоинтервалографии группы животных, получавшей судорожную дозу Фенилкарбамата, было показано наличие тенденции к уменьшению индексов напряженности через 24 часа после введения. Продemonстрировано, что через 24 часа сохранялась тенденция к увеличению КИГ у группы, получавшей субсудорожную дозу Коразола. У группы животных, получавших судорожную дозу Тиосемикарбазида, было отмечено статистически значимое увеличение индекса напряженности через 24 часа после введения. Изменения индекса напряжённости свидетельствуют о нарушениях центральной регуляции ритма сердца.

Помимо оценки частоты сердечных сокращений (ЧСС) и индекса напряженности (ИН), оценивались также мода (Мо или наиболее часто встречающееся значение кардиоинтервала), амплитуда моды (АМо) и показатель variability ритма (ВР) (таблица 25).

У животных, получавших судорожную дозу Фенилкарбамата, зафиксировано снижение ЧСС через 48 часов после судорог. У группы, получившей судорожную дозу коразола, через 48 часов наблюдалось снижение показателя variability ритма, что может указывать на нарушение регуляции сердечно сосудистой системы со стороны ЦНС.

Таблица 25 – Различия показателей функционирования ЧСС у контрольной и экспериментальных групп

№	Группа	ЧСС	Мо	АМо	ВР	ИН
24 часа						
1	Контроль	479,9±9,8	0,130±0,003	99,7±0,1	0,040±0,014	27,6±9,7
2	Фенилкарбамат	470,6±13,6	0,133±0,007	99,8±0,1	0,057±0,023	38,2±16,3
3	Коразол	458,8±23,0	0,133±0,007	100,0±0,0	0,016±0,006	11,7±5,1
4	Тиосемикарбазид	515±11,0	0,120±0,005	100,0±0,0	0,014±0,004	8,5±2,6
48 часов						
1	Контроль	484,5±8,7	0,128±0,003	99,1±0,6	0,051±0,016	32,4±11,1
2	Фенилкарбамат	403,0±18,8*	0,152±0,011	99,7±0,2	0,061±0,026	41,6±15,4
3	Коразол	472,3±23,8	0,127±0,006	96,8±3,2	0,021±0,015*	13,1±9,7
4	Тиосемикарбазид	482,6±21,0	0,113±0,009	100,0±0,0	0,018±0,007	12,6±5,2
Примечание – * – Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы (p<0,05)						

Однако в ходе дополнительного исследования параметров ЭКГ через 7 дней после введения судорожных агентов не было обнаружено статистически-значимых различий с контрольной группой, что свидетельствует о быстром восстановлении.

Таким образом, по выраженности влияния на показатели функции сердечно-сосудистой системы, модель на основе Фенилкарбамата сопоставима с общепризнанными моделями, используемыми для разработки противосудорожных средств, за исключением ЧСС, которая снижалась под воздействием Фенилкарбамата.

3.7 Оценка биохимических показателей периферической крови крыс после токсического судорожного синдрома

Помимо характеристик судорожного синдрома и влияния на поведенческие функции, особого внимания при разработке модели заслуживают показатели биохимического состава крови, характеризующие системные процессы, происходящие в организме под воздействием токсиканта с течением времени.

Установлено, что через 24 часа (таблица 26) после введения Фенилкарбамата, наблюдаются достоверные отличия от контроля по показателям: щелочная фосфатаза, триглицериды, холестерин, мочевины. Данные в таблицах 26 и 27 представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Таблица 26 – Влияние Фенилкарбамата на биохимические показатели крови

Исследуемые показатели	Период наблюдения	Контрольная группа n=24	ФК, 1 мг/кг n=24	Коразол, 65 мг/кг n=24	ТСК, 8 мг/кг n=24
1	2	3	4	5	6
Триглицериды, ммоль/л	24 ч	0,32±0,03	0,52±0,05*	0,45±0,06	0,62±0,04*
	48 ч	1,07±0,16	1,24±0,17	0,68±0,06*	0,96±0,08
	7 сут	1,43±0,26	0,87±0,08	1,12±0,10	1,32±0,20
	14 сут	0,83±0,07	1,09±0,14	1,32±0,13*	0,76±0,09
Альбумин, г/л	24 ч	27,9±0,8	27,8±1,2	26,4±0,9	28,6±1,4
	48 ч	27,8±0,6	25,4±2,4	27,8±0,9	28,7±0,9
	7 сут	29,4±0,8	26,2±1,0*	28,2±0,6	25,2±2,4
	14 сут	29,2±0,8	27,4±0,7	28,1±0,8	27,4±1,2
ЛДГ, Ед/л	24 ч	1001,3±114,9	916,4±112,6	870,8±89	754,6±32,3
	48 ч	909,2±78,6	894,2±55,2	792,4±52,5	867±62,4
	7 сут	894,4±61,2	816,1±83,3	1046,9±79,9	929,9±71,5
	14 сут	935,7±67,3	686,8±63,2*	759,4±81,3	783,7±67,4
АЛТ, ЕД/л	24 ч	52,8±2,2	56,4±5,4	56,4±2,3	62,5±5,4
	48 ч	60,7±3,1	62,1±2,7	65,0±4,4	58,4±2,7
	7 сут	71,4±2,5	69,2±3,9	79,4±7,1	70,8±4,1
	14 сут	55,5±3,2	43,6±2,1*	48,3±1,6	53,3±6,2
АСТ, ЕД/л	24 ч	132,8±7,6	156,6±12,7	146,0±5,1	146,5±7,7
	48 ч	143,5±8,3	153,4±5,2	150,7±7,9	155,2±7,4
	7 сут	169,7±7,9	160,9±12,2	169,1±10,9	170,9±10,7
	14 сут	140,3±7,4	142,7±6,7	125,7±6,9	150,3±14,4
ЩФ, ЕД/л	24 ч	215,8±12,5	179,6±11*	198,1±15,3	277,3±20,4*
	48 ч	292,0±22,8	328,1±15,9	256,2±25,4	258±29,3
	7 сут	302,7±27,9	269,7±23,2	305,3±34,3	343±25,8
	14 сут	210,4±18,7	306,5±24,7*	301,9±22*	295±46,1
Креатинкиназа, Ед/л	24 ч	3376±481,6	3250±642,3	4119±563,6	2400±262,7
	48 ч	4758±439,3	5536±475,5	4816±244,5	5287±556
	7 сут	1495±268,6	893,3±139,3	1310±336,9	1377±348,1
	14 сут	4098±402,7	4093±406,5	3074±303,8	4411±668
Холестерин, ммоль/л	24 ч	1,61±0,05	1,40±0,08*	1,22±0,08*	1,48±0,08
	48 ч	1,14±0,05	1,15±0,06	1,15±0,05	1,24±0,05
	7 сут	1,10±0,08	1,03±0,04	1,24±0,07	1,30±0,08
	14 сут	1,61±0,07	1,41±0,08*	1,30±0,07*	1,45±0,08
Билирубин общий, мкмоль/л	24 ч	10,2±0,4	12,0±1,0	12,1±1,3	14,1±1,5*
	48 ч	18,2±2,8	20,2±1,8	10,5±1,6*	17,6±1,3
	7 сут	13,8±2,8	14,4±2,3	19,6±2,1	17,9±2,0
	14 сут	12,2±1	17,6±1,8*	18,2±2,7*	14,3±1,3
Мочевина, ммоль/л	24 ч	4,4±0,2	3,6±0,3*	4,0±0,3	4,7±0,3
	48 ч	4,5±0,3	5,9±0,3*	4,7±0,6	4,2±0,1
	7 сут	5,2±0,5	5,4±0,2	5,4±0,2	6,4±0,4
	14 сут	4,2±0,2	5,6±0,3*	4,9±0,2*	3,9±0,3
Примечание – * – Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы (p<0,05)					

Через 48 часов отмечено увеличение показателя мочевины в сравнении с контрольной группой. Примерно через 7-14 суток имеют место статистически значимые различия по показателям: альбумин ($\downarrow$), лактатдегидрогениза ($\downarrow$), аланинтрансфераза ($\downarrow$), холестерин ($\downarrow$), щелочная фосфатаза ($\uparrow$), билирубин ($\uparrow$), мочевина ($\uparrow$). Сниженное содержание альбумина после воздействия Фенилкарбамата может свидетельствовать о развитии воспаления или как минимум о нарушении белоксинтетической функции печени.

Ряд принципиальных отличий эффектов Фенилкарбамата от изменений, получаемых под воздействием тиосемикарбазида и коразола, подтверждает актуальность разработки новых моделей, а также необходимость тестировать средства терапии судорожного синдрома и отдаленных последствий отравлений нейротоксикантами с использованием моделей, воспроизводящих действие различных групп токсикантов, помимо традиционно применяемых при разработке противоэпилептических средств.

При оценке ионного состава крови (таблица 27), характеризующего, помимо прочего, функцию почек, установлено, что изменения, вызываемые Фенилкарбаматом в первые сутки ближе по эффектам к воздействию Тиосемикарбазида, отмечается снижение концентрации ионов натрия и магния в первые 24 ч после отравления, что может свидетельствовать об избыточной затрате ионов в момент судорожного синдрома.

Таблица 27 – Влияние изучаемых судорожных токсикантов на ионный состав крови животных в различные временные периоды судорожного синдрома

Изучаемые показатели	Период наблюдения	Контрольная группа n=24	ФК, 1 мг/кг n=24	Коразол, 65 мг/кг n=24	ТСК, 8 мг/кг n=24
1	2	3	4	5	6
K ⁺ , (ммоль/л)	24 ч	4,7 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1
	48 ч	4,6 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1
	7 суток	4,2 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1
	14 суток	5,2 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,2
Na ⁺ , (ммоль/л)	24 ч	160 $\pm$ 0,9	155,4 $\pm$ 1,2*	153,6 $\pm$ 1,5*	157,6 $\pm$ 1,4
	48 ч	155,3 $\pm$ 1,3	159,0 $\pm$ 1,0*	157,7 $\pm$ 1,7	158,6 $\pm$ 1,2
	7 суток	162,1 $\pm$ 1,3	162,7 $\pm$ 1,2	161,1 $\pm$ 1,5	163,5 $\pm$ 1,0
	14 суток	145,2 $\pm$ 1,6	142,9 $\pm$ 1,9	142,9 $\pm$ 1,9	143 $\pm$ 1,7

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6
СТ, (ммоль/л)	24 ч	96,6±1,5	99,2±1,1	95,1±1,1	99±1,6
	48 ч	96,9±1,0	99,2±1,2	94,8±1,7	96,6±0,7
	7 суток	93,6±1,5	94,4±1,1	92,6±1,6	92,9±1,2
	14 суток	93,8±0,7	96,5±1,1*	92,5±1,4	92,3±1,7
Фосфор (P), ммоль/л	24 ч	2,89±0,07	2,85±0,08	2,82±0,08	2,64±0,07*
	48 ч	2,65±0,05	2,94±0,06*	2,69±0,10	2,49±0,03*
	7 суток	2,14±0,07	2,29±0,07	2,12±0,05	2,14±0,06
	14 суток	2,85±0,08	2,63±0,04*	2,68±0,06	2,65±0,11
Магний (Mg), ммоль/л	24 ч	1,37±0,25	0,27±0,02*	0,35±0,07*	0,94±0,01
	48 ч	1,23±0,19	0,90±0,02	0,89±0,02	0,96±0,02
	7 суток	1,27±0,19	0,90±0,02	0,88±0,03	1,19±0,18
Магний (Mg), ммоль/л	14 суток	0,56±0,03	0,67±0,02*	0,63±0,02	0,57±0,05
Примечание – * – Доверительная вероятность различий относительно контрольной группы (p<0,05)					

В целом, выявленные изменения активности ферментов печени, холестерина и триглицеридов через 14 дней после воздействия Фенилкарбамата, свидетельствуют о нарушении функций печени.

Повышение концентрации мочевины в крови может быть связано как с нарушениями функции печени, так и с повреждением мышечных тканей, кроме того, в процессе массивного распада белка, сопровождающегося гипераммониемией, токсичный аммиак может стать причиной развития ряда неврологических нарушений.

При воздействии Фенилкарбамата, помимо дефицита магния, меняется частота сердечных сокращений, что позволяет предположить отдельный вклад данных изменений в судорожную активность, независимо от взаимодействия с АХЭ, учитывая, что гипомагниемия часто ассоциирована с гипервозбудимостью миокарда, тремором, фасцикуляциями.

Полученные данные подтверждают теорию о том, что, помимо прямого ингибирующего эффекта на холинэстеразы, приводящего к развитию холинергического кризиса, интоксикация обратимыми ингибиторами холинэстераз приводит к обменным нарушениям, поражению многих органов и систем, помимо ЦНС. Это подтверждает необходимость всестороннего изучения эффективности разрабатываемых средств лечения, не только с точки зрения

купирования судорожного синдрома в период острой интоксикации, но и с точки зрения возможной профилактики осложнений.

Обращает на себя внимание, что через некоторое время после периода острой интоксикации большая часть изученных показателей приходит в норму, однако после воздействия Фенилкарбамата остается измененным содержание мочевины, после Коразола – билирубина, триглицеридов и фосфора, а после Тиосемикарбазида – натрия и фосфора, что лишний раз подчеркивает, что, несмотря на сходство многих параметров судорожного синдрома, характер дальнейшего действия токсиканта на организм может заметно различаться, что необходимо учитывать при подборе адекватной модели для оценки специфической активности лекарственных средств.

3.8 Изучение показателей про/антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов в крови крыс после токсического судорожного синдрома

Состояние компонентов про/антиоксидантной системы крови, а также одного из показателей перекисного окисления липидов в разные временные периоды (24, 48 часов, 7 и 14 суток) после воздействия Фенилкарбамата, включая восстановленный глутатион (ВГ), малоновый диальдегид (МДА), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП). Забор крови проводился у животных, которые были распределены на 4 группы (в разные промежутки времени) по 6 особей в каждой, контрольной группе вводили 0,9 % натрия хлорид.

Таблица 28 – Влияние Фенилкарбамата на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в крови лабораторных животных (средние по группе, $M \pm m$)

Экспериментальные группы	Период	Изучаемые показатели			
		ВГ, U/gP	МДА, U/gP	СОД, U/gP	ГП, U/gP
1	2	3	4	5	6
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

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6
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*
Примечание – * – Отличия между группами по критерию дисперсионного анализа ANOVA по отношению к контрольным животным					

В результате исследования было выявлено (таблица 28), что в первые сутки после отравления Фенилкарбаматом у животных происходят значительные изменения трёх из четырёх изученных показателей. В частности, активность малонового диальдегида сначала снижается, но затем, к 14 дню наблюдений, превышает контрольные значения. В то же время глутатионпероксидаза демонстрирует противоположные изменения. Кроме того, наблюдается увеличение образования конечных продуктов ПОЛ (концентрация МДА в плазме растёт) к 14 суткам по сравнению с контрольными значениями.

3.9 Патоморфологическая характеристика ЦНС у крыс после интоксикации Фенилкарбаматом

При тестировании эффективности средств купирования судорожного синдрома и средств профилактики отдаленных последствий при поражении нейротоксикантами, обязательным компонентом экспериментальной модели является оценка органических повреждений тканей ЦНС.

Проведено гистологическое исследование образцов тканей головного мозга у животных, получивших фенилкарбамат в судорожной и субсудорожной дозах. Отбор материала проведен через 24, 72, 96 и 120 часов.

Контроль: Значимых изменений в структурах головного мозга в контроле не отмечено. Большинство нейронов коры (рисунок 13) гиппокампа (рисунок 14), ствола (рисунок 15) и мозжечка (рисунок 16) имели типичное строение. В белом веществе волокна достаточно прилежат друг к другу, количество клеток глии в пределах нормы.

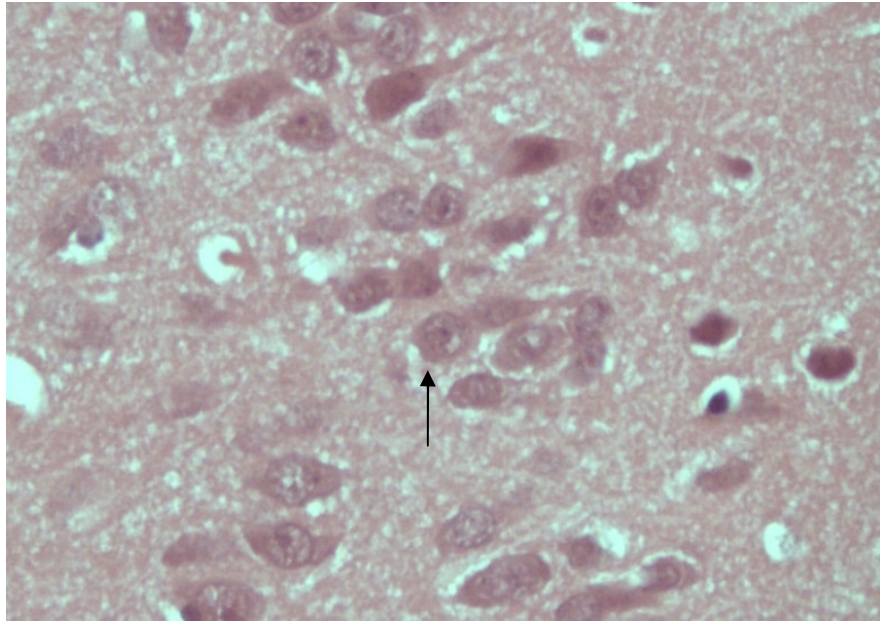


Рисунок 13 – Контроль. Кора лобной доли головного мозга. Большинство нейронов имеет типичное строение, светлое ядро и хорошо выраженное ядрышко. Граница между ядром и цитоплазмой четкая. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400.

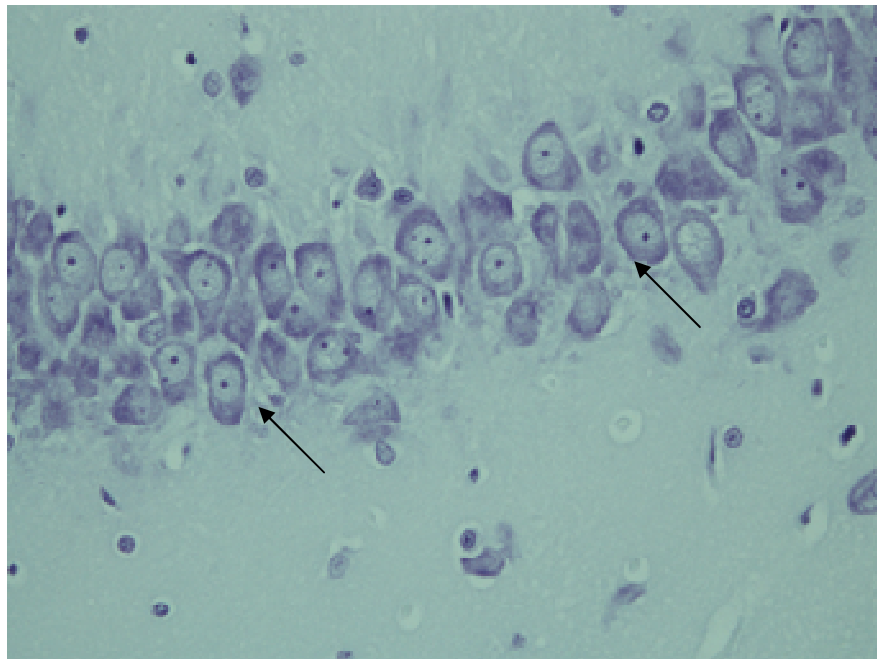


Рисунок 14 – Контроль. Гиппокамп. Нейроны коры со светлым ядром и одним двумя хорошо выраженными ядрышками. Окраска по методу Ниссля Ув. 400

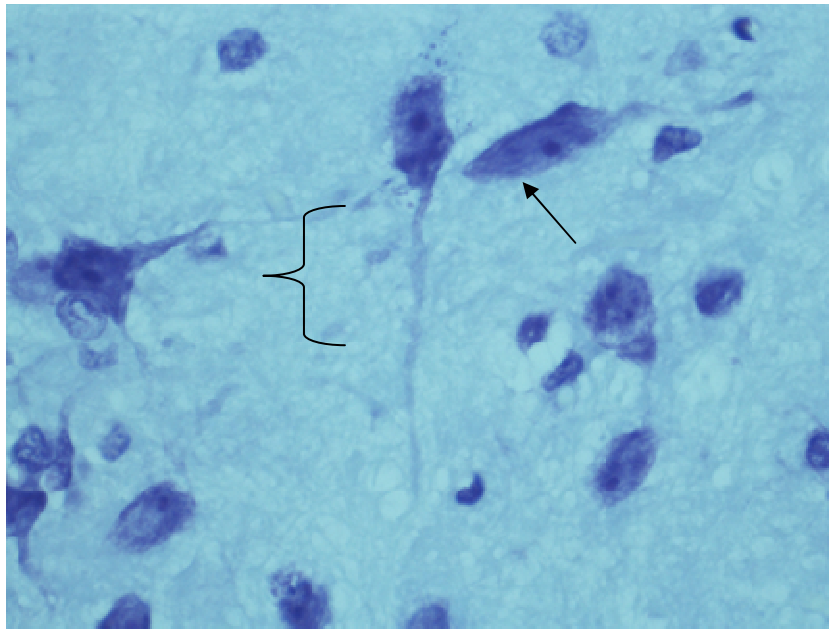


Рисунок 15 – Контроль. Ствол головного мозга. Нейрон и ядра типичного строения. Волокна нейропиля плотно упакованы.
Окраска по методу Ниссля Ув. 400

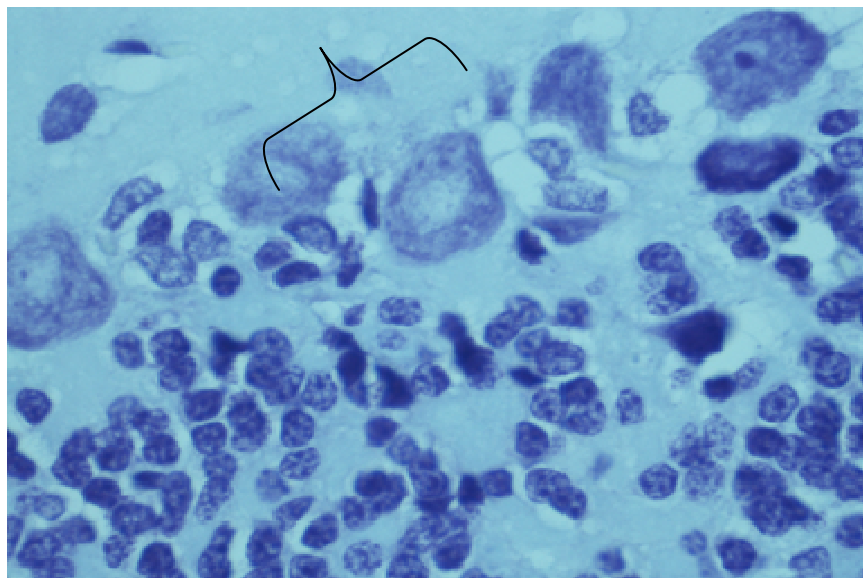


Рисунок 16 – Контроль. Мозжечок. Кетки Пуркинью типичного строения, без очаговых выпадений. В зернистом слое клетки плотно прилежат друг к другу.
Окраска по методу Ниссля Ув. 400

Субсудорожная доза Фенилкарбамата. Большинство нейронов коры изменены: цитоплазма гомогенная, вещество Ниссля не определяется, ядро и ядрышко не визуализируются (рисунок 17). В белом веществе наблюдалось значительное разрежение нейропиля (рисунок 18). Часть нейронов гиппокампа

имели типичное строение, а часть были изменены так же, как и нейроны коры (рисунок 19). Нейроны ствола не изменены, но в некоторых пучках значительно разрежен неропиль (рисунок 20), в стволе наблюдается отёк аксоплазмы в продольно проходящих пучках (рисунок 21).

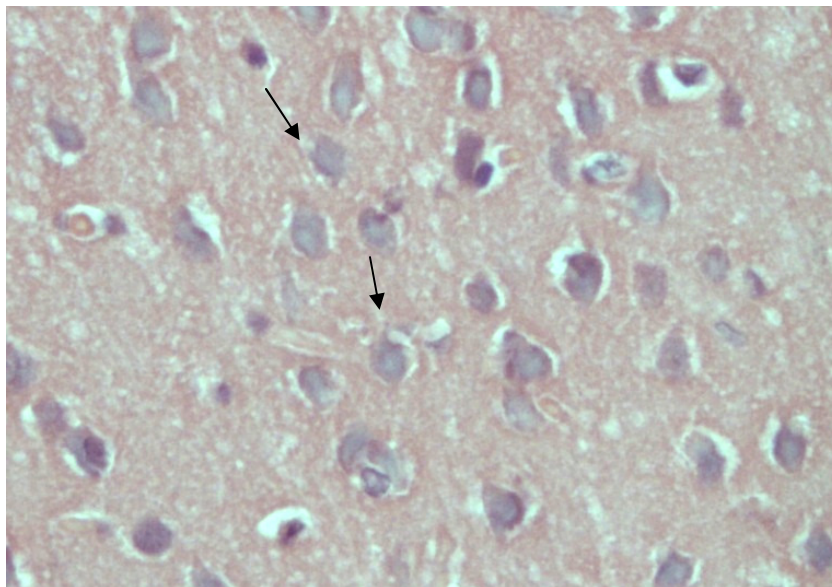


Рисунок 17 – Фенилкарбамат 0,1 мг/кг. Кора лобной доли. В большинстве неронов граница ядра и цитоплазмы не определяется, ядрышко не визуализируется. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

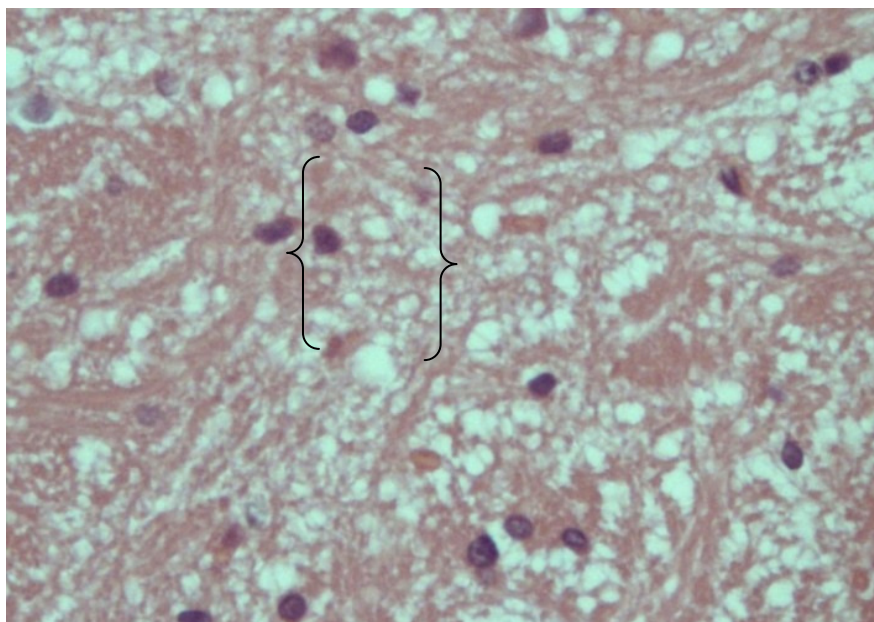


Рисунок 18 – Фенилкарбамат 0,1 мг/кг. Белое вещество. Нейропиль значительно разрежен. Количество клеток глии в пределах нормы. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

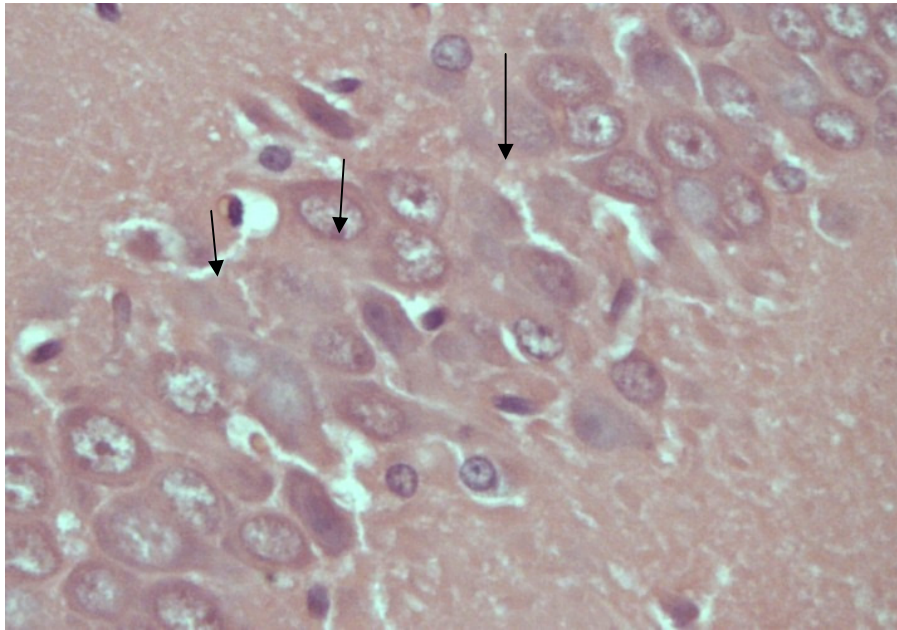


Рисунок 19 – Фенилкарбамат 0,1 мг/кг. Гиппокамп. Часть нейронов коры сохранена, часть – не имеет четкой границы ядра и цитоплазмы, в этих клетках ядрышко не определяется. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

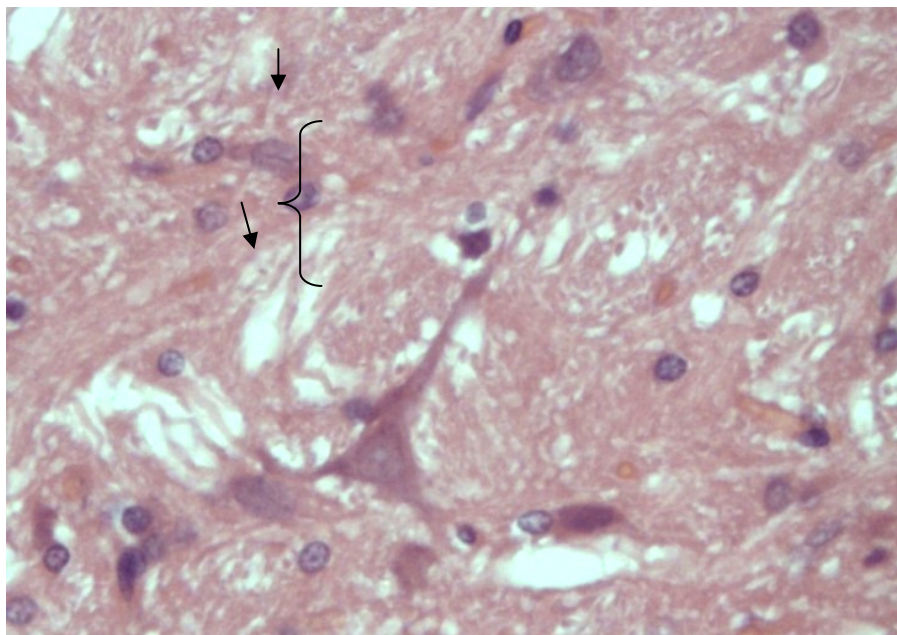


Рисунок 20 – Фенилкарбамат 0,1 мг/кг. Ствол головного мозга. Нейрон типичного строения, окружающий нейропил значительно разрежен. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

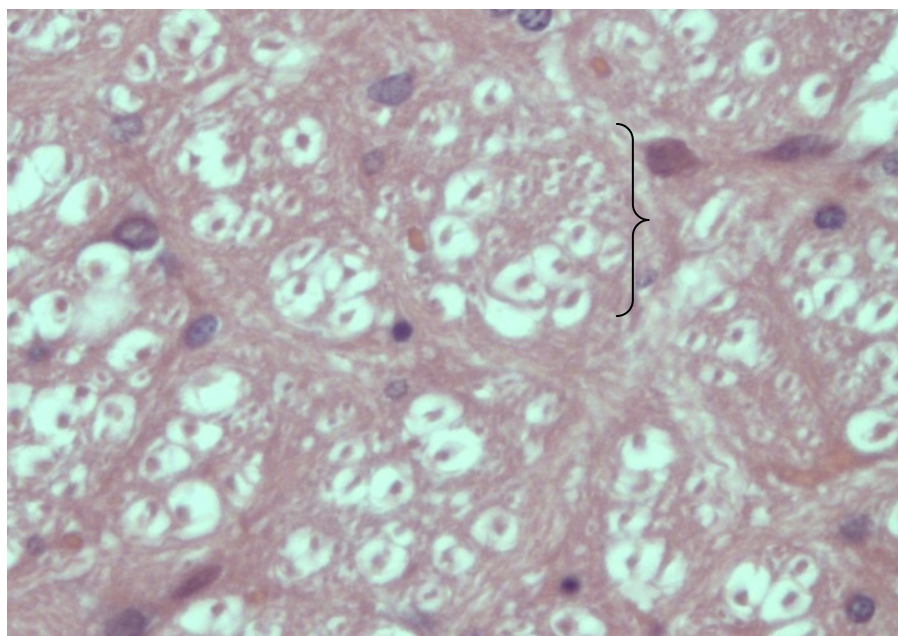


Рисунок 21 – Фенилкарбамат 0,1 мг/кг. Ствол головного мозга. Поперечно срезанные продольные пучки. Выраженный отек аксоплазмы. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

Судорожная доза Фенилкарбамата. В коре головного мозга у животных получавших судорожную дозу большое количество нейронов коры темные, вытянутой формы, без четкой границы ядра (рисунок 22). В белом веществе наблюдается очаговое разрежение нейропилия, преимущественно за счет отростков клеток (астроцитов, олигодендроцитов или нейронов), в некоторых очагах резко выраженное разрежение нейропилия сочеталось глиоцитопенией, то есть наблюдались очаги селективного некроза (рисунок 23). Вены в белом веществе растянуты, заполнены эритроцитами плохо воспринимающими эозин, без четких границ (рисунок 24). Большинство нейронов ствола темные, сморщенные, но на этом фоне встречаются отдельные клетки в состоянии острого набухания (рисунок 25). В мозжечке большинстве случаев имели место обширные очаги выпадения клеток Пуркинье (рисунок 28) и очаги селективного некроза (рисунок 29).

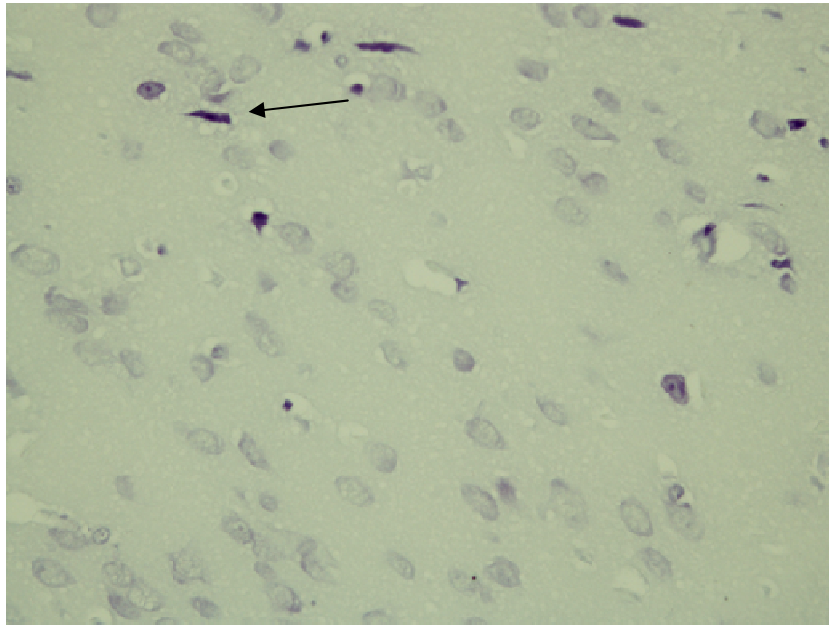


Рисунок 22 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Кора лобной доли головного мозга. Большинство нейронов с темной цитоплазмой и ядром, без четкой границы, часть из них вытянутой формы. Ядрышко не визуализируется. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

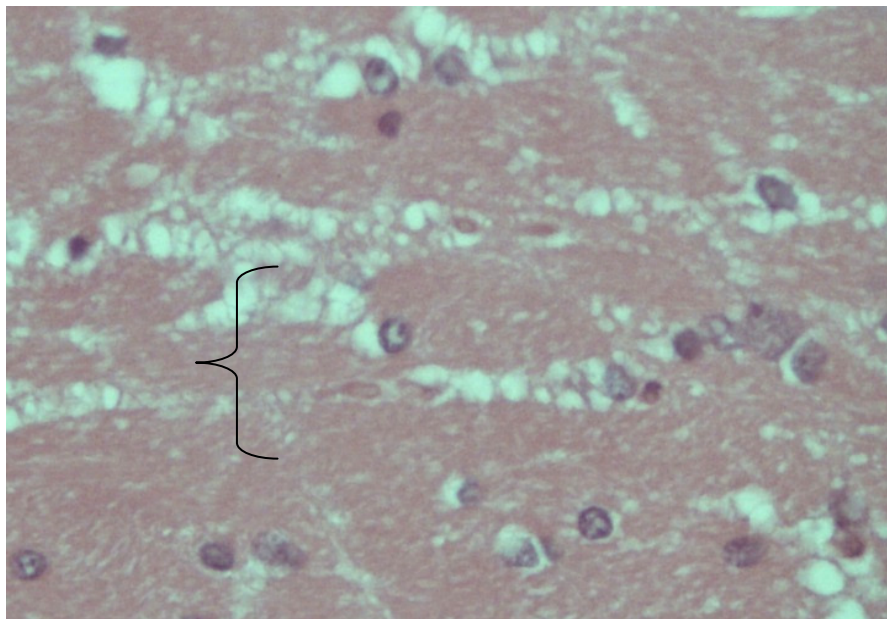


Рисунок 23 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Белое вещество. Очаговое разрежение нейропиля, в основном за счет отека отростков клеток. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

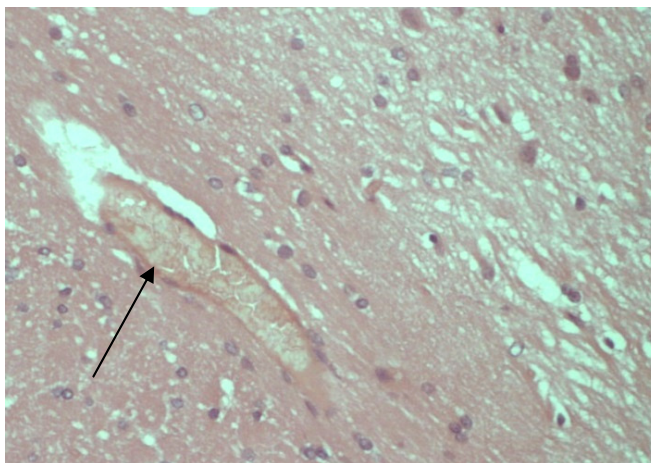


Рисунок 24 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Белое вещество головного мозга. Вена растянута, заполнена бледными эритроцитами, без четких границ. Нейропиль несколько разряжен. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

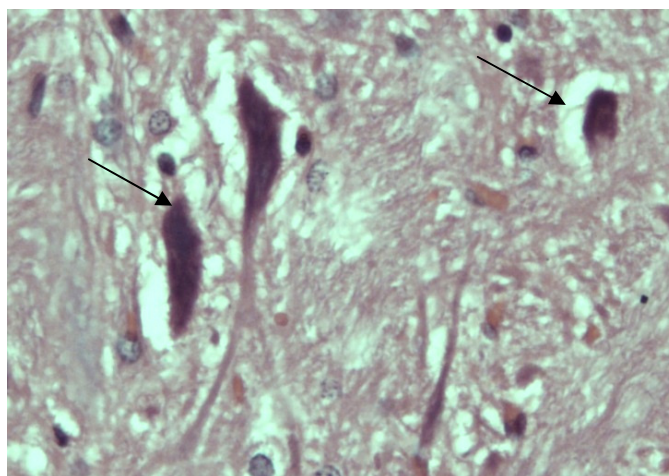


Рисунок 25 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Ствол головного мозга. Нейроны темные, сморщенные, некоторые – в состоянии острого набухания. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

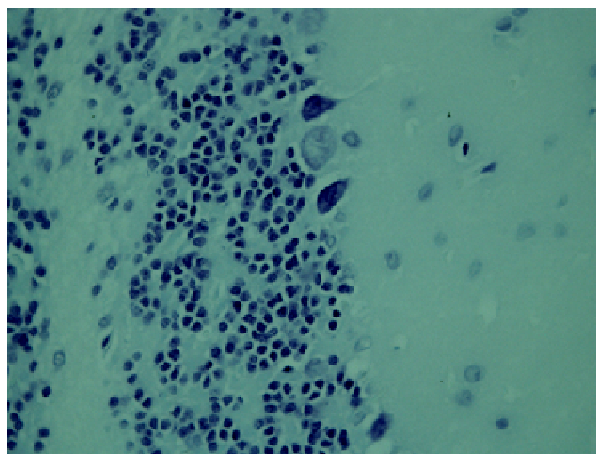


Рисунок 26 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Мозжечок. Клетки Пуркинье темные, ядро и ядрышко не определяются. Окраска по методу Ниссля Ув. 400

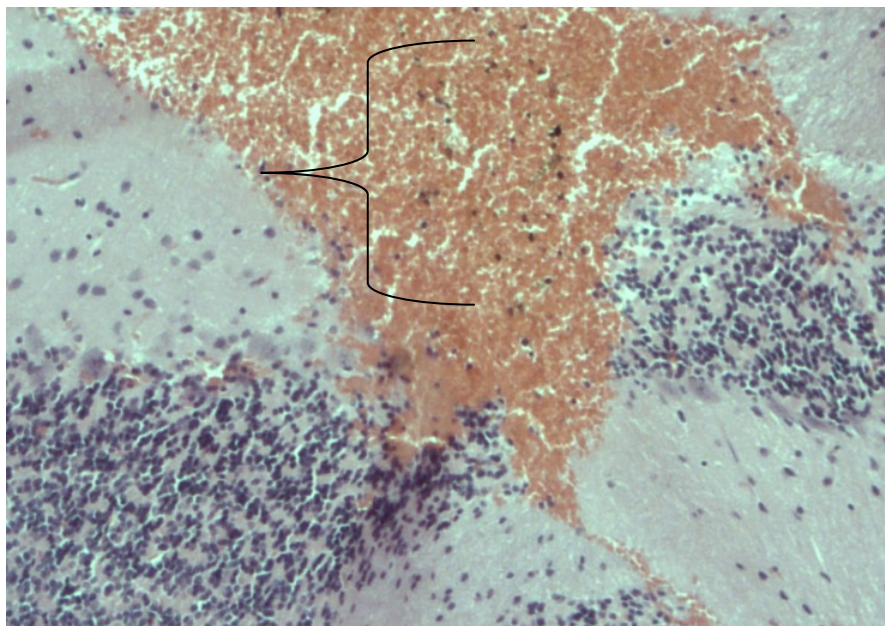


Рисунок 27 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Мозжечок. Паренхиматозное кровоизлияние. Окраска гематоксилином и эозином Ув.100

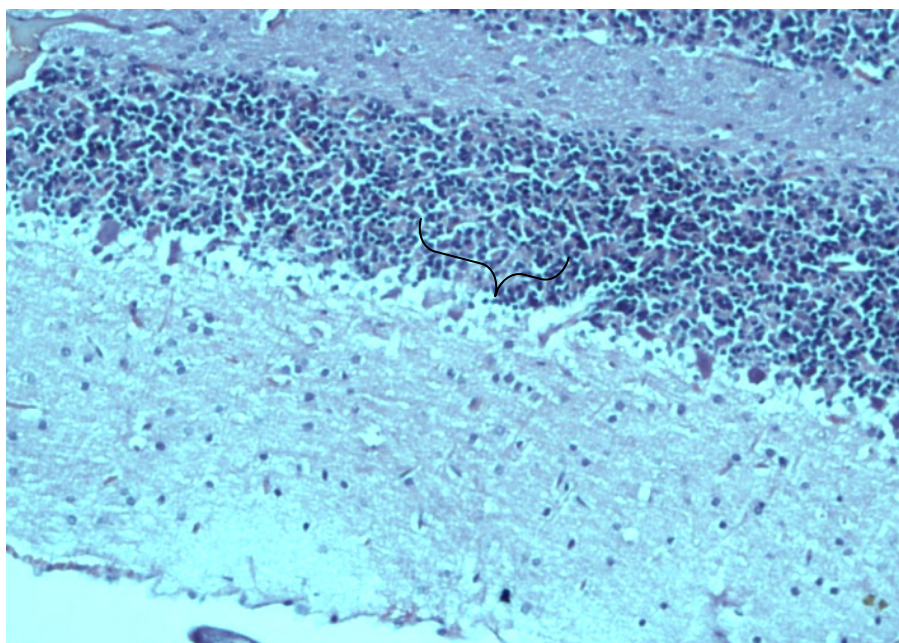


Рисунок 28 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Мозжечок. Обширные очаги выпадения клеток Пуркинье. Окраска по методу Ниссля Ув.100

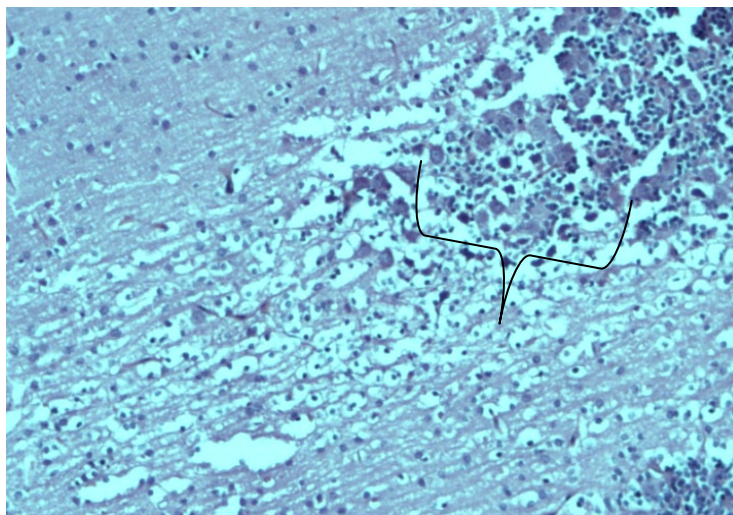


Рисунок 29 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Мозжечок. Очаг элективного некроза.
Окраска по методу Ниссля Ув. 100

Через 3, 4, 5 суток после введения Фенилкарбамата морфологическая картина сохранялась: большинство нейронов коры головного мозга были тёмными, сморщенными, определялись единичные нейроны в состоянии острого набухания (рисунки 30, 31, 32).

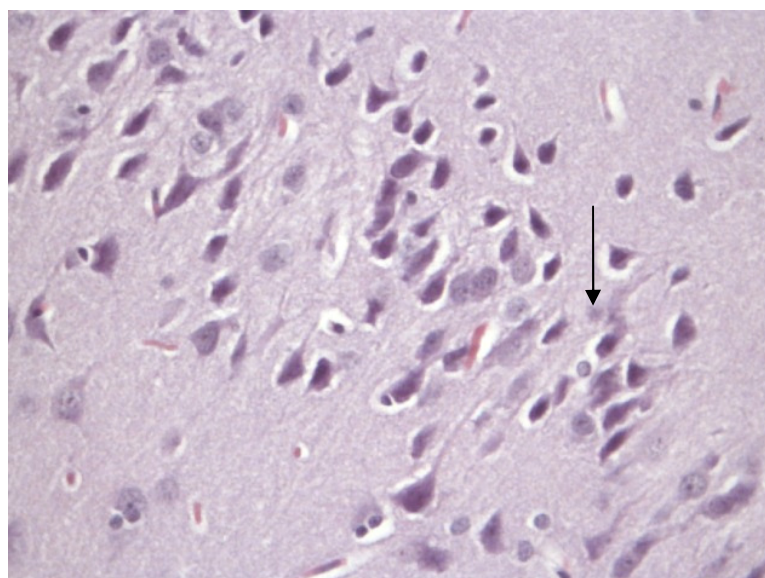


Рисунок 30 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Кора головного мозга. Большинство нейронов темные сморщенные, единичные в состоянии острого набухания и «клетки-тени». Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

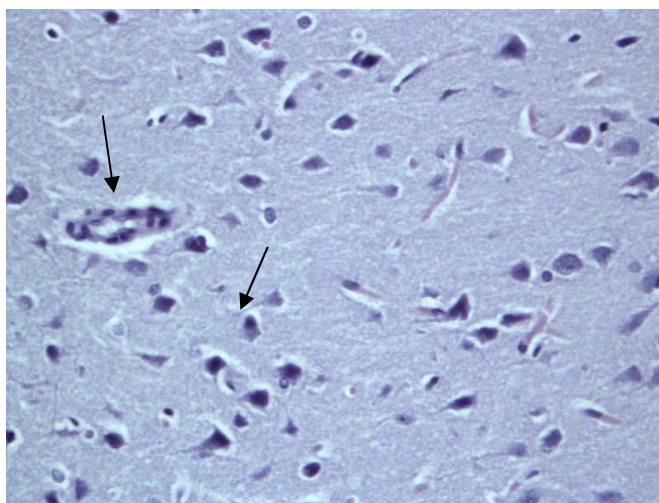


Рисунок 31 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Кора головного мозга. Эндотелий мелкого сосуда набухший, периваскулярное пространство незначительно расширено.

Часть нейронов темные, ядро и ядрышко не определяются, единичные – в состоянии острого набухания. Окраска по методу Ниссля Ув. 400

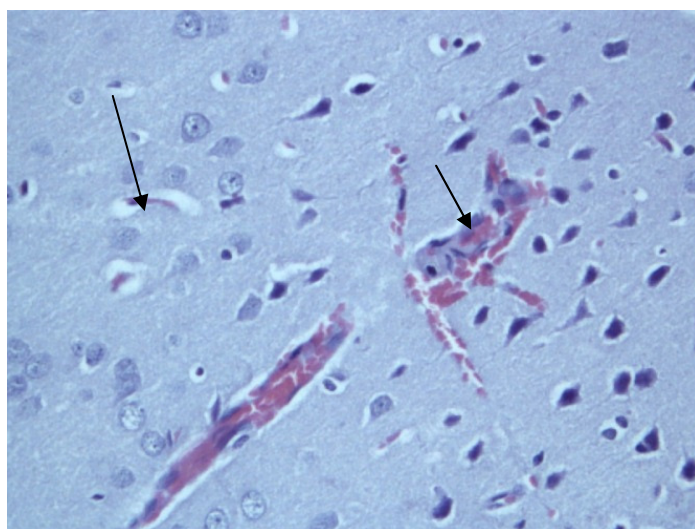


Рисунок 32 – Фенилкарбамат 1 мг/кг. Кора головного мозга. Эндотелий мелкого сосуда набухший. Часть нейронов темные, сморщенные, часть – в состоянии острого набухания. Окраска по методу Ниссля Ув. 400

Таким образом, даже субсудорожная доза Фенилкарбамата приводит к возникновению нарушений в структуре тканей мозга. Судорожная доза вызывает однозначное повреждение тканей, при этом эффект сохраняется в течение длительного времени несмотря на то, что прямое воздействие токсиканта на организм уже завершилось. Полученные результаты подтверждают выраженную нейротоксичность Фенилкарбамата и обоснованность его использования как модельного токсиканта и при разработке средств купирования судорожного

синдрома при острой интоксикации, так и при разработке средств терапии отдаленных последствий воздействия нейротоксикантов на организм.

3.10 Оценка апоптотических TUNEL-положительных клеток при интоксикации Фенилкарбаматом

Помимо изучения морфологии клеток нервной системы под воздействием судорожного агента, интерес представляет оценка уровня апоптоза в тканях мозга.

Проведена оценка апоптотических TUNEL-положительных клеток в тканях головного мозга. Межгрупповая сравнительная оценка этого показателя у самцов крыс после внутрибрюшинного введения Фенилкарбамата и контрольного вещества на 15 день исследования с использованием Kruskal-Wallis ANOVA выявила значимые различия по изучаемому показателю (таблица 29).

Таблица 29 – Оценка апоптотических TUNEL-положительных клеток самцов крыс при внутрибрюшинном введении токсиканта и контрольного вещества

Экспериментальная группа	Значения переменной				p ¹
	N	Me	LQ	UQ	
Контроль	5	7,20	5,80	7,60	0,008*
Фенилкарбамат	5	13,60	13,20	13,80	
Примечание – ¹ – p-значение межгрупповых различий					

Медианное значение показателя в группах Фенилкарбамат было выше на 89% в сравнении с группой Контроль. Таким образом, результаты данного теста дополнительно подтверждает наличие органического поражения головного мозга у крыс с развитием отдаленных неврологических нарушений.

3.11 Динамика ингибирования активности ацетилхолинэстеразы при отравлении Фенилкарбаматом с возникновением судорожного синдрома у крыс

При разработке экспериментальных моделей, помимо общих механизмов действия, безусловно, необходимо учитывать прямое воздействие на специфические «мишени». Поскольку Фенилкарбамат является обратимым ингибитором холинэстераз, проведена количественная оценка степени его влияния на ацетилхолинэстеразу (АХЭ) в рамках разработанной модели.

Активность АХЭ определялась в цельной крови контрольных и опытных групп, как и процентное соотношение ингибированной АХЭ в крови и в головном мозгу после введения Фенилкарбамата. Кровь и ткань головного мозга отбирали через 10 минут после введения трксиканта, а также 30 и 60 минут, 6 и 24 часа. Точка 6 часов была использована для проверки реактивации ацетилхолинэстеразы исходя из механизма действия (реактивация в течение 4-6 часов).

Продemonстрировано, что после введения Фенилкарбамата в дозе 1 мг/кг и проявления судорожного синдрома регистрируется достоверное подавление активности ацетилхолинэстеразы в ЦНС и периферической крови крыс на протяжении 6 часов. Через 24 часа отмечается полное восстановление активности АХЭ и даже её увеличение. Обращает на себя внимание, что судороги у крыс полностью прекращаются через 6 часов после введения Фенилкарбамата, при этом по-прежнему наблюдается подавление активности фермента как в тканях мозга, так и в крови крыс на 42,3% и 30,5% соответственно.

Таблица 30 – Динамическая оценка активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и крови крыс после введения Фенилкарбамата

Время отбора	Фенилкарбамат (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 часов	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)						

На основании полученных данных проведено сравнение по основным параметрам судорожного синдрома, наблюдаемые при введении Фенилкарбамата внутривенно в дозе 1мг/кг, по сравнению с эффектами, наблюдаемыми при введении коразола и тиосемикарбазида (ТСК), представлены в таблице 30.

Как видно из данных таблицы 31 время наступления латентного периода судорог у крыс из группы Фенилкарбамат (1мг/кг) и у крыс, получавших коразол (65 мг/кг) было сопоставимо. У животных получивших тиосемикарбазид зафиксирован более длительный латентный период появления судорог. В группе Фенилкарбамат интенсивность судорожного синдрома была в основном на 5 уровне (60% животных) по сравнению с судорожным синдромом при введении Коразола и Тиосемикарбазида, который достигал 6 уровня у большинства животных. Фенилкарбаматная модель также сопоставима с коразоловой (пентилентетразоловой) моделью по показателям продолжительности судорожного синдрома и интенсивных судорог.

Таблица 31 – Основные показатели судорожного синдрома, наблюдаемые при введении Фенилкарбамата, коразола и тиосемикарбазида

№	Основные показатели	ФК, 1мг/кг	Коразол, 65 мг/кг	ТСК, 8 мг/кг
1	Латентный период проявления судорог, мин	6,35±0,33	8,11±0,6	106,8±7,34
2	Жевательные движения и подёргивания головы, %	100	0	0
3	Клонические судороги, %	100	100	100
4	Тонические, %	25	22	100
5	Экстензии, %	0	11	100
6	Летальность, %	12,7	20	33,3
7	Интенсивность судорог 5 уровня по Racine	64,7%	11,3%	10,8%
8	Интенсивность судорог 6 уровня по Racine	25,5%	60,6%	65,1%
9	Продолжительность судорог в минутах	120	90	480

Поскольку значимым клиническим проявлением интоксикации ингибиторами холинэстераз является развитие судорожного синдрома, целесообразно сравнивать модели в первую очередь по основным показателям (латентному периоду наступления судорог, выраженностью, продолжительностью, летальностью). Таким образом, модель Фенилкарбаматных судорог представляют большую ценность для исследователей, так как по основным параметрам сопоставима с эталонной моделью коразоловых судорог, что подтверждается полученными результатами.

Обобщая полученные в рамках данной главы результаты можно заключить, что выбранный в качестве нового модельного токсиканта Фенилкарбамат

обладает всеми необходимыми характеристиками для использования в экспериментальной модели для тестирования лекарственных средств: он имеет установленный механизм прямого действия на организм (ингибирование активности АХЭ) и позволяет в эксперименте на мелких лабораторных животных (крысах) эффективно воспроизводить судороги, сопоставимые по выраженности с генерализованным судорожным синдромом у человека. Помимо приемлемых основных характеристик, позволяющих оценивать прямые противосудорожные эффекты новых лекарственных средств в экспериментальной модели с использованием Фенилкарбамата, введение данного токсиканта позволяет оценивать влияние терапии на отдаленные последствия интоксикации, поскольку приводит к нарушению ряда количественных показателей (состава крови, структуры тканей, функционального состояния организма) в период, значительно превышающий по времени длительность прямого воздействия нейротоксиканта на холинэстеразы.

3.12 Валидация экспериментальной судорожной модели

Безусловно, значительная часть подходов и оценок, принятых при валидации аналитических (химических, физико-химических и прочих) методик для оценки качества фармакологических субстанций и лекарственных средств малопригодна в случаях работ с биологическими объектами, отличающимися значительной индивидуальной вариабельностью.

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).

Для расчетов были взяты данные трех экспериментов в 2018, 2019, 2022 годах по 10 животных в каждом, с возникновением судорожного синдрома при введении Фенилкарбамата внутрибрюшинно в дозе 1мг/кг. Расчитана площадь под кривой на основании выраженности и продолжительности судорожного синдрома.

В таблице 32 представлены результаты оценки влияния судорожного синдрома после интоксикации Фенилкарбаматом на площадь под кривой по выраженности и продолжительности судорог.

Таблица 32 – Оценка сходимости результатов площади под кривой «судороги в балл-время», баллы/мин, у самцов крыс по годам

Статистический показатель	Результаты измерения ВВСБ			
	2018	2019	2022	Значения за 3 года
Среднее значение	199,4	198,8	236,6	211,6
Стандартное отклонение	53,1	43,1	57,1	52,4
Коэффициент вариации, %	26,7	21,7	24,1	24,7

Статистическая обработка полученных результатов показала, что средние значения ВВСБ по годам варьируются от 199,4 до 236,6. При этом среднее значение за 3 года наблюдений составило 211,6, а коэффициент вариации для этого периода 24,7%, что означает значительную степень рассеивания. Известно, что для аналитических методик рекомендованный коэффициент вариации не должен превышать 15%. Для оценки сходимости результатов экспериментов на животных приемлемых значений коэффициента вариации не установлено, но он явно выше, с учетом индивидуальных различий.

Таблица 33 – Сравнительная оценка площади под кривой «судороги в балл-время», баллы/мин, у самцов крыс по годам

Год	Значения переменной						p ¹
	N	M	SD	Me	LQ	UQ	
2018	8	199,4	53,1	198,8	161,3	243,8	0,264
2019	8	198,8	43,1	206,3	186,3	223,8	
2022	8	236,6	57,1	247,5	226,3	267,5	
Примечание – ¹ – p-значение межгрупповых различий в <i>One-Way ANOVA</i>							

Анализ данных таблицы 33 не выявил статистически значимых различий исследуемого показателя по годам.

Соответственно, методика экспериментального моделирования судорожного синдрома при введении Фенилкарбамата по показателю «Прецизионность» (межгодовая) продемонстрировала удовлетворительные результаты при валидации, что позволяет рекомендовать данную модель судорожного синдрома как пригодную для доклинических исследований.

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ ТЕРАПИИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ОТЛОЖЕННЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ

4.1 Влияние фармакологической терапии на летальность при острой интоксикации Фенилкарбаматом

Важнейшим критерием эффективности терапии судорожного синдрома при отравлении нейротоксикантами является снижение летальности.

В число тестируемых средств вошел Атропина сульфат (официальный антидот при отравлении ингибиторами холинэстераз), официальный противосудорожный лекарственный препарат Реланиум, а также ряд перспективных соединений, в том числе Карамифен (с описанными в литературе М-холиноблокирующим и NMDA-блокирующим эффектами), Диферидин (с выявленной способностью ингибировать центральные М-холинорецепторы и Н-холинорецепторы, а также периферические М-холинорецепторы), тригексифенидил, и четыре оригинальных аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК№1, АВК№2, АВК№3, АВК№4), с перспективной для терапевтических целей структурой и предполагаемой активностью.

Введение средств фармакологической терапии осуществлялось через 1-2 минуты после наступления судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом в судорожной дозе.

В таблице 34 представлено влияние вышеперечисленных веществ на летальность в эксперименте с воспроизведением генерализованного судорожного синдрома при помощи новой экспериментальной модели, основанной на внутрибрюшинном введении Фенилкарбамата крысам.

Летальность животных в группе Фенилкарбамат без лечения наблюдалась в промежутке 20-40 минут и составляет примерно 18%. Летальность наблюдалась и в ряде групп с применением лекарственной терапии: в группе с применением Атропина погибло 2 животных из 15, в группе с зарегистрированным Тригексифенидилом 2 животных из 11, а в группе с применением

зарегистрированного средства противосудорожной терапии Реланиум 1 животное из 13.

Таблица 34 – Влияние исследуемых веществ на летальность крыс

Экспериментальная группа	Доля погибших крыс (n/N) во временных промежутках					
	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
ФК	0/46	0/46	5/46	1/41	2/40	0/38
ФК+Реланиум	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/14
ФК+Атропин	0/15	0/15	0/15	1/15	1/14	0/13
ФК+АВК№3	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
ФК+АВК№1	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
ФК+АВК№2	0/11	0/11	0/11	1/11	1/10	0/9
ФК+АВК№4	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
ФК+Кармифен	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
ФК+Тригексифенидил	0/11	0/11	2/11	0/9	0/9	0/9
ФК+Диферидин	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11

Обращает на себя внимание, что в группах животных, которым вводили экспериментальные фармацевтические субстанции №1, №3 и №4, гибели животных не зарегистрировано. В связи с низкой летальностью (17%) при введении судорожной дозы Фенилкарбамата, ни один из исследованных препаратов не показал статистически значимого ее снижения, и только для соединения АВК№3 эффект снижения летальности достиг уровня статистической тенденции ($p=0,088$).

4.2 Эффективность экспериментальной терапии на выраженность судорог при острой интоксикации Фенилкарбаматом

При оценке выраженности судорог, возникающих после введения Фенилкарбамата и тестируемых в данном исследовании веществ, учитывались судороги, эквивалентные генерализованным клонико-тоническим судорогам у человека (4 уровень по шкале Racine и выше).

В таблице 35 показано соотношение числа крыс с выраженностью судорог 4 уровня и выше и общего количества животных в группе. Для оценки значимости различий в частоте появления крыс с выраженными судорогами использовали точный критерий Фишера.

Таблица 35 – Изучение влияния фармакологической терапии на выраженность судорог

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 ($p \leq 0,05$)								

После введения Фенилкарбамата (положительный контроль) доля крыс с выраженными судорогами начинала снижаться с 40 минуты (таблица 35) и к 70 минутам таких животных не наблюдали, что связано с особенностями действия модельного токсиканта, являющегося обратимым ингибитором холинэстераз.

При введении животным 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 в группе с применением Атропина только с 30 минуты, как и в группе без лечения.

В группах с лечением Тригексифенидилом с 10 минуты, а при терапии Карамифеном судорог прекращались полностью уже с 5 минут наблюдения.

Доля крыс с выраженными судорогами в группе с применением АВК №3 была равна 0 уже на 20 минуте, однако в группах АВК№1, АВК№2, АВК№4 не выявлено снижения выраженности судорожного синдрома по сравнению с группой животных, получавших только Фенилкарбамат.

На рисунке 33 представлена графическая иллюстрация зависимости выраженности судорог от разновидности аминоксифира вальпроевой кислоты в сравнении с Атропином и Реланиумом. Оценка выраженности судорожного

синдрома по модифицированной шкале Racine любой степени выраженности (от 0 до 6 баллов) проводилась на протяжении 90 минутного наблюдения.

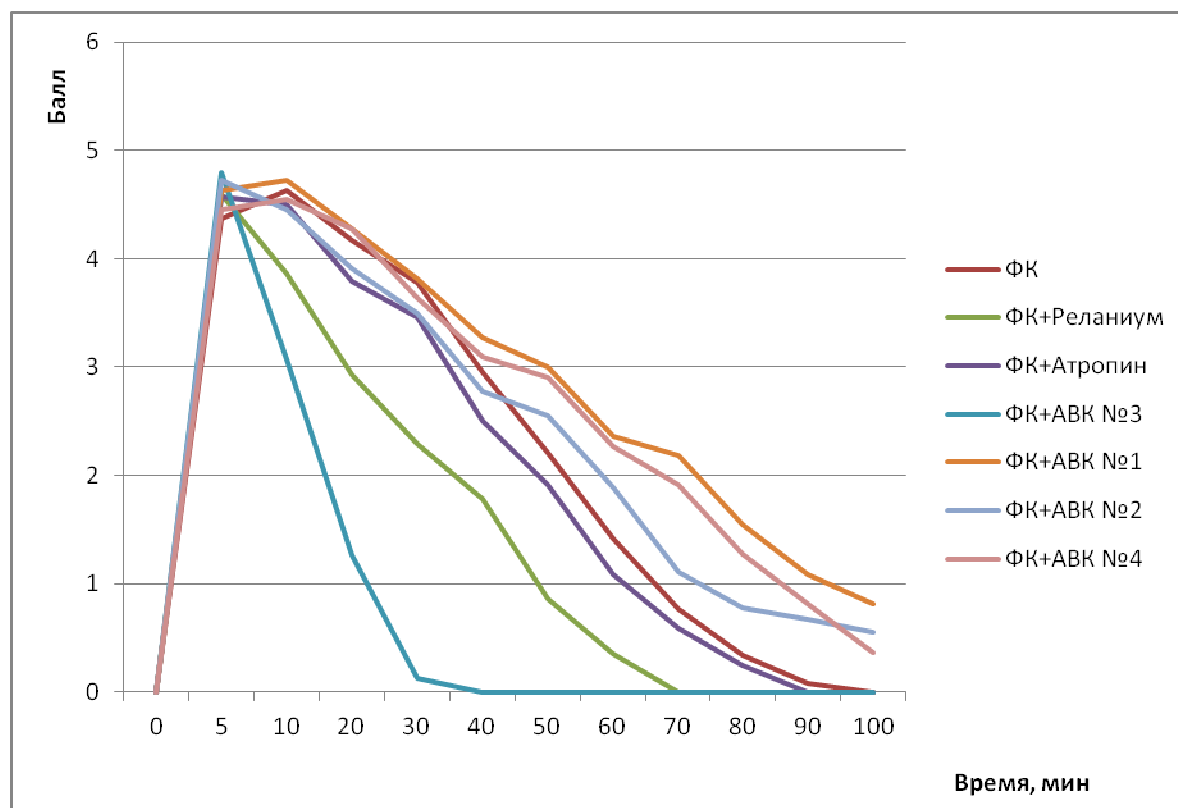


Рисунок 33 – Обобщенные по среднему значению графики зависимости выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine (баллы) от времени после применения фармакологической терапии с АВК самцам крыс

С целью интегральной оценки динамики изменения выраженности судорог для каждого животного в представленных временных точках рассчитывали взвешенную по времени сумму баллов интенсивности судорог (ВВСБ), которая представляла собой площадь под кривой «судороги в балл-время» (из расчетов были исключены погибшие особи).

Результаты сравнительной оценки переменной площади под кривой «судороги в балл-время» (таблица 36) с применением Kruskal-Wallis ANOVA показали наличие статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами.

Таблица 36 – Сравнительная оценка площади под кривой «судороги в балл-время», баллы/мин, у самцов крыс после применения фармакологической терапии

Экспериментальная группа	Значения переменной						p ¹
	N	M	SD	Me	LQ	UQ	
ФК	38	213,3	50,4	203,8	180,0	260,0	0,000*
ФК+Реланиум	14	135,5	43,1	135,0	115,0	175,0	
ФК+Атропин	12	189,8	44,1	183,8	152,5	235,0	
ФК+АВК№3	15	61,0	14,9	62,5	47,5	75,0	
ФК+АВК№1	11	278,2	46,0	262,5	240,0	322,5	
ФК+АВК№2	9	–	–	202,5	175,0	245,0	
ФК+АВК№4	11	260,0	24,8	255,0	240,0	267,5	
Примечания: 1 ¹ – p-значение различий между группами 2 * – Статистически значимые различия (p<0,05)							

Для установления точных различий между отдельными группами было проведено попарное сравнение с использованием Dunn test (таблица 37).

Таблица 37 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений ВВСБ крыс через сутки после введения исследуемых лекарственных средств

Экспериментальная группа	ФК	ФК+Реланиум	ФК+Атропин	ФК+АВК№3	ФК+АВК№1	ФК+АВК№2	ФК+АВК№4
ФК	–	0,016*	1,000	0,000*	0,248	1,000	0,654
ФК+Реланиум	0,016*	–	1,000	1,000	0,000*	0,247	0,000*
ФК+Атропин	1,000	1,000	–	0,011*	0,067	1,000	0,168
ФК+АВК№3	0,000*	1,000	0,011*	–	0,000*	0,001*	0,000*
ФК+АВК№1	0,248	0,000*	0,067	0,000*	–	1,000	1,000
ФК+АВК№2	1,000	0,247	1,000	0,001*	1,000	–	1,000
ФК+АВК№4	0,654	0,000*	0,168	0,000*	1,000	1,000	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце (p<0,05)							

Анализ данных таблицы 37 выявил статистически значимые различия между группами ФК и ФК+Реланиум (p=0,016), ФК и ФК+АВК№3 (p=0,000). Уровень медианного значения ВВСБ в группах ФК+Реланиум и ФК+АВК№3 был ниже на 34% и 69% ниже в сравнении с группой ФК соответственно. Также были зарегистрированы различия между группой ФК+АВК№3 и группами ФК+Атропин (p=0,011), ФК+АВК№1 (p=0,000), ФК+АВК№2 (p=0,001) и ФК+АВК№4 (p=0,000). Уровень медианного значения показателя в этих группах был выше на 194%, 320%, 224% и 308% в сравнении с группой ФК+АВК№3 соответственно. Были выявлены различия между группой ФК+Реланиум и группами ФК+АВК№1 (p=0,000) и ФК+АВК№4 (p=0,000) – значение ВВСБ в

исследуемых группах было выше на 94% и 89% в сравнении с группой ФК+Реланиум.

На рисунке 34 представлена графическая визуализация зависимости выраженности судорог при введении тестируемых группы веществ, обладающих мультитаргетным действием. Оценка выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine любой степени выраженности (от 0 до 6 баллов) проводилась на протяжении 90 минутного наблюдения. На рисунке 34 представлена динамика средних значений балльной оценки после введения исследуемых субстанций.

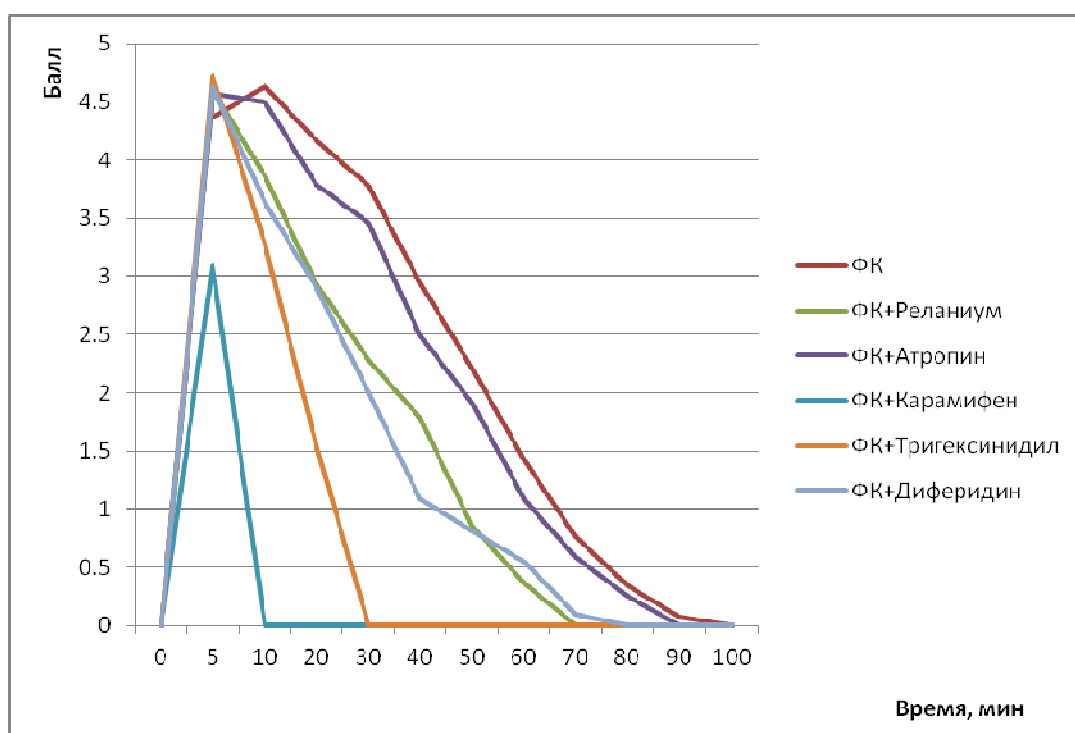


Рисунок 34 – Обобщенные по среднему значению графики зависимости выраженности судорожного синдрома по модифицированной шкале Racine (баллы) от времени после применения фармакологической мультитаргетной терапии самцам крыс

С целью интегральной оценки динамики изменения выраженности судорог для каждого животного в представленных временных точках рассчитывали взвешенную по времени сумму баллов интенсивности судорог (ВВСБ), которая представляла собой площадь под кривой «судороги в балл-время» (из расчетов были исключены погибшие особи).

Результаты сравнительной оценки переменной площади под кривой «судороги в балл-время» (таблица 38) показали наличие статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами.

Таблица 38 – Сравнительная оценка площади под кривой «судороги в балл-время», баллы/мин, у крыс после введения исследуемых средств

Экспериментальная группа	Значения переменной						p ¹
	N	M	SD	Me	LQ	UQ	
ФК	38	213,3	50,4	203,8	180,0	260,0	0,000*
ФК+Реланиум	14	135,5	43,1	135,0	115,0	175,0	
ФК+Атропин	12	189,8	44,1	183,8	152,5	235,0	
ФК+Карамифен	11	–	–	25,0	0,0	25,0	
ФК+Тригексифенидил	9	55,6	26,9	47,5	47,5	77,5	
ФК+Диферидин	11	125,0	34,9	125,0	102,5	142,5	
Примечания:							
1 ¹ – p-значение межгрупповых различий							
2 * – Различия, оцененные с использованием, статистически значимы (p<0,05)							

Для установления точных различий между отдельными группами было проведено попарное сравнение с использованием Dunn test (таблица 39).

Таблица 39 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений, p-значения ВВСБ крыс на 1 сутки после введения исследуемых средств

Экспериментальная группа	ФК	ФК+ Реланиум	ФК+ Атропин	ФК+ Карамифен	ФК+ Тригексифенидил	ФК+ Диферидин
ФК	–	0,009*	1,000	0,000*	0,000*	0,005*
ФК+Реланиум	0,009*	–	0,702	0,041	0,683	1,000
ФК+Атропин	1,000	0,702	–	0,000*	0,003*	0,345
ФК+Карамифен	0,000*	0,041*	0,000*	–	1,000	0,220
ФК+Тригексифенидил	0,000*	0,683	0,003*	1,000	–	1,000
ФК+Диферидин	0,005*	1,000	0,345	0,220	1,000	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце (p<0,05)						

Анализ данных таблицы 39 выявил статистически значимые различия между группой ФК и группами ФК+Реланиум (p=0,009), ФК+Карамифен (p=0,000), ФК+Тригексифенидил (p=0,000) и ФК+Диферидин (p=0,005). Уровень медианного значения ВВСБ в группах ФК+Реланиум, ФК+Кармифен, ФК+Тригексифенидил и ФК+Диферидин был ниже на 34%, 88%, 77% и 39% ниже в сравнении с группой ФК соответственно. Установлены различия между группами ФК+Реланиум и группами ФК+Карамифен (p=0,041) – уровень медианного значения показателя в группе ФК+Карамифен был ниже на 81% в

4.3 Влияние фармакологической терапии на продолжительность судорог при острой интоксикации Фенилкарбаматом

Таблица 40 – Сравнительное изучение по показателю продолжительности судорожного синдрома, у крыс после применения фармакологической терапии

Экспериментальная группа	Доза мг/кг	Значения переменной				межгрупповых различий ¹ р-значение
		N	Me	Min	Max	
Фенилкарбамат (ФК)	1,0	38	69.0	45.0	101.0	<0.0001
ФК+Реланиум	1,0+1,0	14	34.0	29.0	51.0	
ФК+A	1,0+2,0	12	68.5	58.0	88.0	
ФК+ABK №1	1,0+43,0	11	97.0	85.0	148.0	
ФК+ABK №2	1,0+43,0	9	73.0	67.0	158.0	
ФК+ABK №3	1,0+43,0	15	25.0	12.0	37.0	
ФК+ABK №4	1,0+43,0	11	100.0	78.0	110.0	
Примечания ¹ – р-значение межгрупповых различий; 2 * – различия между всеми группами статистически значимы (p≤0.05)						

Таблица 41 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений, р-значения продолжительности судорожного синдрома после введения лекарственных средств

Экспериментальная группа	ФК	ФК+Рел.	ФК+А	ФК+АВ К №1	ФК+АВ К №2	ФК+АВ К №3	ФК+АВ К №4
ФК	–	0.004*	1.000	0.025*	1.000	0.000*	0.023*
ФК+Реланиум	0.004*	–	0.154	<0.0001*	0.005*	1.000	<0.0001*
ФК+А	1.000	0.154	–	0.067	1.000	0.003*	0.064
ФК+АВК №1	0.025*	<0.0001*	0.067	–	1.000	<0.0001*	1.000
ФК+АВК №2	1.000	0.005*	1.000	1.000	–	<0.0001*	1.000
ФК+АВК №3	<0.0001*	1.000	0.003*	<0.0001*	<0.0001*	–	<0.0001*
ФК+АВК №4	0.023*	<0.0001*	0.064	1.000	1.000	0.000*	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце (p<0,05)							

Важно отметить, что по уровню продолжительности судорог группа ФК значимо не различалась с препаратом сравнения ФК+А, а в группах ФК+АВК№1 (p=0.025) и ФК+АВК№4 (p=0.023) его значения были статистически значимо больше. Также уровень анализируемого показателя в ФК+АВК№3 был статистически значимо ниже по медиане на 63 % (p=0.003) в сравнении с ФК+А, высоко значимо (p=<0.0001) с АВК№1, 2 и 4 и не значимо меньше – на 26 %, чем ФК+Рел (таблица 41).

Полученные данные показали, что из всех анализируемых производных вальпроевой кислоты только АВК№3 существенно снижает продолжительность судорог как по сравнению с ФК без лечения, так и при сопоставлении с группами ФК+Атропин и ФК+Реланиум (статистически не значимо). И напротив, производные АВК под номерами 1, 2 и 4 способствовали повышению данного показателя в сравнении с ФК без лечения, что однозначно свидетельствует о преобладании противосудорожного эффекта АВК№3 по сравнению с другими изучаемыми аминоэффирами.

В результате сравнительной оценки общей продолжительности судорог у крыс с применением Kruskal-Wallis ANOVA при фармакологической терапии лекарственными средствами, основанной на проявлении мультитаргетного

действия, было показано наличие статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами (таблица 42).

Таблица 42 – Сравнительная оценка влияния фармакологической терапии на продолжительность судорожного синдрома у крыс

Экспериментальная группа	Доза мг/кг	Значения переменной				межгрупповых р-значение различий ¹
		N	Me	Min	Max	
Фенилкарбамат (ФК)	1,0	38	69.0	45.0	101.0	<0.0001
ФК+Реланиум	1,0+1,0	14	34.0	29.0	51.0	
ФК+А	1,0+2,0	12	68.5	58.0	88.0	
ФК+Кар.	1,0+50,0	11	5.0	2.0	6.0	
ФК+Триг.	1,0+20,0	9	20.0	18.0	29.0	
ФК+Диф.	1,0+2,0	11	56.0	30.0	73.0	
Примечания: 1 ¹ – р-значение межгрупповых различий; 2 * – Различия между всеми группами статистически значимы (p<0.05)						

Для обнаружения различий в эффектах Атропина, Реланиума и других соединений (помимо производных вальпроевой кислоты) использовали непараметрический Dunn test (таблица 43).

Таблица 43 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений продолжительности судорожного синдрома после введения исследуемых средств

Группа	ФК	ФК + Реланиум	ФК+А	ФК+Кар.	ФК+Триг.	ФК+Диф.
ФК	–	<0.0001*	1.000	<0.0001*	<0.0001*	0.774
ФК+Реланиум	<0.0001*	–	0.012*	0.541	1.000	0.916
ФК+А	1.000	0.012*	–	0.000*	0.001*	1.000
ФК+Кар.	<0.0001*	0.541	<0.0001*	–	1.000	0.003*
ФК+Триг.	<0.0001*	1.000	0.001*	1.000	–	0.090
ФК+Диф.	0.774	0.916	1.000	0.003*	0.090	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p < 0,05$)						

Из результатов данных из таблицы 43 очевидно, что по продолжительности судорог от группы без лечения (ФК) в сторону уменьшения продолжительности судорог статистически значимо отличались группы ФК+Рел ($p < 0.0001$), ФК+Кар ($p < 0.0001$), ФК+Триг ($p < 0.0001$), уровень показателя был ниже по медиане на 51%, 92%, 71% соответственно. Также статистически значимая более низкая продолжительность судорог установлена с группой препарата сравнения ФК+А и исследуемыми лекарственными средствами ФК+Кар ($p < 0.0001$), ФК+Триг

($p < 0.0001$), уровень показателя по медиане был ниже на 93%, 72% соответственно (таблица 42).

Полученные данные демонстрируют, что Карамифен и тригексифенидил, имеющие потенциальную возможность воздействовать на несколько механизмов купирования судорог, статистически значимо снижают симптоматику судорожного синдрома по сравнению с группой ФК+А. В группе ФК+Диф наблюдается незначимая тенденция снижения временного промежутка судорожного синдрома в сравнении с группой без лечения и с лечением классическим антидотом Атропином.

Таким образом, по показателю летальности и продолжительности судорожного синдрома при отравлении Фенилкарбаматом наиболее выраженной фармакологической эффективностью обладают следующие лекарственные средства: Карамифен, аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК№3), Дифередин и зарегистрированный лекарственный препарат Реланиум. Для дальнейшего изучения вторичных показателей были выбраны именно эти лекарственные средства. Другие средства, не показавшие эффективность купирования судорожного синдрома и снижения летальности, исследованию не подлежали, в том числе антидот – Атропин сульфат.

4.4 Влияние фармакологической терапии на поведение и память при острой интоксикации Фенилкарбаматом

Влияние известных и перспективных отобранных средств фармакологической коррекции судорог на поведение и двигательную активность животных оценивалось по результатам теста «Открытое поле».

Тестирование проводили на нелинейных белых крысах самцах на 1, 7, 14, 21 сутки после введения судорожного агента Фенилкарбамата и применения фармакологической терапии купирования судорожного синдрома.

Межгрупповая сравнительная оценка поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» самцов крыс после введения Фенилкарбамата и средств купирования судорожного синдрома (таблица 44) с использованием Kruskal-

Wallis ANOVA показала статистически значимые различия по показателям: горизонтальные перемещения ($p=0,005$), среднее расстояние, пройденное животным ($p=0,020$), средняя скорость ($p=0,027$), общая двигательная активность ($p=0,012$), двигательная активность на периферии ($p=0,011$).

Таблица 44 – Сравнительная оценка поведенческих реакций самцов крыс в тесте «Открытое поле» на 1 сутки после судорожного синдрома

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p^1
		N	Me	LQ	UQ	
1	2	3	4	5	6	7
Горизонтальные перемещения, число актов	ФК	20	73,5	26,4	118,5	0,005*
	Контроль	13	44,0	25,0	54,0	
	ФК+Карамифен	8	16,5	8,5	23,0	
	ФК+Дифередин	8	43,5	29,0	46,0	
	ФК+Реланиум	7	40,0	33,0	58,0	
	ФК+АВК№3	8	29,0	15,0	39,0	
Груминг, число актов	ФК	20	30,5	21,0	46,6	0,238
	Контроль	13	32,0	9,0	39,0	
	ФК+Карамифен	8	16,5	10,0	26,0	
	ФК+Дифередин	8	28,0	14,5	33,0	
	ФК+Реланиум	7	25,0	18,0	37,0	
	ФК+АВК№3	8	23,0	10,0	30,0	
Вертикальные перемещения (стойки), число актов	ФК	20	30,5	13,1	77,0	0,077
	Контроль	13	20,0	9,0	36,0	
	ФК+Карамифен	8	7,5	3,5	20,5	
	ФК+Дифередин	8	18,0	15,0	23,0	
	ФК+Реланиум	7	10,0	7,0	26,0	
	ФК+АВК№3	8	17,0	4,0	33,5	
Среднее расстояние, пройденное животным, м	ФК	20	2,7	1,1	4,4	0,020*
	Контроль	13	2,0	1,6	2,8	
	ФК+Карамифен	8	0,7	0,4	1,0	
	ФК+Дифередин	8	2,3	1,5	2,6	
	ФК+Реланиум	7	2,0	1,7	4,0	
	ФК+АВК№3	8	1,9	0,7	2,7	
Средняя скорость, развиваемая животным, см/с	ФК	20	2,1	3,6	0,9	0,027*
	Контроль	13	1,6	2,3	1,3	
	ФК+Карамифен	8	0,6	0,8	0,4	
	ФК+Дифередин	8	1,9	2,2	1,3	
	ФК+Реланиум	7	1,6	3,3	1,4	
	ФК+АВК№3	8	1,5	2,2	0,6	
Общая двигательная активность, число актов	ФК	20	119,4	44,0	191,0	0,012*
	Контроль	13	75,0	34,0	86,0	
	ФК+Карамифен	8	35,5	25,0	43,0	
	ФК+Дифередин	8	70,5	47,0	79,0	
	ФК+Реланиум	7	69,0	55,0	136,0	
	ФК+АВК№3	8	56,0	25,0	71,0	

Продолжение таблицы 44

1	2	3	4	5	6	7
Двигательная активность в центре площадки, число актов	ФК	20	6,0	3,4	10,6	0,090
	Контроль	13	6,0	3,0	15,0	
	ФК+Карамифен	8	2,0	0,5	4,0	
	ФК+Дифередин	8	10,0	2,5	22,5	
	ФК+Реланиум	7	8,0	6,0	16,0	
	ФК+АВК№3	8	4,0	2,0	10,5	
Двигательная активность на периферии площадки, число актов	ФК	20	110,8	42,5	184,0	0,011*
	Контроль	13	58,0	31,0	83,0	
	ФК+Карамифен	8	32,5	20,5	39,0	
	ФК+Дифередин	8	55,0	37,5	65,0	
	ФК+Реланиум	7	59,0	47,0	110,0	
	ФК+АВК№3	8	47,5	23,5	60,0	
Примечания: 1 [†] – р-значение межгрупповых различий 2 * – Различия, оцененные с использованием, статистически значимы (p<0.05)						

Полученные результаты на 1 сутки после интоксикации ФК с возникновением судорожного синдрома и применения фармакологической терапии купирования острого состояния свидетельствуют о статистически значимом снижении двигательной активности в группе ФК+Карамифен, а также незначимой, но достаточно выраженной тенденции к снижению в группе ФК+АВК№3. Для выявления различий между отдельными группами было проведено попарное сравнение (таблицы 45-49).

Таблица 45 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений горизонтальных перемещений самцов крыс на 1 сутки после судорожного синдрома с использованием Dunn test

Экспериментальная группа	ФК	Контроль	ФК+Карамифен	ФК+Дифередин	ФК+Реланиум	ФК+АВК
ФК	–	1,000	0,003*	1,000	1,000	0,220
Контроль	1,000	–	0,246	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,003*	0,246	–	0,650	0,145	1,000
ФК+Дифередин	1,000	1,000	0,650	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	0,145	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	0,220	1,000	1,000	1,000	1,000	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p < 0,05$)						

Анализ данных таблицы 45 показал наличие статистически значимых различий ($p = 0,003$) между группами ФК и ФК+Карамифен – уровень показателя в группе ФК+Карамифен был ниже на 78% по медиане в сравнении с группой ФК (таблица 44).

Таблица 46 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений среднего расстояния, пройденного самцами крыс, на 1 сутки после судорожного синдрома с использованием Dunn test

Экспериментальная группа	ФК	Контроль	ФК+ Карамифен	ФК+ Дифередин	ФК+ Реланиум	ФК+ АВК
ФК	–	1,000	0,008*	1,000	1,000	1,000
Контроль	1,000	–	0,344	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,008*	0,344	–	0,368	0,078	1,000
ФК+Дифередин	1,000	1,000	0,368	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	0,078	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	–
Примечание –* – Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p<0,05$)						

По результатам, представленным в таблице 46, показано наличие статистически значимых различий ($p=0,003$) между группами ФК и ФК+Карамифен – уровень показателя в группе ФК+Карамифен был ниже на 74% по медиане в сравнении с группой ФК (таблица 44).

Таблица 47 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений (р-значения) средней скорости, развиваемой самцами крыс, на 1 сутки после судорожного синдрома с использованием Dunn test

Экспериментальная группа	ФК	Контроль	ФК+ Карамифен	ФК+ Дифередин	ФК+ Реланиум	ФК+ АВК
ФК	–	1,000	0,012*	1,000	1,000	1,000
Контроль	1,000	–	0,416	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,012*	0,416	–	0,387	0,087	1,000
ФК+Дифередин	1,000	1,000	0,387	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	0,087	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	–
Примечание: –* – Различия для группы в строке статистически значимы по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце ($p\leq 0,05$)						

По результатам, представленным в таблице 47, показано наличие статистически значимых различий ($p=0,003$) между группами ФК и Фенилкарбамат+Карамифен – уровень показателя был ниже на 71% по медиане в сравнении с группой ФК (таблица 44).

Таблица 48 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений (р-значения) двигательной активности на периферии площадки самцов крыс на 1 сутки после судорожного синдрома с использованием Dunn test

Экспериментальная группа	ФК	Контроль	ФК+ Карамифен	ФК+ Дифередин	ФК+ Реланиум	ФК+ АВК
ФК	–	1,000	0,010*	1,000	1,000	0,220
Контроль	1,000	–	0,626	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,010*	0,626	–	1,000	0,311	1,000
ФК+Дифередин	1,000	1,000	1,000	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	0,311	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	0,220	1,000	1,000	1,000	1,000	–
Примечание: –* – Различия для группы в строке статистически значимы по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)						

По результатам, представленным в таблице 48, показано наличие статистически значимых различий ($p=0,003$) между группами ФК и Фенилкарбамат+Карамифен – уровень показателя был ниже на 70% по медиане в сравнении с группой ФК (таблица 44).

Таблица 49 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений (р-значения) общей двигательной активности самцов крыс на 1 сутки после судорожного синдрома с использованием Dunn test

Экспериментальная группа	ФК	Контроль	ФК+ Карамифен	ФК+ Дифередин	ФК+ Реланиум	ФК+ АВК
ФК	–	1,000	0,009*	1,000	1,000	0,246
Контроль	1,000	–	0,718	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,009*	0,718	–	1,000	0,281	1,000
ФК+Дифередин	1,000	1,000	1,000	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	0,281	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	0,246	1,000	1,000	1,000	1,000	–
Примечание: –* – Различия для группы в строке статистически значимы по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)						

Анализ данных таблицы 49 показал наличие статистически значимых различий ($p=0,003$) между группами ФК и ФК+Карамифен – уровень показателя был ниже на 71% в сравнении с группой ФК (таблица 44).

Межгрупповая сравнительная оценка поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» самцов крыс через 7 суток после введения Фенилкарбамата и средств купирования судорожного синдрома (таблица 50) показала отсутствие значимых различий изучаемых показателей в исследуемых группах.

Таблица 50 – Сравнительная оценка поведенческих реакций самцов крыс в тесте «Открытое поле» через 7 суток после судорожного синдрома

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
1	2	3	4	5	6	7
Горизонтальные перемещения, число актов	ФК	14	25,0	11,0	35,0	0,322
	Контроль	13	36,0	30,0	42,0	
	ФК+Карамифен	8	23,0	14,0	38,0	
	ФК+Дифередин	8	20,0	12,0	33,0	
	ФК+Реланиум	7	41,0	13,0	49,0	
	ФК+АВК№3	8	30,0	18,5	35,5	
Груминг, число актов	ФК	14	19,5	13,0	24,0	0,643
	Контроль	13	20,0	13,0	30,0	
	ФК+Карамифен	8	20,0	16,5	27,5	
	ФК+Дифередин	8	23,5	14,5	31,0	
	ФК+Реланиум	7	27,0	19,0	38,0	
	ФК+АВК№3	8	22,0	12,5	26,0	
Вертикальные перемещения (стойки), число актов	ФК	14	12,5	6,0	24,0	0,249
	Контроль	13	24,0	14,0	31,0	
	ФК+Карамифен	8	19,5	12,0	22,0	
	ФК+Дифередин	8	9,0	7,5	13,5	
	ФК+Реланиум	7	16,0	10,0	31,0	
	ФК+АВК№3	8	11,0	1,5	23,5	
Среднее расстояние, пройденное животным, м	ФК	14	1,3	0,4	1,6	0,443
	Контроль	13	1,7	1,2	2,4	
	ФК+Карамифен	8	1,0	0,7	2,4	
	ФК+Дифередин	8	1,1	0,5	1,8	
	ФК+Реланиум	7	2,0	0,7	2,5	
	ФК+АВК№3	8	1,7	1,2	2,0	
Средняя скорость, развиваемая животным, см/с	ФК	14	1,1	1,3	0,3	0,458
	Контроль	13	1,4	2,0	0,6	
	ФК+Карамифен	8	0,7	2,0	0,6	
	ФК+Дифередин	8	0,8	1,5	0,5	
	ФК+Реланиум	7	1,7	2,1	0,6	
	ФК+АВК№3	8	1,5	1,7	1,0	
Общая двигательная активность, число актов	ФК	14	47,5	28,0	64,0	0,425
	Контроль	13	68,0	53,0	80,0	
	ФК+Карамифен	8	45,0	31,5	68,0	
	ФК+Дифередин	8	43,5	26,5	66,5	
	ФК+Реланиум	7	69,0	33,0	87,0	
	ФК+АВК№3	8	52,0	33,5	59,5	
Двигательная активность в центре площадки, число актов	ФК	14	2,0	1,0	3,0	0,219
	Контроль	13	6,0	4,0	10,0	
	ФК+Карамифен	8	4,0	1,5	7,0	
	ФК+Дифередин	8	5,0	1,0	7,5	
	ФК+Реланиум	7	8,0	3,0	13,0	
	ФК+АВК№3	8	3,5	2,0	7,0	

Продолжение таблицы 50

1	2	3	4	5	6	7
Двигательная активность на периферии площадки, число актов	ФК	14	44,5	27,0	61,0	0,424
	Контроль	13	60,0	48,0	68,0	
	ФК+Карамифен	8	42,5	31,0	60,0	
	ФК+Дифередин	8	36,5	26,5	55,5	
	ФК+Реланиум	7	58,0	29,0	74,0	
	ФК+АВК№3	8	46,0	32,0	51,0	
Примечание – ¹ – р-значение межгрупповых различий						

Межгрупповая сравнительная оценка поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» самцов крыс через 14 суток после введения Фенилкарбамата и средств купирования судорожного синдрома (таблица 51) с использованием Kruskal-Wallis ANOVA показала отсутствие значимых различий изучаемых показателей в исследуемых группах самцов крыс.

Таблица 51 – Сравнительная оценка поведенческих реакций самцов крыс в тесте «Открытое поле» через 14 суток после судорожного синдрома

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
1	2	3	4	5	6	7
Горизонтальные перемещения, число актов	ФК	8	20,5	10,5	27,0	0,214
	Контроль	9	29,0	23,0	31,0	
	ФК+Карамифен	7	26,0	9,0	28,0	
	ФК+Дифередин	8	29,0	24,5	56,0	
	ФК+Реланиум	7	44,0	25,0	64,0	
	ФК+АВК№3	8	38,0	19,0	45,5	
Груминг, число актов	ФК	8	15,5	13,5	22,0	0,799
	Контроль	9	22,0	15,0	30,0	
	ФК+Карамифен	7	20,0	8,0	33,0	
	ФК+Дифередин	8	25,5	15,0	29,5	
	ФК+Реланиум	7	21,0	16,0	33,0	
	ФК+АВК№3	8	23,5	16,5	29,0	
Вертикальные перемещения (стойки), число актов	ФК	8	12,5	8,5	21,0	0,333
	Контроль	9	11,0	5,0	24,0	
	ФК+Карамифен	7	14,0	5,0	30,0	
	ФК+Дифередин	8	26,5	14,0	43,5	
	ФК+Реланиум	7	14,0	9,0	22,0	
	ФК+АВК№3	8	18,5	11,5	22,0	
Среднее расстояние, пройденное животным, м	ФК	8	1,0	0,6	1,6	0,242
	Контроль	9	1,5	1,0	2,2	
	ФК+Карамифен	7	1,1	0,2	2,0	
	ФК+Дифередин	8	1,9	1,1	3,0	
	ФК+Реланиум	7	1,9	1,4	2,8	
	ФК+АВК№3	8	2,2	1,3	2,4	

Продолжение таблицы 51

1	2	3	4	5	6	7
Средняя скорость, развиваемая животным, см/с	ФК	8	0,9	1,3	0,5	0,230
	Контроль	9	1,2	1,8	0,8	
	ФК+Карамифен	7	0,9	1,7	0,2	
	ФК+Дифередин	8	1,5	2,5	0,9	
	ФК+Реланиум	7	1,6	2,3	1,2	
	ФК+АВК№3	8	1,8	2,0	1,1	
Общая двигательная активность, число актов	ФК	8	39,5	25,0	44,5	0,367
	Контроль	9	46,0	39,0	67,0	
	ФК+Карамифен	7	46,0	17,0	60,0	
	ФК+Дифередин	8	54,5	38,0	85,5	
	ФК+Реланиум	7	67,0	41,0	97,0	
	ФК+АВК№3	8	62,0	40,5	69,0	
Двигательная активность в центре площадки, число актов	ФК	8	6,5	0,5	10,5	0,457
	Контроль	9	3,0	1,0	6,0	
	ФК+Карамифен	7	3,0	0,0	14,0	
	ФК+Дифередин	8	10,0	1,5	18,0	
	ФК+Реланиум	7	12,0	6,0	16,0	
	ФК+АВК№3	8	4,5	2,5	7,5	
Двигательная активность на периферии площадки, число актов	ФК	8	30,0	25,0	37,0	0,328
	Контроль	9	44,0	38,0	61,0	
	ФК+Карамифен	7	39,0	17,0	47,0	
	ФК+Дифередин	8	48,5	33,0	67,5	
	ФК+Реланиум	7	56,0	34,0	81,0	
	ФК+АВК№3	8	57,0	38,5	62,0	
Примечание – 1 – р-значение межгрупповых различий						

Межгрупповая сравнительная оценка поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» самцов крыс через 21 сутки после введения Фенилкарбамата и средств купирования судорожного синдрома (таблица 52) с использованием Kruskal-Wallis ANOVA показала отсутствие значимых различий изучаемых показателей в исследуемых группах самцов.

Таблица 52 – Сравнительная оценка поведенческих реакций самцов крыс в тесте «Открытое поле» через 21 сутки после судорожного синдрома

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
1	2	3	4	5	6	7
Горизонтальные перемещения, число актов	ФК	8	26,0	10,5	35,5	0,183
	Контроль	9	15,0	7,0	20,0	
	ФК+Карамифен	7	19,0	10,0	20,0	
	ФК+Дифередин	8	37,5	23,5	51,5	
	ФК+Реланиум	7	26,0	12,0	49,0	
	ФК+АВК№3	8	31,0	14,5	42,0	

Продолжение таблицы 52

1	2	3	4	5	6	7
Груминг, число актов	ФК	8	22,0	18,0	34,5	0,067
	Контроль	9	18,0	12,0	23,0	
	ФК+Карамифен	7	18,0	6,0	27,0	
	ФК+Дифередин	8	33,0	27,0	36,5	
	ФК+Реланиум	7	20,0	13,0	34,0	
	ФК+АВК№3	8	20,0	13,5	29,5	
Вертикальные перемещения (стойки), число актов	ФК	8	10,5	9,0	22,0	0,293
	Контроль	9	13,0	10,0	15,0	
	ФК+Карамифен	7	9,0	7,0	21,0	
	ФК+Дифередин	8	25,5	17,5	32,0	
	ФК+Реланиум	7	13,0	7,0	31,0	
	ФК+АВК№3	8	22,5	2,5	42,0	
Среднее расстояние, пройденное животным, м	ФК	8	1,4	0,6	1,9	0,144
	Контроль	9	0,6	0,3	1,2	
	ФК+Карамифен	7	1,0	0,5	1,2	
	ФК+Дифередин	8	2,0	1,3	2,9	
	ФК+Реланиум	7	1,4	0,6	2,3	
	ФК+АВК№3	8	1,7	0,7	2,2	
Средняя скорость, развиваемая животным, см/с	ФК	8	1,2	1,6	0,4	0,255
	Контроль	9	0,6	1,0	0,4	
	ФК+Карамифен	7	0,8	1,0	0,3	
	ФК+Дифередин	8	1,7	2,2	1,1	
	ФК+Реланиум	7	1,2	1,9	0,5	
	ФК+АВК№3	8	1,4	1,9	0,5	
Общая двигательная активность, число актов	ФК	8	45,5	31,5	68,5	0,137
	Контроль	9	32,0	28,0	37,0	
	ФК+Карамифен	7	37,0	16,0	48,0	
	ФК+Дифередин	8	71,0	48,0	87,5	
	ФК+Реланиум	7	47,0	25,0	83,0	
	ФК+АВК№3	8	51,5	29,0	74,5	
Двигательная активность в центре площадки, число актов	ФК	8	9,0	1,5	15,0	0,054
	Контроль	9	1,0	0,0	2,0	
	ФК+Карамифен	7	2,0	0,0	7,0	
	ФК+Дифередин	8	11,5	3,0	20,0	
	ФК+Реланиум	7	6,0	1,0	7,0	
	ФК+АВК№3	8	7,0	3,0	12,0	
Двигательная активность на периферии площадки, число актов	ФК	8	38,5	28,0	53,5	0,181
	Контроль	9	31,0	28,0	34,0	
	ФК+Карамифен	7	33,0	16,0	41,0	
	ФК+Дифередин	8	54,5	46,0	70,0	
	ФК+Реланиум	7	41,0	21,0	76,0	
	ФК+АВК№3	8	46,5	26,0	58,5	
Примечание – 1 – р-значение межгрупповых различий						

Обобщая полученные результаты по влиянию зарегистрированных и перспективных средств фармакологического купирования судорожного синдрома, вызываемого Фенилкарбаматом можно заключить, что введение данного

обратимого ингибитора холинэстераз приводит к относительно кратковременному повышению двигательной активности по отдельным показателям в течение первых суток после введения в организм. Большая часть изученных средств не оказывала существенного влияния на двигательную активность ни в кратковременные, ни в долговременные сроки наблюдения. Исключение составил Кармифен, провоцирующий выраженное, даже по сравнению с животными, не находящимися под воздействием Фенилкарбамата, снижение ряда показателей двигательной активности в первые сутки после введения. Также наблюдалась незначимое, но абсолютно показательное снижение двигательной активности в группе с применением АВК №3. В дальнейшем на 7-21 сутки показатели в этих группах пришли к значениям контрольной группы, значимых изменений не регистрировалось. Полученные результаты позволяют предположить возможность защитного действия по отношению к функции ЦНС у Карамифена и АВК №3 за счет снижения ее активности.

4.5 Результаты изучения памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление»

Влияние известных и перспективных отобранных средств фармакологической коррекции судорог на память и обучаемость животных в условиях острой стрессорной ситуации оценивалось по результатам теста «Экстраполяционное избавление».

Тестирование проводили на нелинейных белых крысах – самцах на 1, 7, 14, 28 сутки после введения судорожного агента Фенилкарбамата и применения фармакологической терапии купирования судорожного синдрома. Животные были обучены трехкратным погружением в цилиндр до введения Фенилкарбамата и средств фармакотерапии, по результатам были распределены по группам.

Статистический анализ данных с использованием Kruskal-Wallis ANOVA не выявил значимых различий между всеми исследуемыми группами до введения Фенилкарбамата фоновые значения (таблица 53). Во всех исследуемых группах животные были одинаково обучены и статистически не различались по

латентному периоду подныривания (выхода из цилиндра), по количеству прыжков, совершаемых внутри цилиндра и латентному периоду начала прыжков, что говорит об адекватном ответе на стрессовую ситуацию и выходе из нее.

Таблица 53 – Сравнительная оценка показателей памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление» самцов крыс до введения ФК (Фон)

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
Латентный период, с	Контроль	8	8,0	5,0	18,5	0,501
	ФК	8	11,0	9,0	22,5	
	ФК+Карамифен	8	12,0	6,0	18,0	
	ФК+Дифередин	8	22,0	9,5	36,5	
	ФК+Реланиум	8	19,0	7,5	43,0	
	ФК+АВК№3	8	13,5	10,5	18,0	
Латентный период аверсивных движений, с	Контроль	8	0,0	0,0	1,5	0,510
	ФК	8	0,0	0,0	5,5	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	1,0	
	ФК+Дифередин	8	2,5	0,5	6,5	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	4,0	
	ФК+АВК№3	8	1,0	0,0	3,5	
Количество прыжков, число актов	Контроль	8	0,0	0,0	7,0	0,304
	ФК	8	0,0	0,0	2,0	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	0,5	
	ФК+Дифередин	8	5,0	1,0	16,0	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	21,0	
	ФК+АВК№3	8	2,0	0,0	8,0	
Примечание:– ¹ – p-значение межгрупповых различий						

Межгрупповая сравнительная оценка памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление» самцов крыс на следующий день после введения Фенилкарбамата и средств купирования судорожного синдрома (таблица 54) с использованием Kruskal-Wallis ANOVA показала наличие статистически значимых различий. Результаты попарного сравнения с применением непараметрического дисперсионного анализа приведены в таблицах 55 и 56.

Как видно из таблицы по показателю «латентный период подныривания» и соответственно выхода из стрессовой ситуации статистически значимых различий не выявлено, однако стоит отметить выраженную тенденцию нарушения памятного следа в группе ФК 86 секунд против 14 секунд в среднем во всех группах с терапией и контролем.

Таблица 56 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений (p-значения) количества прыжков самцов крыс на 1 сутки после введения Фенилкарбамата и средств фармакотерапии с использованием Dunn test

Группа	Контроль	ФК	ФК+ Карамифен	ФК+ Дифередин	ФК+ Реланиум	ФК+ АВК
Контроль	–	1,000	0,227	0,227	1,000	0,807
ФК	1,000	–	1,000	1,000	1,000	1,000
ФК+Карамифен	0,227	1,000	–	1,000	1,000	1,000
ФК+Дифередин	0,227	1,000	1,000	–	1,000	1,000
ФК+Реланиум	1,000	1,000	1,000	1,000	–	1,000
ФК+АВК№3	0,807	1,000	1,000	1,000	1,000	–

Примечание –* – Различия для группы в строке статистически значимы по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)

По показателям латентный период начала движений, и количество прыжков имеются статистически значимые различия в сторону увеличения также в группе ФК без лечения. Это позволяет предполагать, что у животных после судорожного синдрома без фармакологической коррекции нарушены процессы консолидации информации вследствие нейродегенеративных нарушений в ЦНС.

По результатам парного сравнения (таблицы 55 и 56) не выявлено статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами.

При анализе результатов с применением Kruskal-Wallis ANOVA не выявлено значимых различий между всеми исследуемыми группами через 7, 14 и 28 сутки после введения Фенилкарбамата и фармакологической терапии (таблицы 57-59). Однако стоит обратить внимание, что на 7, 14, 28 сутки фиксируется выраженная тенденция в нарушении со стороны воспроизведения памятного следа путем увеличения латентного периода подныривания в группе Фенилкарбамат без лечения в сравнении с группами с фармакотерапией и контрольной группой. Восстановление до фонового значения на всех временных точках не происходит.

Таблица 58 – Сравнительная оценка показателей памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление» самцов крыс через 14 суток

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
Латентный период, с	Контроль	8	23,5	9,0	52,0	0,521
	ФК	8	64,5	12,5	120,0	
	ФК+Карамифен	8	14,5	11,0	37,5	
	ФК+Дифередин	8	13,5	6,0	51,0	
	ФК+Реланиум	8	21,0	6,5	47,5	
	ФК+АВК№3	8	9,0	6,5	20,0	
Латентный период аверсивных движений, с	Контроль	8	0,0	0,0	0,0	0,953
	ФК	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Дифередин	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+АВК№3	8	0,0	0,0	0,0	
Количество прыжков, число актов	Контроль	8	0,0	0,0	0,0	0,953
	ФК	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Дифередин	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+АВК№3	8	0,0	0,0	0,0	
Примечание – ¹ – p-значение межгрупповых различий						

Таблица 59 – Сравнительная оценка показателей памяти и обучаемости в тесте «Экстраполяционное избавление» самцов крыс через 28 суток после введения Фенилкарбамата и средств фармакотерапии

Компоненты поведения	Группа	Значения переменной				p ¹
		N	Me	LQ	UQ	
Латентный период, с	Контроль	8	22,5	11,5	28,5	0,398
	ФК	8	81,5	9,5	120,0	
	ФК+Карамифен	8	12,5	6,0	21,5	
	ФК+Дифередин	8	14,0	7,5	38,5	
	ФК+Реланиум	8	12,0	4,5	17,5	
	ФК+АВК№3	8	12,5	6,0	20,5	
Латентный период аверсивных движений, с	Контроль	8	0,0	0,0	0,0	0,305
	ФК	8	0,0	0,0	27,0	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	9,5	
	ФК+Дифередин	8	0,0	0,0	4,5	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+АВК№3	8	0,0	0,0	4,0	
Количество прыжков, число актов	Контроль	8	0,0	0,0	0,0	0,484
	ФК	8	0,0	0,0	7,5	
	ФК+Карамифен	8	0,0	0,0	1,0	
	ФК+Дифередин	8	0,0	0,0	2,0	
	ФК+Реланиум	8	0,0	0,0	0,0	
	ФК+АВК№3	8	0,0	0,0	1,0	
Примечание – ¹ – p-значение межгрупповых различий						

Таким образом, по результатам исследования у животных после судорожного синдрома без фармакологической коррекции нарушены процессы консолидации информации, наблюдается выраженная тенденция нарушения памятного следа, применение изученных средств позволяет уменьшить ряд проявлений, однако достоверных различий на небольших выборках животных выявить не удалось.

4.6 Результаты изучения параметров электрокардиографии у крыс

Влияние известных и перспективных отобранных средств фармакологической коррекции судорог на функцию сердечно-сосудистой системы животных оценивалось по результатам проведенной электрокардиографии.

Тестирование проводили на нелинейных белых крысах – самцах на 1, 7, 14 сутки после введения судорожного агента Фенилкарбамата и применения фармакологической терапии купирования судорожного синдрома.

Результаты оценки влияния на параметры ЭКГ с использованием Mann-Whitney test и Kruskal-Wallis ANOVA свидетельствовали об отсутствии значимых различий изучаемых показателей между исследуемыми группами. Попарное сравнение групп с применением непараметрического Dunn test проводили только по параметрам, где были выявлены различия между всеми исследуемыми группами. Результаты представлены в таблицах 60 и 61.

Таблица 60 – Сравнительная оценка параметров ЭКГ самцов крыс после введения Фенилкарбамата и средств фармакотерапии на различных этапах исследования

Параметры ЭКГ	Группа	Значения переменной				р-уровень межгрупповых различий ¹
		N	Me	Min	Max	
1	2	3	4	5	6	7
1 сутки						
Высота зубца Р, мВ	Контроль	5	0,05	0,05	0,08	0,017*
	ФК	5	0,05	0,03	0,08	
	ФК+АВК №3	5	0,05	0,04	0,09	
	ФК+Кар.	5	0,03	0,02	0,04	
	ФК+Рел.	5	0,04	0,02	0,05	
Продолжительность интервала PQ, мс	Контроль	5	47,0	42,0	50,0	0,526
	ФК	5	49,0	42,0	50,0	
	ФК+АВК №3	5	50,0	46,0	54,0	
	ФК+Кар.	5	46,0	38,0	50,0	
	ФК+Рел.	5	50,0	42,0	50,0	
Продолжительность интервала QT, мс	Контроль	5	70,0	62,0	96,0	0,225
	ФК	5	82,0	68,0	92,0	
	ФК+АВК №3	5	85,0	76,0	90,0	
	ФК+Кар.	5	72,0	62,0	99,0	
	ФК+Рел.	5	86,0	75,0	96,0	
Высота зубца R, мВ	Контроль	5	0,48	0,44	0,68	0,283
	ФК	5	0,60	0,37	0,70	
	ФК+АВК №3	5	0,63	0,44	0,76	
	ФК+Кар.	5	0,45	0,30	0,45	
	ФК+Рел.	5	0,55	0,12	0,83	

Продолжение таблицы 60

1	2	3	4	5	6	7
ЧСС, уд/мин	Контроль	5	475,0	446,0	532,0	0,007*
	ФК	5	488,0	434,0	506,0	
	ФК+АВК №3	5	422,0	352,0	429,0	
	ФК+Кар.	5	501,0	479,0	511,0	
	ФК+Рел.	5	415,0	400,0	493,0	
7 сутки						
Высота зубца Р, мВ	Контроль	5	0,05	0,05	0,06	0,181
	ФК	5	0,05	0,03	0,07	
	ФК+АВК №3	5	0,04	0,03	0,08	
	ФК+Кар.	5	0,02	0,02	0,05	
	ФК+Рел.	5	0,05	0,03	0,06	
Продолжительность интервала PQ, мс	Контроль	5	46,0	40,0	46,0	0,408
	ФК	5	46,0	42,0	56,0	
	ФК+АВК №3	5	48,0	38,0	48,0	
	ФК+Кар.	5	47,0	42,0	51,0	
	ФК+Рел.	5	48,0	42,0	52,0	
Продолжительность интервала QT, мс	Контроль	5	68,0	61,0	82,0	0,151
	ФК	5	62,0	60,0	72,0	
	ФК+АВК №3	5	70,0	62,0	88,0	
	ФК+Кар.	5	69,0	65,0	92,0	
	ФК+Рел.	5	75,0	72,0	84,0	
Высота зубца R, мВ	Контроль	5	0,60	0,38	0,72	0,460
	ФК	5	0,48	0,37	0,71	
	ФК+АВК №3	5	0,48	0,34	0,52	
	ФК+Кар.	5	0,41	0,33	0,44	
	ФК+Рел.	5	0,47	0,27	0,81	
ЧСС, уд/мин	Контроль	5	497,0	448,0	511,0	0,040*
	ФК	5	531,0	511,0	548,0	
	ФК+АВК №3	5	475,0	466,0	513,0	
	ФК+Кар.	5	481,0	425,0	500,0	
	ФК+Рел.	5	516,0	432,0	527,0	
14 сутки						
Высота зубца Р, мВ	Контроль	5	0,03	0,03	0,05	0,665
	ФК	5	0,03	0,03	0,05	
	ФК+АВК №3	5	0,03	0,03	0,04	
	ФК+Кар.	5	0,04	0,03	0,05	
	ФК+Рел.	5	0,05	0,03	0,05	
Продолжительность интервала PQ, мс	Контроль	5	45,0	42,0	50,0	0,411
	ФК	5	46,0	44,0	50,0	
	ФК+АВК №3	5	42,0	40,0	50,0	
	ФК+Кар.	5	43,0	41,0	54,0	
	ФК+Рел.	5	43,5	38,0	45,0	

Продолжение таблицы 60

1	2	3	4	5	6	7
Продолжи- тельность интервала QT, мс	Контроль	5	86,0	64,0	98,0	0,122
	ФК	5	74,0	66,0	88,0	
	ФК+АВК №3	5	66,0	54,0	76,0	
	ФК+Кар.	5	70,0	61,0	88,0	
	ФК+Рел.	5	64,0	48,0	78,0	
Высота зубца R, мВ	Контроль	5	0,39	0,31	0,46	0,164
	ФК	5	0,23	0,17	0,34	
	ФК+АВК №3	5	0,36	0,27	0,56	
	ФК+Кар.	5	0,35	0,31	0,54	
	ФК+Рел.	5	0,38	0,31	0,86	
ЧСС, уд/мин	Контроль	5	501,0	457,0	514,0	0,016*
	ФК	5	488,0	476,0	513,0	
	ФК+АВК №3	5	545,0	498,0	572,0	
	ФК+Кар.	5	501,0	486,0	521,0	
	ФК+Рел.	4	524,5	521,0	551,0	
Примечания 1 ¹ – р-значение в Kruskal-Wallis ANOVA; 2 * – Различия между всеми группами статистически значимы (p<0,05)						

Таблица 61 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений зубца Р на первые сутки после судорожного синдрома и фармакологической терапии

Группа	Контроль	ФК	ФК+Рел.	ФК+ АВК №3	ФК+Кар.
Контроль	–	1,000	0,334	1,000	0,052*
ФК	1,000	–	1,000	1,000	0,678
ФК+Реланиум	0,334	1,000	–	0,587	1,000
ФК+ АВК №3	1,000	1,000	0,587	–	0,106
ФК+Кар.	0,052*	0,678	1,000	0,106	–
Примечание –* Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)					

В таблице 60 продемонстрировано, что по изменению высоты зубца Р при снятии ЭКГ на 1 сутки после судорожного синдрома были выявлены статистически значимые различия в сторону уменьшения в группе ФК+Кар ($p < 0,052$) в сравнении с контрольной группой. Такая конфигурация зубцов Р на электрокардиограмме может указывать на неспецифические метаболические нарушения на фоне дефицита микроэлементов или гормонального дисбаланса.

Продemonстрировано, что по показателю частоты сердечных сокращений при снятии электрокардиограммы на 1 сутки после судорожного синдрома выявляются статистически значимые различия в сторону уменьшения в группе ФК+АВК №3 ($p < 0,021$) в сравнении с ФК+Кар – уровень показателя у «метилпиперидинового эфира вальпроевой кислоты №3» был ниже на 16% по

медиане (таблица 62). Также наблюдалась статистически незначимая, но выраженная тенденция снижения ЧСС в группе ФК+АВК №3 в сравнении с контролем по медиане (422 против 475 сокращений в минуту).

Таблица 62 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений частоты сердечных сокращений на ЭКГ 1 сутки после судорожного синдрома и введения фармакологической терапии с использованием Dunn test

Группа	Контроль	ФК	ФК+Рел.	ФК+ АВК №3	ФК+Кар.
Контроль	–	1,000	0,481	0,088	1,000
ФК	1,000	–	1,000	0,241	1,000
ФК+Реланиум	0,481	1,000	–	1,000	0,152
ФК+ АВК №3	0,088	0,241	1,000	–	0,021*
ФК+Кар.	1,000	1,000	0,152	0,021*	–

Примечание –* Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)

Таблица 63 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений ЧСС на 7 сутки после судорожного синдрома и введения исследуемых фармакологической терапии с использованием Dunn test

Группа	Контроль	ФК	ФК+Рел.	ФК+ АВК №3	ФК+Кар.
Контроль	–	0,135	1,000	1,000	1,000
ФК	0,135	–	1,000	0,241	0,060*
ФК+Реланиум	1,000	1,000	–	1,000	1,000
ФК+ АВК №3	1,000	0,241	1,000	–	1,000
ФК+Кар.	1,000	0,060*	1,000	1,000	–

Примечание –* Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)

Согласно данным, представленным в таблице 60, по показателю частоты сердечных сокращений при снятии электрокардиограммы на 7 сутки после судорожного синдрома выявляются статистически значимые различия в сторону уменьшения в группе ФК+ АВК №3 ($p = < 0,060$) в сравнении с ФК без лечения – уровень показателя у «метилпиперидинового эфира вальпроевой кислоты №3» был ниже на 11 % по медиане (таблица 63). Также наблюдалась статистически незначимая, но выраженная тенденция снижения ЧСС в группе ФК+ Кар в сравнении с группой ФК по медиане (481 против 531 сокращений в минуту).

Таблица 64 – Квадратичная матрица парных множественных сравнений (р-значения) ЧСС на 14 сутки после судорожного синдрома и введения фармакологической терапии с использованием Dunn test

Группа	Контроль	ФК	ФК+Рел.	ФК+ АВК №3	ФК+Кар.
Контроль	–	1,000	0,346	0,301	1,000
ФК	1,000	–	0,134	0,108	1,000
ФК+Реланиум	0,346	0,134	–	1,000	0,403
ФК+ АВК №3	0,301	0,108	1,000	–	0,356
ФК+Кар.	1,000	1,000	0,403	0,356	–
Примечание –* Статистически значимые различия между группой, указанной в строке, и группой, указанной в соответствующем столбце ($p \leq 0,05$)					

В целом анализ данных показал, что введение АВК№3 и Карамифена снижает ЧСС у животных, подвергшихся воздействию Фенилкарбамаата в судорожной дозе, остальные показатели достоверно не изменяются.

4.7 Оценка влияния фармакологической коррекции на степень ингибирования АХЭ при отравлении Фенилкарбамаатом с проявлениями выраженного судорожного синдрома

Исследование выполнено на нелинейных крысах. Образцы крови и ткани головного мозга были забраны через 10, 30, 60 минут после возникновения судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбамаатом и с применением фармакологической коррекции. Время забора было выбрано исходя из времени купирования судорожного синдрома выбранными лекарственными веществами. Судороги у крыс уже отсутствовали в отличие от группы ФК без лечения.

В таблице 65 продемонстрированы результаты сравнения выраженности ингибирования активности АХЭ в составе цельной крови и головного мозга в зависимости от выраженности у крыс судорог, вызванных Фенилкарбамаатом, в условиях дополнительного введения средств фармакологической терапии. Выявлено отсутствие прямой взаимосвязи между активностью ингибирования ацетилхолинэстеразы на фоне введения крысам Фенилкарбамаата и выраженностью противосудорожной активности, вне зависимости от разновидности изученных средств терапии. В частности введение Карамифена сопровождалось прекращением судорог через 10 мин, однако уровень ингибиции АХЭ сохранялся на уровне, характерном для пика действия токсиканта.

Аналогичная картина наблюдалась и при оценке влияния аминоэфира вальпроевой кислоты на изученный показатель.

Таблица 65 – Изучение активности ацетилхолинэстеразы в крови и головном мозге крыс на фоне фармакологической коррекции судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом

Группа и время забора крови	% ингибирования АХЭ цельная кровь	% ингибирования АХЭ головной мозг	Число крыс в группе с судорогами > 4 уровня по шкале Racine(n/N)
Через 10 минут			
ФК	39,4	53,5	6/6
ФК+Карамифен	39,2	54,7	0/6
Через 30 минут			
ФК	37,5	22,8	6/6
ФК+ АВК№3	35,9	32,9	0/6
Через 60 минут			
ФК	32,5	34,2	5/6
ФК+ Диферидин	27,1	28,8	0/6

По результатам исследования можно заключить, что интоксикация обратимым ингибитором АХЭ, подавление активности данного фермента и соответствующее накопление АХ в синапсах клеток нервной системы ассоциировано с дебютными проявлениями судорожного синдрома. Затем в процесс вовлекаются патогенетические механизмы, не имеющие прямой взаимосвязи с активностью АХЭ, поддержания и рецидивирование судорожного синдрома обусловлено уже глутаматергической гиперактивностью, приводящей к эксайтотоксичности. Вследствие нарушений межмедиаторного баланса угнетается активность тормозной ГАМК-ергической системы. Подтверждением этой точки зрения является установленная нами высокая противосудорожная эффективность Карамифена и аминоэфира вальпроевой кислоты №3 при отравлении Фенилкарбаматом. Известно, что вальпроаты нормализуют нарушения процессов Na^+ и Ca^{2+} ионной проводимости, стимулируют ГАМК-ергическую медиацию [67]. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что при отравлениях необратимыми ингибиторами АХЭ (фосфорорганическими соединениями) вслед за начальной стадией стимуляции холинергической активности следует стадия, характеризующаяся устойчивой активацией глутаматергических рецепторов в

ЦНС (прежде всего NMDA-рецепторов). Многолетние клинические и экспериментальные наблюдения [24] свидетельствуют о том, что проявления перевозбуждения центральных и периферических холинергических систем в результате обратимого и необратимого угнетения АХЭ, помимо судорог, выражаются комплексом патологических эффектов в виде: гиперсекреции желез; угнетения ритма и проводимости сердца; спазма гладкой мускулатуры сосудов и внутренних органов; нарушения нервно-мышечной проводимости; бронхоспазма и отека лёгких. Безусловно, эти патологические процессы, связанные с антихолинэстеразным действием, необходимо учитывать при оценке токсического действия производных карбаминовой кислоты различного назначения.

4.8 Результаты изучения органа – мишени (головной мозг) с помощью гистологического исследования у крыс

Исследование выполнено на нелинейных крысах. Образцы ткани головного мозга были забраны через 1, 7, 14 суток после возникновения судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом и с применением фармакологической коррекции. Были исследованы: гиппокамп, 2-3 слой, 4-5 слой коры головного мозга крыс.

При проведении гистологического исследования головного мозга у животных в группе Фенилкабамат через 1 сутки после отравления цитоархитектоника коры больших полушарий головного мозга не нарушена, очагов выпадения нет. Сосуды мозговых оболочек умеренно полнокровные; кортикальные сосуды равномерного диаметра, содержат единичные эритроциты. Имеют место незначительные отклонения от нормы, особенно во 2-3 слоях коры головного мозга: выраженное расширение периваскулярных и перицеллюлярных пространств, появление темных и, в единичных наблюдениях, сморщенных нейронов (рисунки 35-36). Через 7-14 суток наблюдаются очаговые скопления темных, сморщенных нейронов (рисунки 37-40) или нейронов в состоянии острого набухания. В некоторых участках коры наблюдалось сочетание нейронов

как в состоянии острого набухания, так и темных сморщенных, причем в ядрах набухших нейронов имела место выраженная конденсация хроматина, возможно как начало процесса апоптоза. На этом фоне в некоторых участках наблюдалось резко выраженное разрежение нейропилия сопровождавшееся умеренным клеточным глиозом.

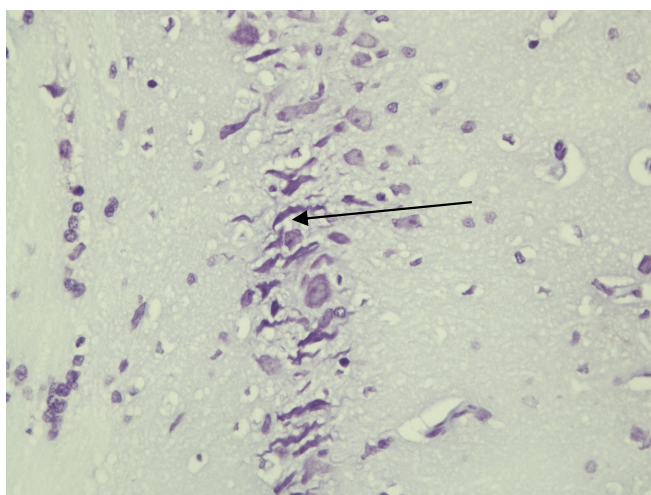


Рисунок 35 – Фенилкарбамат, 1 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Единичные сморщенные нейроны. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

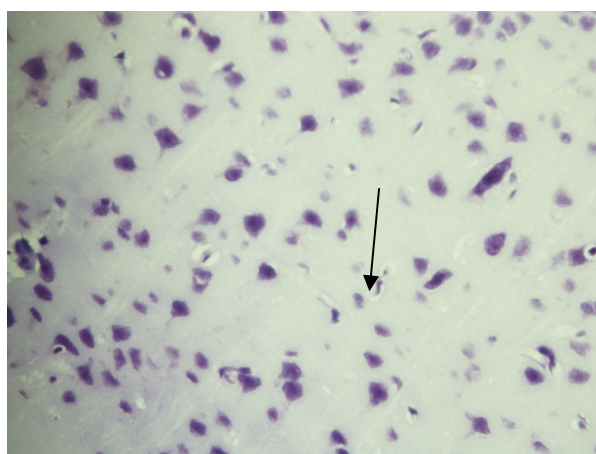


Рисунок 36 – Фенилкарбамат, 1 сутки. Головной мозг крысы, 2–3 слой коры. Появление единичных сморщенных, темных нейронов. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

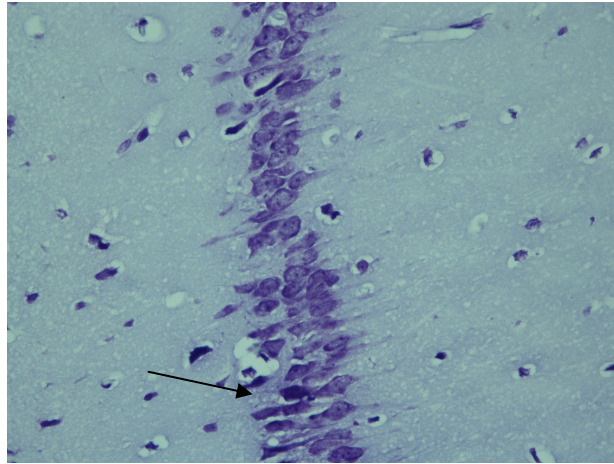


Рисунок 37 – Фенилкарбамат, 7 суток. Головной мозг крысы, гиппокамп.
Темные сморщенные нейроны. Окраска по методу Ниссля. Ув.400

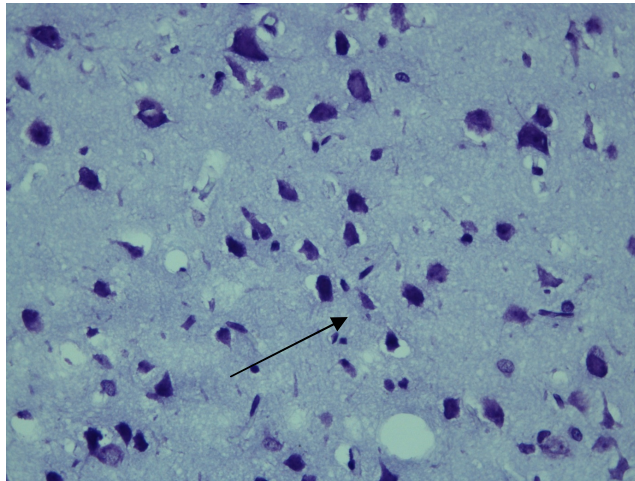


Рисунок 38 – Фенилкарбамат, 7 суток. Головной мозг крысы, 4–5 слой коры.
Большинство сморщенных, темных нейронов. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

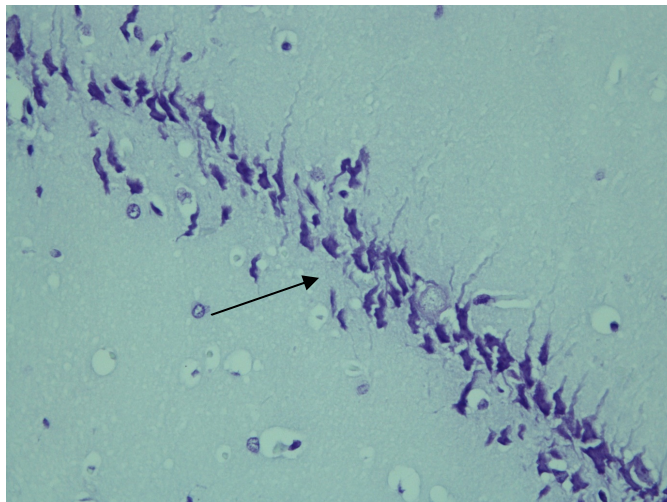


Рисунок 39 – Фенилкарбамат, 14 суток. Головной мозг крысы, гиппокамп.
Темные сморщенные нейроны. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

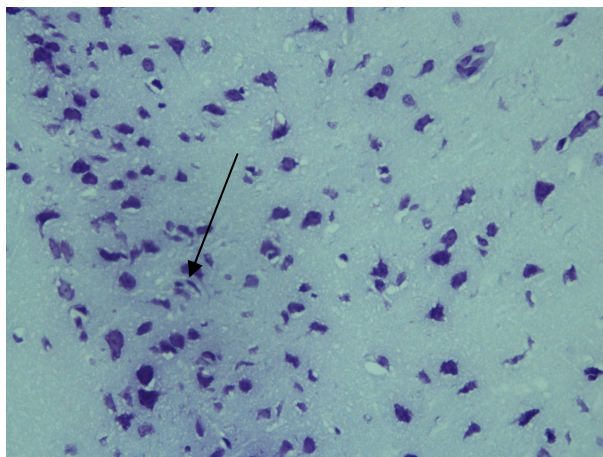


Рисунок 40 – Фенилкарбамат, 14 суток. Головной мозг крысы, 2–3 слой коры.
 Большинство сморщенных, темных нейронов
 Окраска по методу Ниссля. Увеличение 400

На рисунках 41-46 представлены гистологические препараты головного мозга животных, получивших Карамифен в качестве фармакологической терапии через 1,7,14 суток.

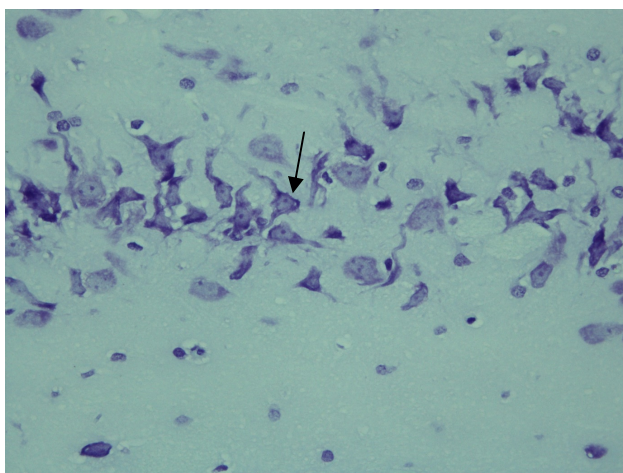


Рисунок 41 – ФК+Карамифен, 1 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп.
 Большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены. Окраска по методу
 Ниссля. Ув. 400

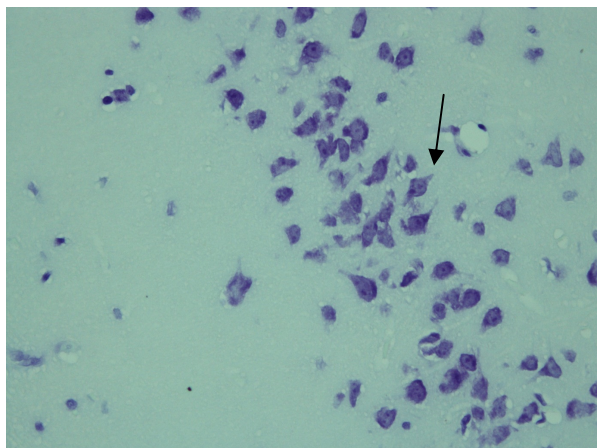


Рисунок 42 – ФК+Карамифен, 1 сутки. Головной мозг крысы, 2–3 слой коры. Некоторые периваскулярные и перичеселлюлярные пространства расширены. Большинство нейронов не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув.400

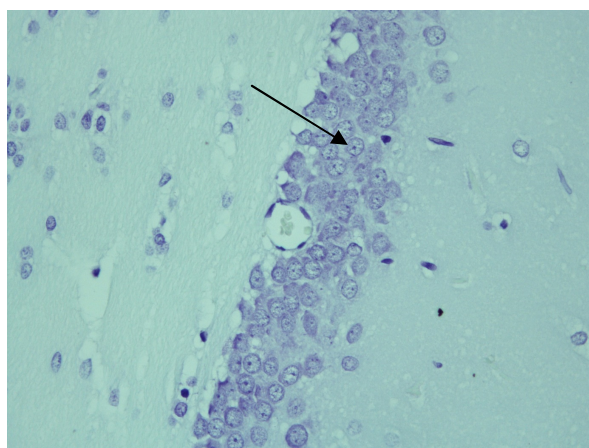


Рисунок 43 – ФК+Карамифен, 7 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Нейроны коры и ядра гиппокампа не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

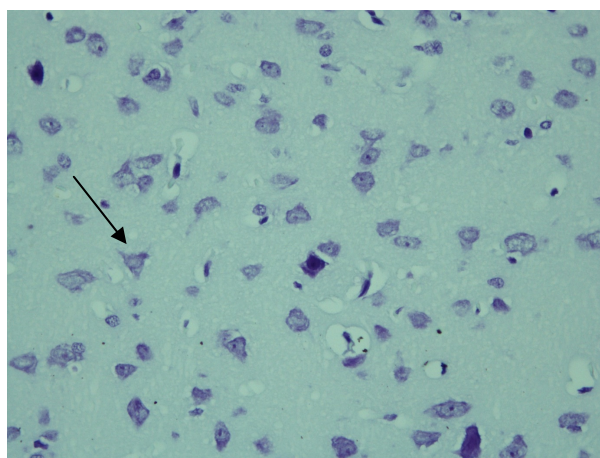


Рисунок 44 – ФК+Карамифен, 7 сутки. Головной мозг крысы, 4–5 слой коры. Нейроны коры не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

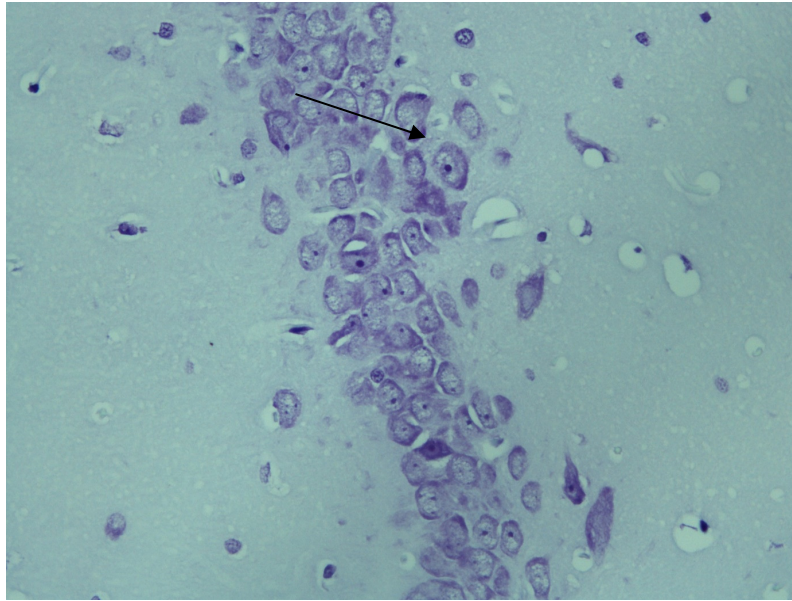


Рисунок 45 – ФК+Карамифен, 14 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Нейроны коры и ядер гиппокампа не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

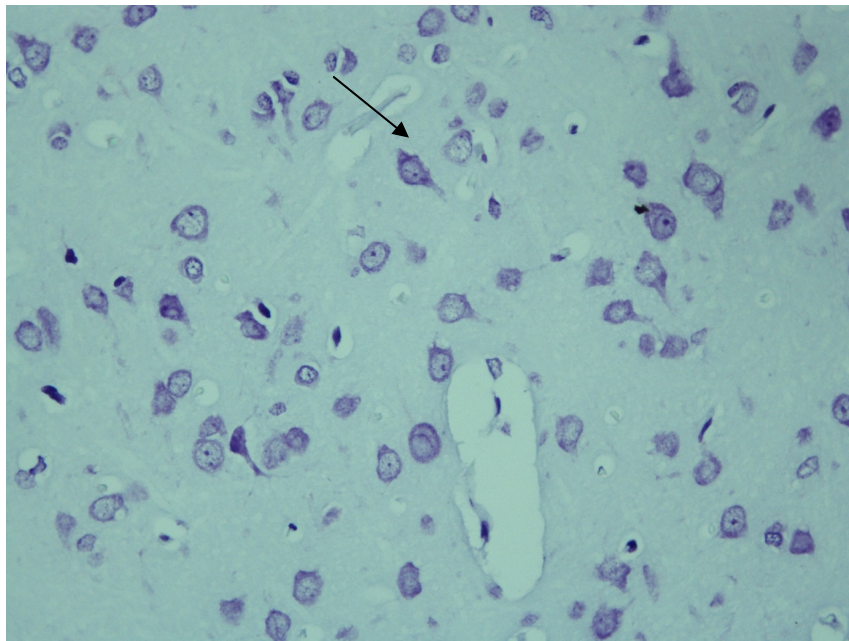


Рисунок 46 – ФК+Карамифен, 14 сутки. Головной мозг крысы, 2–3 слой коры. Нейроны коры не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

На рисунках 47-50 представлены гистологические препараты головного мозга животных, получивших АВК№3 через 1, 7 сутки.

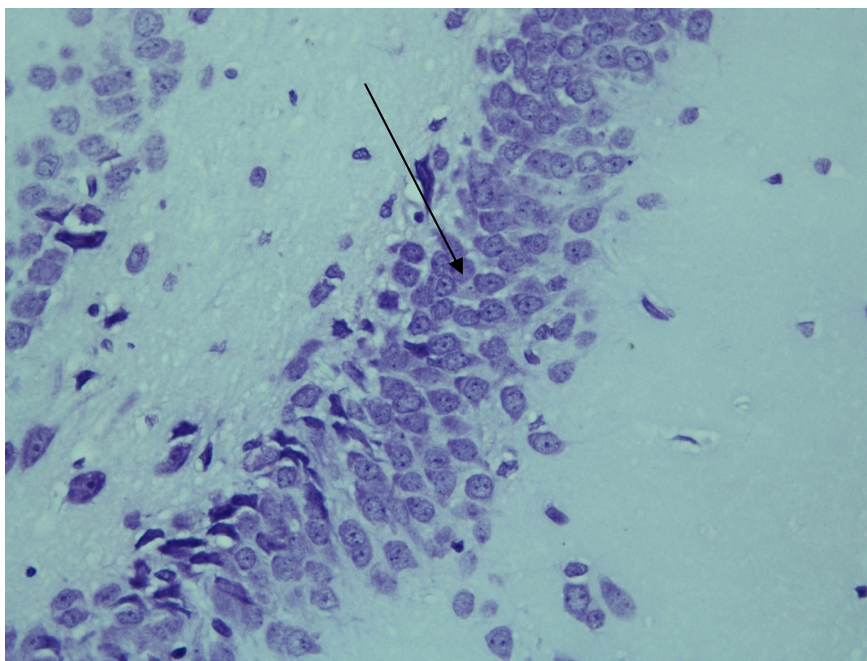


Рисунок 47 – ФК+ АВК№3, 1 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

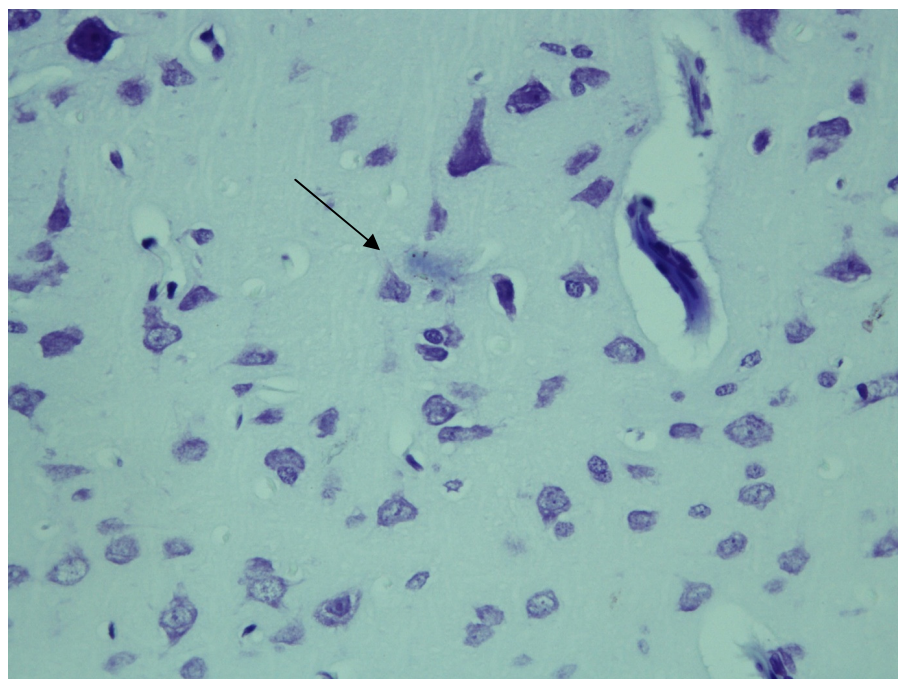


Рисунок 48 – ФК+ АВК№3, 1 сутки. Головной мозг крысы, 4–5 слой коры. Незначительное изменение нейронов. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

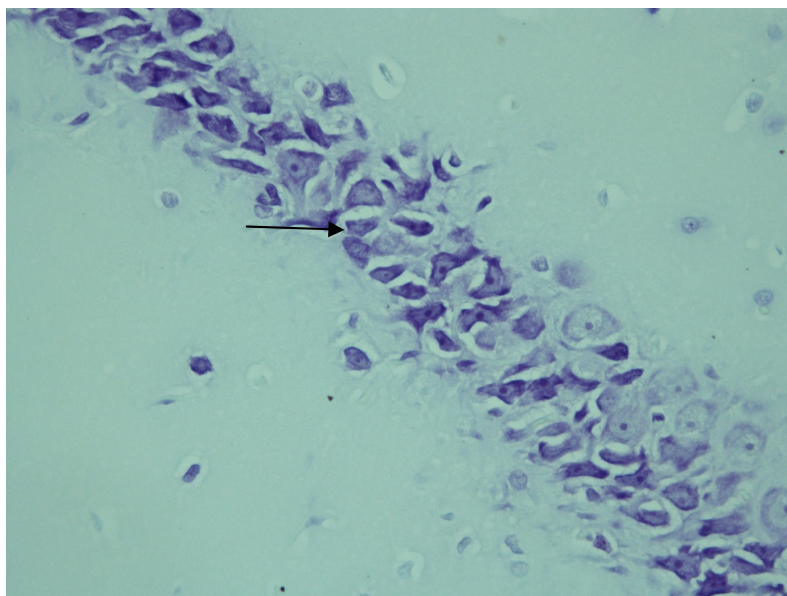


Рисунок 49 – ФК+ АВК№3, 7 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

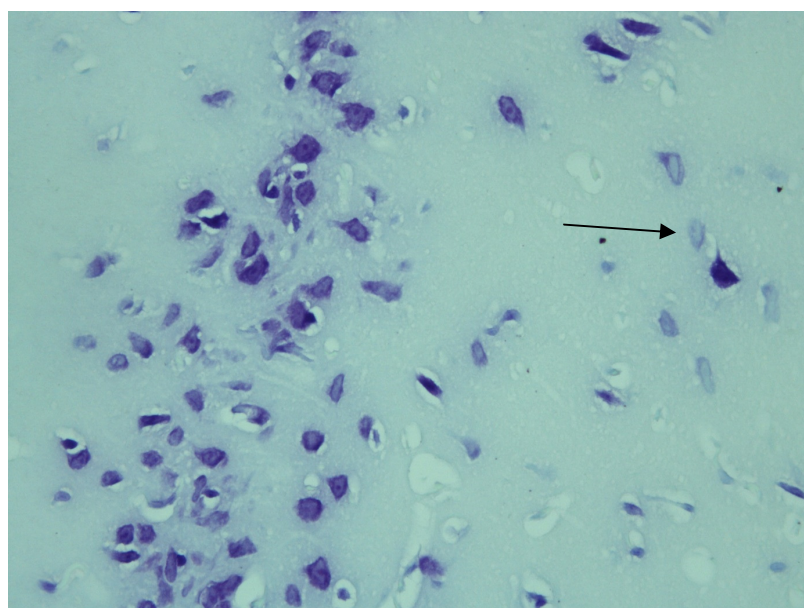


Рисунок 50 – ФК+ АВК№3, 7 сутки. Головной мозг крысы, 2–3 слой коры. Незначительное изменение нейронов. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

На рисунках 51 и 52 представлены гистологические препараты головного мозга животных, получивших АВК№3 в качестве фармакологической терапии через 14 суток.

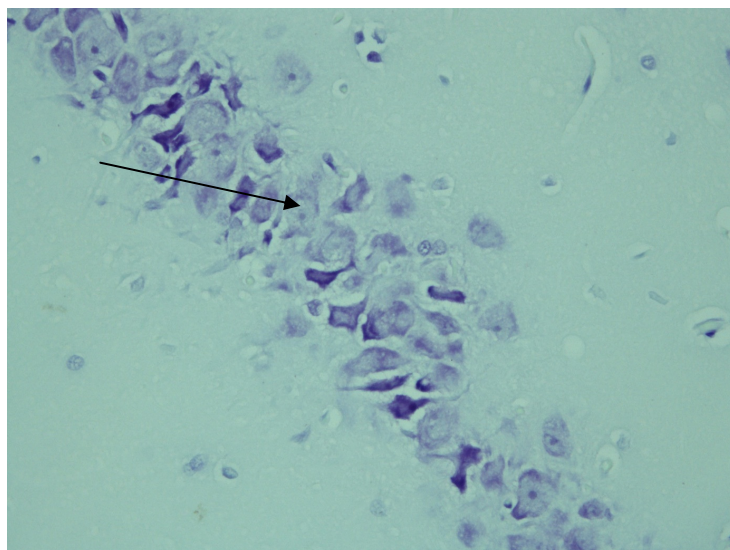


Рисунок 51 – ФК+ АВК№3, 14 сутки. Головной мозг крысы, гиппокамп. Большинство нейронов коры и ядер гиппокампа не изменены. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

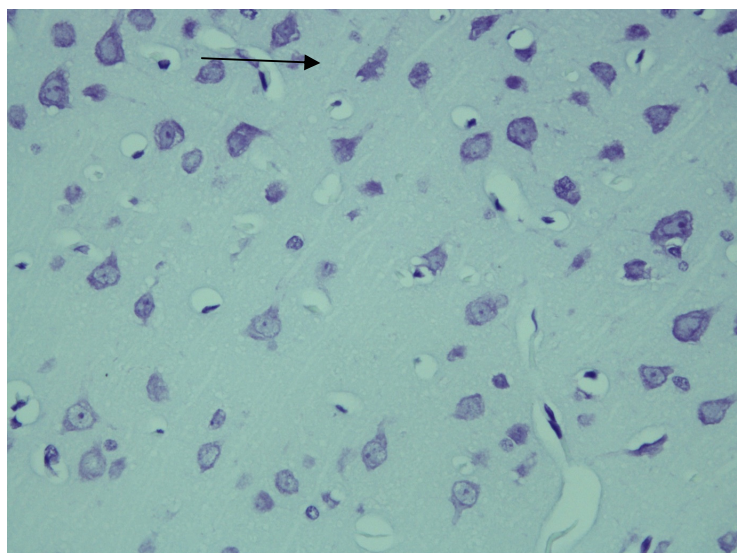


Рисунок 52 – ФК+ АВК№3, 14 сутки. Головной мозг крысы, 4–5 слой коры. Незначительное изменение нейронов. Окраска по методу Ниссля. Ув. 400

Во всех группах, подвергшихся интоксикации Фенилкарбаматом, выявлены органические изменения, указывающие на наличие нейродегенеративных процессов. Часть наблюдаемых изменений являются обратимыми, в том числе острое набухание клеток, но наличествуют и необратимые изменения, включая сморщивание и гибель нейронов. Также стоит отметить явления нейрофагии –

процесса, в ходе которого глиоциты или лейкоциты проникают в поврежденную нервную клетку и поглощают её.

Значительные изменения были зафиксированы в гиппокампе – самой чувствительной к неблагоприятным воздействиям области мозга.

Наиболее выраженный нейропротективный эффект у крыс, подвергшихся воздействию нейротоксиканта, наблюдался на фоне фармакологической терапии карамифеном в дозе 50 мг/кг, который проявил наиболее эффективное противосудорожное действие. При применении Карамифена было отмечено снижение количества необратимых изменений в нейронах, а также наблюдалось восстановление нормального состояния у подвергшихся обратимым изменениям клеток. На седьмые и четырнадцатые сутки было зафиксировано увеличение числа неизменённых нейронов. Кроме того, на четырнадцатые сутки было отмечено наименьшее количество клеток-теней.

Обобщая результаты данной главы можно заключить, что как минимум два соединения, не входящие в перечень зарегистрированных антидотов и медикаментозных средств лечения судорожного синдрома при отравлении ингибиторами холинэстераз, демонстрируют ряд преимуществ. В частности, выявлено как эффективное купирование судорог, так и отдельные проявления защитных свойств по отношению к нехолинергическим проявлениям нейровоспаления и апоптоза, приводящим к развитию неврологических нарушений в отдаленной перспективе при введении оригинального аминоэфирва вальпроевой кислоты (ABK№3), а также Карамифена. Это обосновывает перспективность дальнейшей разработки новых, более эффективных средств лечения острой интоксикации ингибиторами холинэстераз на основе данных соединений и их аналогов.

ГЛАВА 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ФОРМИРУЮЩИХСЯ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ФЕНИЛКАРБАМАТОМ

5.1 Оценка влияния средств фармакологической терапии на двигательную и исследовательскую активность белых крыс

Проведена сравнительная оценка влияния известных лекарственных препаратов, обладающих ноотропным, нейропротективным действием, таких как Мемантин, Мексидол, Ноопепт, Циклодол на поведение и двигательную активность животных после судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом, оценивалось по результатам теста «Открытое поле».

Тестирование проводили на нелинейных белых крысах-самцах на 1 и 2 сутки после наступления судорожного синдрома. Животным внутрежелудочно, на протяжении недели вводили Мемантин, Мексидол, Циклодол и Ноопепт (в дозах 54, 122, 47 и 25,7 мг/кг соответственно).

Через 24 часа у крыс наблюдалось статистически значимое угнетение параметров двигательной активности по комплексу показателей по сравнению с контрольной группой. Введение Ноопепта и Мексидола не оказало терапевтического эффекта на двигательную активность экспериментальных животных. В то же время под влиянием Мемантина практически полностью устранялись последствия отравления судорожной дозой Фенилкарбамата (за исключением количества актов груминга). Циклодол также полностью нормализовал показатели двигательной и исследовательской активности.

Через 48 часов после введения судорожной дозы Фенилкарбамата у экспериментальных животных практически полностью исчезали нарушения поведения, за исключением стойкого снижения количества актов двигательной активности на периферии. Введение Ноопепта, Мексидола и Мемантина полностью устраняло данное последствие отравления.

Таблица 66 – Влияние Фенилкарбамата и средств фармакологической коррекции на показатели двигательной активности в тесте «Открытое поле»

Экспериментальная группа	Горизонт. перемещ.	Верт. перемещ.	Груминг	Сред. расст.	Сред. скорость	ОДА	ДА в центре	ДА на периф.
Контроль (n=6)	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, 24 часа (n=5)	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*
Ф+ Ноопепт 24 часа (n=5)	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 24 часа (n=5)	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 24 часа (n=5)	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 24 часа (n=6)	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^
ФК 48 часов (n=6)	55.83±7.01	33.33±3.99	32.33±5.19	3.07±0.35	2.56±0.29	89.17±10.57	13.67±5.28	75.50±7.21*
ФК+Ноопепт 48 часов (n=5)	61.00±22.71	31.40±7.12	44.00±20.37	3.38±1.18	2.81±0.98	92.40±29.09	15.80±6.54	76.60±23.01
ФК+ Мексидол 48 часов (n=6)	51.83±15.36	33.17±9.29	27.67±9.19	2.70±0.76	2.24±0.63	85.00±24.53	17.83±8.36	67.17±16.57
ФК+ Мемантин 48 часов (n=6)	69.67±17.45	40.83±9.54	39.83±9.91	3.92±0.93	3.24±0.77	110.50±26.59	22.33±7.84	88.17±19.94
ФК+ Циклодол 48 часов (n=6)	49.50±8.95	29.67±3.92*	17.50±2.43*	2.39±0.49*	1.97±0.40*	79.17±12.84*	7.83±2.10	71.33±10.97*
Примечания 1* – Статистически-значимые различия с контролем (P<0.05) 2^ – Статистически-значимые различия с группой животных без фарм. коррекции (P<0.05)								

Таким образом, результаты экспериментального изучения осложнений, формирующихся после острой интоксикации ингибитором холинэстераз, в виде нарушений двигательной и исследовательской активности, продемонстрировали различие в эффективности использованных лекарственных препаратов при отравлении ингибитором ацетилхолинэстеразы из группы карбаматов наибольший нормализующий эффект проявили препараты нейромедиаторного

действия – Циклодол и Мемантин. Циклодол был наиболее эффективен в течение 24 часов, но к 48 часам эффективность снижалась, а действие Мемантина сохранялось дольше (таблица 66).

5.2 Оценка когнитивных функций у экспериментальных животных при профилактике последствий острой интоксикации карбаматом

Влияние известных лекарственных препаратов, обладающих ноотропным, нейропротективным действием, таких как Мемантин, Мексидол, Ноопепт, Циклодол на память животных после судорожного синдрома, вызванного Фенилкарбаматом, оценивалось по результатам теста условной реакции пассивного избегания болевого раздражителя (УРПИ). Тестирование проводили на нелинейных белых крысах – самцах после курсового применения лекарственных препаратов (Мемантин, Мексидол, Ноопепт, Циклодол), которые вводили внутривенно после окончания судорожного синдрома. Проведение эксперимента осуществлялось по следующей схеме, изображенной на рисунке 53.

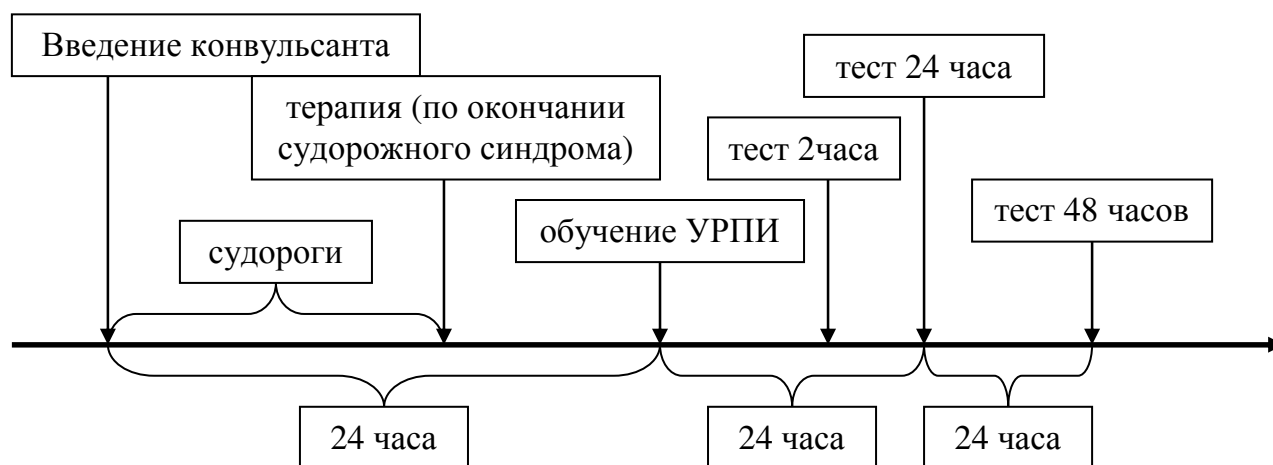


Рисунок 53 – Схема эксперимента по изучению влияния конвульсантов и средств фармакологической коррекции на выработку и сохранение УРПИ

Таблица 67 – Влияние терапии на выполнение УРПИ после введения судорожной дозы Фенилкарбамата

Экспериментальная группа	Латентный период 1 захода, сек	2 часа			24 часа			48 часа		
		ЛП, сек	Время нахождения в светлой камере, сек	Время нахождения в темной камере, сек	ЛП, сек	Время нахождения в светлой камере, сек	Время нахождения в темной камере, сек	Латентный период, сек	Время нахождения в светлой камере, сек	Время нахождения в темной камере, сек
Контроль (n=6)	12.0±3.4	93.7±22.1	98.5±22.0	21.5±22.0	89.2±23.1	90.3±22.5	29.7±22.5	79.7±23.5	94.3±17.2	28.8±15.4
ФК (n=6)	49.0±18.41*	120.0±0.0	120.0±0.0	0.0±0.0	70.8±24.4	106.2±10.7	13.8±10.7	50.0±21.5	66.7±23.7	44.8±27.5
ФК + Ноопепт (n=6)	17.0±3.9	92.3±19.0	93.3±19.0	26.7±19.0	67.7±24.5	72.2±23.0	47.8±23.0	62.0±28.3	65.5±25.9	79.8±6.97*
ФК + Мексидол (n=6)	34.8±14.6	87.3±23.4	99.2±19.0	20.8±19.0	92.7±22.2	92.7±22.2	27.3±22.2	70.3±26.1	70.3±26.1	105.6±6.3^*
ФК + Мемантин (n=6)	12.7±3.5^	100.5±23.4	100.5±23.4	19.5±23.4	95.7±22.9	99.8±23.5	20.2±23.5	100.7±23.2	100.7±23.2	44.6±23.29
ФК + Циклодол (n=6)	27.8±20.0	100.3±0.0	100.3±0.0	19.7±0.0	89.0±9.1	97.8±2.0	22.2±2.0	65.5±27.4	66.0±27.1	21.4±21.40
Примечания 1* – Статистически-значимые различия с контролем (P<0.05) 2^ – Статистически-значимые различия с группой животных без фарм. коррекции (P<0.05)										

У животных, получивших Фенилкарбамат в судорожной дозе, наблюдалось увеличение времени первого захода в темный отсек до обучения, что говорит о возможном анксиолитическом эффекте. Помимо этого, других статистически значимых различий с контрольной группой не наблюдалось. Через 48 часов в тесте УРПИ количество обученных животных составляло 33% в группе без фармакологической коррекции. На фоне применения Мемантина данный показатель улучшался до 88%. При применении Ноопепта или Мексидола, не отмечалось улучшения показателей в тесте УРПИ и даже зафиксировано увеличение времени пребывания в тёмной камере, что также может быть ассоциировано с повышением тревожности у животных (таблица 67).

Поскольку обучение и тестирование УРПИ осуществлялось через несколько часов после введения судорожных агентов, можно предположить, что нарушение процессов введения информации в головной мозг могло повлиять на ухудшение памяти у животных.

Введение Мемантина и Циклодола показало выраженный нормализующий эффект на состояние когнитивных функций, у крыс, подвергшихся воздействию судорожных агентов.

5.3 Патоморфологическая и гистологическая оценка состояния ЦНС экспериментальных животных (крыс) после фармакотерапии последствий отравления Фенилкарбаматом

Было проведено гистологическое исследование образцов тканей головного мозга у животных, получивших конвульсант Фенилкарбамат в дозе 1 мг/кг и последующую ежедневную в течение 7 дней фармакотерапию. Забор биоматериала был проведен через 24, 48, 72, 96 часов, 5 и 7 суток после введения ксенобиотика.

Курсовое ведение изученных средств фармакологической терапии проявляло защитный эффект по отношению к морфологическим нарушениям в поздние сроки после интоксикации. На 4 и 5 сутки после судорожного синдрома, вызванного ФК и при последующем введении Ноопепта и Мексидола, отмечалось

сохранение большинства нейронов в коре головного мозга, только единичные нервные клетки были тёмные и сморщенные или находились в состоянии набухания (рисунки 54, 55, 56). В меньшей степени в эти сроки проявлялся защитный эффект Мемантина и Циклодола.

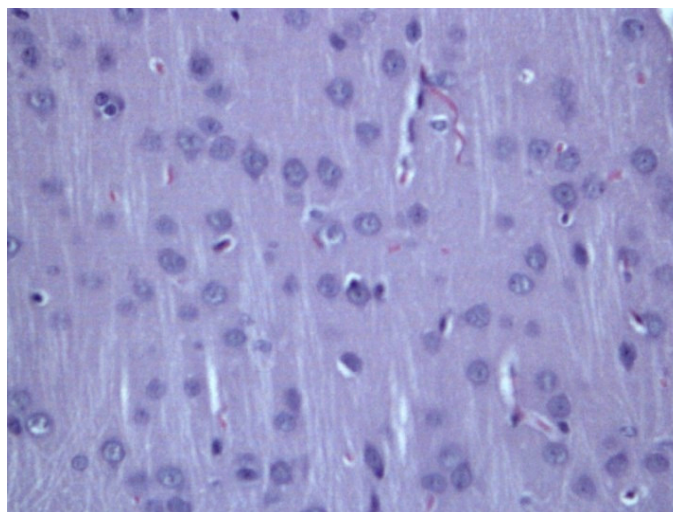


Рисунок 54 – Мексидол, 96 часов. Кора головного мозга. Большинство нейронов не изменены, только единичные – в состоянии острого набухания. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

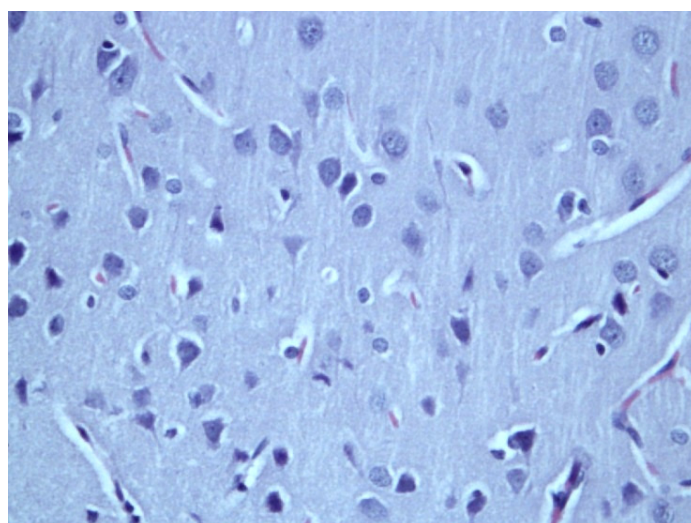


Рисунок 55 – Ноопепт, 5 суток. Кора головного мозга. Периваскулярные пространства расширены. Большинство нейронов не изменены, только единичные – в состоянии острого набухания. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

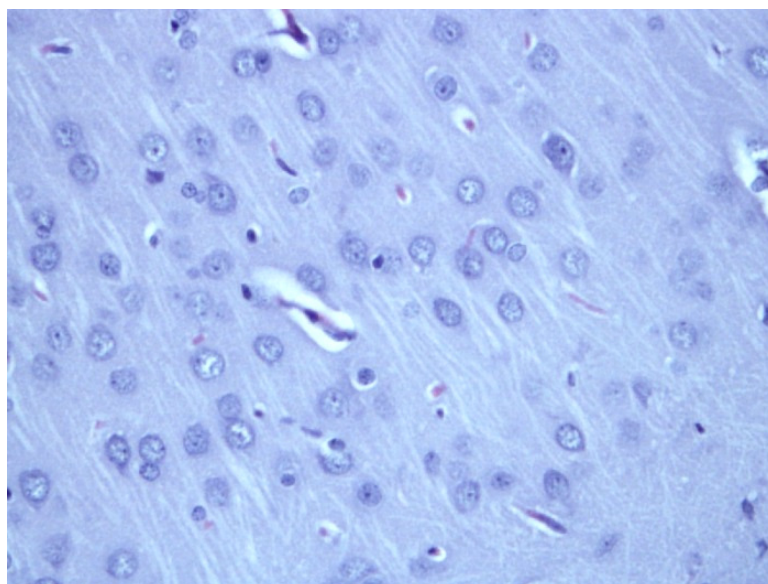


Рисунок 56 – Ноопепт, 5 сутки. Кора головного мозга. Периваскулярные пространства несколько расширены. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 400

Токсикант нейромедиаторного действия – обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы Фенилкарбамат преимущественно воздействуют на нейроны коры головного мозга, приводя к их повреждению и возможной гибели. Было показано, что ежедневное введение изученных нами средств фармакологической коррекции в разные сроки после интоксикации приводило к защитному эффекту, выражавшемуся в сохранении нейрональной структуры.

Обобщая результаты данной главы можно заключить что, при оценке влияния на поведение животных в эксперименте, наибольшую перспективность в качестве средств профилактики неврологических нарушений после интоксикации карбаматом продемонстрировали Мемантин и Циклодол, однако результаты гистологического исследования свидетельствуют о более выраженных протективных свойствах Ноопепта и Мексидола. Причины данного феномена подлежат дальнейшему выяснению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы. В настоящем исследовании экспериментально установлено и подтверждено, что введение токсиканта из группы карбаматов (фенилового эфира карбаминовой кислоты: гидрохлорида замещенного 2[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбамата, ($C_7H_7O_2N$) – Фенилкарбамата, являющегося обратимым ингибитором холинэстераз, в виде водного раствора в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно мелким лабораторным животным (крысам) приводит к развитию генерализованного судорожного синдрома (4-6 уровня по модифицированной шкале Racine), сопоставимого с проявлениями эпилептического статуса 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.

Из данных научной литературы известно, что ныне разработка противосудорожных средств для внедрения в клиническую практику, как правило, ведется с использованием экспериментальных моделей на основе максимального электрошока или введения коразола, и предназначена для медикаментозного лечения хронической эпилепсии [115]. При разработке средств терапии интоксикации именно ингибиторами холинэстераз используются модельные токсиканты на основе ФОС (зоман, газы VX, диазинон, хлорфенвинфос и дихлофос) [120]. Однако совершенно очевидно, что разработка и использование моделей на основе боевых ФОС не только предъявляет очень высокие требования к условиям экспериментов, значительно завышая их себестоимость, но и просто невозможна в большинстве гражданских учреждений стран, ратифицировавших Конвенцию о запрете на производство и хранение химического оружия.

Применяющийся в ряде экспериментов в качестве модельного токсиканта диизопропилфторфосфат формально не относится к БОВ, но обладает почти идентичным нейротоксическим действием и сам по себе считается агентом,

представляющим реальную угрозу, вследствие чего малодоступен для большинства исследователей [64]. Модели на основе дихлофоса [101] более доступны, однако не отменяют повышенных требований к организации работ, что неудобно при проведении скрининга панелей перспективных средств для терапии судорожного синдрома при отравлении ингибиторами холинэстераз. Отдельные научные группы пытаются найти сходство в эффектах, вызываемых различными токсикантами и даже утверждают, что литий-пилокарпиновая модель применима для анализа молекулярных механизмов повреждения нейронов и скрининга эффективных нейропротекторов при воздействии холинергических агонистов нервно-паралитического действия (включая БОВ Зоман) [128, 149], однако в целом количество сравнительных тестов эффективности различных моделей, представленных в научной литературе, невелико. Согласно полученным результатам сравнительного исследования Фенилкарбамата с другими модельными токсикантами, основные характеристики судорожного синдрома (длительность, выраженность, летальность) при введении Фенилкарбамата вполне сопоставимы с широко применяемыми моделями на основе коразола, при этом в значительно большей степени подходят для тестирования средств лечения острых интоксикаций ингибиторами холинэстераз. В любом случае, поскольку ни одна экспериментальная модель не может воспроизвести все разнообразные этиологии и клинические проявления судорожного синдрома у человека [61], разработка новой, легко воспроизводимой экспериментальной модели судорожного синдрома сама по себе является важным достижением в области токсикологии. Особую актуальность разработке придает прогрессирующее увеличение количества тяжелых последствий интоксикации именно карбаматами: согласно данным ВОЗ по 2019 году, только в результате преднамеренного суицида с применением карбаматов в мире умерло более 1600 человек, количество несмертельных отравлений составляет от нескольких сотен тысяч до нескольких миллионов в год по статистике разных стран [118].

К числу особенностей разработанной модели на основе Фенилкарбамата можно отнести и выявленные совпадения при сравнении с моделями на основе ФОС, например влияние на частоту сердечных сокращений [55,128,149,157].

Установленные изменения биохимических показателей (АЛТ, билирубин, холестерин, триглицериды и прочие) также отчасти совпадают с литературными данными: ранее предлагалось использовать АСТ и АЛТ в качестве альтернативных маркеров отравлений карбаматами и ФОС у человека [143]. Опубликовано сообщение о том, что в качестве маркера нейротоксичности перспективна оценка свободного билирубина [21]. Так или иначе, выявленные изменения через 14 дней после воздействия Фенилкарбамата, свидетельствуют о нарушении синтетических функций печени и активности ферментов, изменениях липидного профиля, что может быть использовано как дополнительные критерии оценки эффективности перспективных средств терапии судорожного синдрома и профилактики осложнений. Повышение концентрации мочевины в крови также может быть связано и с нарушениями функции печени, и с повреждением мышечных тканей, кроме того, в процессе массивного распада белка (источник мочевины) образуется токсичный аммиак, что может быть дополнительной причиной развития неврологических нарушений.

Особенно важной представляется динамика изученных при разработке экспериментальной модели биохимических показателей: через 48 часов после острой интоксикации по-прежнему часть из них была изменена, хотя прямое действие токсиканта на мишень уже прекратилось. Полученные данные подтверждают теорию о том, что, помимо прямого ингибирующего эффекта на холинэстеразы, приводящего к развитию холинергического кризиса, интоксикация обратимыми ингибиторами холинэстераз приводит к обменным нарушениям, поражению многих органов и систем, помимо ЦНС. Продемонстрировано, что даже субсудорожная доза Фенилкарбамата приводит к возникновению нарушений в структуре тканей мозга, а повреждение тканей при введении судорожной дозы наблюдается как минимум в течение 120 часов. Результаты оценки количества TUNEL-положительных клеток, являющихся

маркерами активности апоптоза тканей [146], также свидетельствует о наличии органического поражения головного мозга у крыс с развитием отдаленных неврологических нарушений при моделировании генерализованного судорожного синдрома с использованием Фенилкарбамата.

Результаты исследований, проведенных с целью изучения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы, подтвердили гипотезу о существовании комплекса механизмов, которые могут привести к развитию судорог и неврологических нарушений в отдаленной перспективе после отравления карбаматами.

В частности, было обнаружено достоверное изменение уровня малонового диальдегида, который образуется в процессе перекисного окисления липидов и связан с изменениями липидограммы [7]. Это подтверждает результаты нашего исследования, которое также выявило изменения уровней триглицеридов и холестерина. Примечательно, что отклонения от контрольных показателей сохранялись до 14 дня наблюдений. Сначала уровни малонового диальдегида были ниже контрольных значений, а затем – выше. Изменение содержания восстановленного глутатиона, который обладает выраженными антиоксидантными свойствами, и глутатионпероксидазы, которая защищает организм от окислительного повреждения, подтверждает нарушения функции печени, сердечно-сосудистой системы и развитие воспалительной реакции на фоне отравления карбаматами. Это, в свою очередь, активирует антиоксидантные механизмы.

К числу относительных недостатков разработанной модели можно отнести тот факт, что, при сходности характеристик судорожного синдрома по сравнению с коразолом и тиосемикарбазидом, а также выявлении нарушений двигательной активности через 48 часов изменения в тесте «открытое поле», экспериментальное моделирование судорог с применением Фенилкарбамата не приводит к выраженным изменениям в результатах широко применяемого в доклинических исследованиях теста на когнитивные функции (УРПИ). Однако необходимо отметить, что и в случае экспозиции боевыми ФОС нет единого мнения, являются

ли наблюдаемые в отдаленной перспективе когнитивные нарушения у человека прямым последствием интоксикации, или развиваются в результате посттравматического стресса [127]. Тем не менее, известно, что у значительной части выживших после острой интоксикации карбаматами впоследствии наблюдаются тремор, головокружения, головные боли, частичная потеря памяти, эмоциональная лабильность, спутанность сознания, когнитивные нарушения, периферическая нейропатия и вегетативная дисфункция [118], что обосновывает необходимость разработки лекарственных средств, действующих комплексно и позволяющих предотвратить подобные осложнения. При этом в настоящее время не существует единого подхода к комплексной терапии острых интоксикаций нервно-паралитическими веществами, однозначно снижающего степень неврологической дисфункции у выживших [127].

Согласно данным научной литературы, при лечении острого отравления карбаматами применяются те же методы, что и при отравлении ФОС: атропинизация, влияющая на мускариновые (М)-рецепторы и введение препаратов бензодиазепинового ряда, воздействующих на рецепторы ГАМК для купирования судорожного синдрома в первые 10-20 минут после воздействия. В случае неэффективности указанных подходов, применяют методы лечения острых приступов хронической эпилепсии (введение барбитуратов, анестетиков) [123]. Однако необходимо учитывать, что эффективность антидотов высока только при применении на самых ранних стадиях отравления [59], далее эффективность снижается по экспоненте, повышается риск рецидивирования и формирования рефрактерных к бензодиазепинам судорог. Использование сочетанной терапии, например введение кетамина в дополнение к мидазоламу, повышает эффективность лечения [127], однако менее удобно, чем монопрепарат с мультитаргетной активностью. В последнее время появляется все больше подтверждений тому, что патогенез отравлений карбаматами и ФОС включает проявления нехолинергической токсичности, а в том числе митохондриальную дисфункцию и гормональные нарушения [112, 125], что обосновывает необходимость разработки мультитаргетных средств лечения.

В качестве перспективных в плане мультитаргетности соединений, безусловно привлекает к себе внимание вальпроевая кислота и ее производные. Среди описанных свойств: пре- и постсинаптическая модуляция ГАМК-ергической передачи, модуляции активности глутамата, а также ионных каналов, влияние на внеклеточный уровень серотонина и дофамина в тканях мозга, предполагается эпигенетическое воздействие на организм и способность модулировать нейрогенез [112, 140]. Ранее продемонстрирована эффективность таких производных вальпроевой кислоты как SPD и Валноктамид на экспериментальных моделях с использованием боевых ФОС (Зарин и VX) [95]. При анализе оригинальных солей аминокэфиров вальпроевой кислоты продемонстрировано, что, по крайней мере, один из четырех изученных образцов достоверно снижает продолжительность судорог, в том числе по сравнению с животными, получавшими Атропин и Реланиум. Это обосновывает перспективность дальнейшего развития направления по синтезу и дальнейшему тестированию производных вальпроевой кислоты данного ряда. На упомянутое производное Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата получен патент на изобретение РФ № 2714135 [43].

Согласно полученным данным, Карамифен и тригексифенидил, имеющие потенциальную возможность воздействовать на несколько механизмов купирования судорог, статистически значимо снижают клинические проявления судорожного синдрома. В целом, по показателю продолжительности судорожного синдрома при отравлении Фенилкарбаматом наиболее выраженной фармакологической эффективностью отличаются Карамифен и аминокэфир вальпроевой кислоты №3, в меньшей степени Дифередин и зарегистрированный лекарственный препарат Реланиум. Полученные результаты сравнительного тестирования зарегистрированных и перспективных средств купирования судорожного синдрома, а также профилактики неврологических нарушений при отравлении Фенилкарбаматом подтверждают идею о том, что накопление ацетилхолина в синапсах центральной нервной системы вследствие угнетения активности ацетилхолинэстеразы обуславливают только начальные проявления

судорожного синдрома, а в поддержании и рецидивировании судорог задействованы механизмы, не имеющие прямой взаимосвязи с активностью АХЭ. В их числе проявления глутаматергической гиперактивности, ассоциированные с эксайтотоксичностью. В результате нарушений межмедиаторного баланса угнетается активность тормозной ГАМК-ергической системы. Подтверждением этой точки зрения является установленная нами высокая противосудорожная активность при отравлении Фенилкарбаматом Карамифена с мультитаргетным М-холиноблокирующим и NMDA-блокирующим действием, а также аминоэфира вальпроевой кислоты (АВК №3 – (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид).

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 аминоэфира вальпроевой 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 аминокэфир 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 аминокефира 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. Рекомендуются 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. Рекомендуются 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 аминокэфиров вальпроевой кислоты.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АВК	–	аминоэфир вальпроевой кислоты
АД	–	артериальное давление
АМо	–	амплитуда моды
АЛТ	–	аланинаминотрансфераза
АОС	–	антиоксидантная система
АСТ	–	аспартатаминотрансфераза
АХЭ	–	ацетилхолинэстераза
АХОВ	–	аварийные химически-опасные вещества
БОВ	–	боевое отравляющее вещество
БХЭ	–	бутирилхолинэстераза
ВГ	–	восстановленный глутатион
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ВР	–	вариабельности ритма
ВТХВ	–	высокотоксичные химические вещества
В/в	–	внутривенно
В/ж	–	внутрижелудочно
В/б	–	внутрибрюшинно
ГАМК	–	гамма-аминомасляная кислота
ГП	–	глутатионпероксидаза
ГР	–	глутатионредуктаза
ГЭБ	–	гемато-энцефалический барьер
ЖКТ	–	желудочно-кишечный тракт
КИГ	–	кардиоинтервалография
ЛД ₅₀	–	среднелетальная доза
НДМГ	–	несимметричный диметилгидразин
ДАД	–	диастолическое артериальное давление
САД	–	систолическое артериальное давление
СОД	–	супероксиддисмутаза
ТЭИ	–	тест экстраполяционного избавления
ИВЛ	–	искусственная вентиляция лёгких
ИН	–	индекс напряженности

ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
МАО	–	моноаминооксидаза
МДА	–	малоновый диальдегид
НИР	–	научно-исследовательская работа
ОВ	–	отравляющее вещество
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
УРПИ	–	условная реакция пассивного избегания
ФОВ	–	фосфорорганические вещества
ФОС	–	фосфорорганические соединения
ХОО	–	химически-опасные объекты
ЦНС	–	центральная нервная система
ЧСС	–	частота сердечных сокращений
ЩФ	–	щелочная фосфатаза
ЭКГ	–	электрокардиограмма
ЭС	–	эпилептический статус
КА	–	каиновая кислота
NMDA	–	N-метил-D-аспартат
AMPA	–	рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антikonвульсанты в токсикологической практике / под ред. проф. В.Д. Гладких. – М.: Комментарий, 2017. – 240 с.
2. Химическое оружие на рубеже двух столетий / Антонов Н.С. – М.: Изд. гр. «Прогресс», 1994. – 174 с.
3. Архипов, В.И., Капралова, М.В., Першина, Е.В. Эксайтотоксичность и экспериментальные подходы к нейропротекции [Электронный ресурс]. – Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=10431> (дата обращения: 01.02.2025).
4. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – № 3, Т.37. – С. 32-34.
5. Бондаренко, Н. А. Быстрое многоступенчатое последовательное обучение с отложенной обратной связью у крыс в тесте «Экстраполяционное избавление». Когнитивная наука в Москве: новые исследования. Материалы конференции 23–24 июня 2021 г. Под ред. Е.В. Печенковой, М.В. Фаликман, А.Я. Койфман. М.: «Буки Веди», ИППиП. 2021 г. – 556 с.
6. Бонитенко, Ю.Ю., Никифоров, А.М. Чрезвычайные ситуации химической природы: (химические аварии, массовые отравления; медицинские аспекты) / Ю.Ю Бонитенко, А.М. Никифоров. – СПб: Гиппократ, 2004. – 464 с.
7. Булатова, И.А., Щёктова, А.П., Карлышева, К.Н. Особенности окислительного стресса при метаболическом синдроме с жировым поражением печени [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. – 2014.– №2. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12473> (дата обращения: 26.04.2024).
8. Военная токсикология и токсикология экстремальных ситуаций: Учебник / А.А. Бова, С.С. Горохо. – Минск: БГМУ, 2005. – 662 с.
9. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита: учебник / Под ред. Куценко С.А. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2004. – 528 с.

10. Воронина, Т.А. Мексидол: основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Фарматека. – 2009. – № 6. – С.28-31.
11. Вредные вещества в промышленности [Текст]: Справочник для химиков, инженеров и врачей: В 3-х т. / Под общ. ред. засл. деят. науки проф. Н. В. Лазарева и д-ра мед. наук Э. Н. Левиной. - 7-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: "Химия". Ленингр. отд-ние, 1976-1977. – 22 с.
12. Гайкова, О.Н. Морфологические проявления общепатологических процессов в нервной системе. Сопоставление данных посмертной МРТ, макро- и микроскопии / О.Н.Гайкова. – СПб: ФГБУН ИТ ФМБА России, изд.: «Весь», 2015. – 158 с.
13. Гладких, В.Д. Цитопротекция в системе медицинской реабилитации пострадавших с острыми экзогенными отравлениями / Антисдотная терапия отравлений высокотоксичными веществами в условиях чрезвычайных ситуаций. Руководство/Под научной редакцией д.м.н., профессора В.Д. Гладких, д.м.н., профессора С.Х. Сарманаева, к.м.н., доцента Ю.Н. Остапенко // Федеральное медико-биологическое агентство. – М.: Комментарий, 2014. – 250 с.
14. Гладких, В.Д. Реактиваторы холинэстеразы в терапии отравлений нейротропными физиологически активными веществами / В.Д Гладких, В.Б. Назаров // Медицина экстремальных ситуаций. – 2014.– Т.1, № 47.– С. 54-56.
15. Гладких, В. Д. Острые отравления аварийно-опасными химическими веществами. Диагностика и лечение. Руководство /В.Д. Гладких. – М.: «Комментарий», 2018. – 254 с.
16. Голиков, С.Н. Профилактика и терапия отравлений фосфорорганическими инсектицидами / М.: Медицина. – 1968. – 168 с.
17. Головкин, А.И., Головкин, С.И., Зефирова, С.Ю., Софронов, Г.А. Токсикология ГАМК-литиков / А.И. Головкин. – СПб: Нива, 1996. – 140 с.
18. Головкин, А.И. Механизмы фармакологической активности антидепримирующих средств, действующих на системы ГАМК и глутаминовой кислоты / А.И. Головкин, В.А. Барин, В.А. Башарин, Е.Ю. Бонитенко, М.Б.

Иванов, С.И. Головкин, Н.В. Лапина // Medline, Фармакология. – 2012. – Т.13. – С.157-184.

19. Гурьянов, Г.А., Голиков, С.Н. «Кубок Сократа» / Наука и жизнь. – 1998. – № 2. – С. 150-152.

20. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. по охране животных, использующихся для научных целей [Электронный ресурс]. – Rus-Lasa Рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы. –2012.– Режим доступа: <https://ruslasa.ru/>.

21. Доброванов, А., Свободный билирубин как предиктор нейротоксичности: вопрос будущего? / А. Доброванов, К. Кралинский // Перинатология и педиатрия. – 2018. – Т. 4, № 76. – С. 67-73.

22. Зорина, В.Н. Методы профилактики и терапии судорожного симптома при отравлении конвульсантами холинергического ряда / В.Н.Зорина, Е. А. Евдокимова, В. Л. Рейнюк // Медицина экстремальных ситуаций. – 2022. – Т. 24. – №. 2. – С. 14-21.

23. Иванов, М.Б., Оценка нейротоксичности в аспекте лекарственной токсикологии / А.Н. Петров, К.О. Войцехович, А.С. Мелехова, М.А. Зайцева, Н.В. Лапина, В.А. Кашуро, Е.Г. Батоцыренова, О.А. Вакуненко, С.В.Степанов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – С. 95-96.

24. Капашин, В. П., Пункевич, Б. С., Загребин, Е. М., Памфилов, С. О. Разработка и использование в системах химико-аналитического контроля объектов по уничтожению химического оружия государственных стандартных образцов токсичных химикатов и продуктов их деструкции [Электронный ресурс]. – Российский химический журнал. – 2007. – №2. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-i-ispolzovanie-v-sistemah-himiko-analiticheskogo-kontrolya-obektov-po-unichtozheniyu-himicheskogo-oruzhiya-gosudarstvennyh> (дата обращения: 02.03.2025).

25. Кондратьев, А.Н. Судорожный синдром / Интенсивная терапия. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Б.Р.Гельфанда, И.Б. Заболотских. – 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2017. – 288 с.

26. Коротков, Н.С. К вопросу о методах исследования кровяного давления / Известия Императорской Военно-медицинской академии. – 1905. – Т. 11. – С. 365—367.
27. Кравченко, Е.В. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт усиливает противосудорожную активность вальпроата у мышей. / Е.В. Кравченко, И.В. Понтелеева, С.С. Трофимов, В.И. Лапа, Р.У. Островская, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т.72. – №6. – С.15-17.
28. Курдиль, Н.В. Особенности отравлений пестицидами в условиях города: карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды / Н. В. Курдиль, О.В. Иващенко, В.Ф. Струк, А.Г. Богомол // Медицина неотложных состояний. – 2015.– № 4 (67). – С.51-57.
29. Курдиль, Н. В. Особенности острых отравлений фосфорорганическими пестицидами в условиях города: рекомендации для догоспитального этапа / Н. В. Курдиль, И. С. Зозуля, О. В. Иващенко // Семейная медицина. – 2014. – № 4(54). – С. 54.
30. Либман, Н.М. И химия – и жизнь! / Н.М. Либман, С.Г. Кузнецов // Журн. орг. Химии. – 1967. – Т.3, №9. – С.1554-1996.
31. Литвицкий, П.Ф. Общая этиология расстройств нервной деятельности. Нейрогенные патологические синдромы // Вопросы современной педиатрии.– 2013.– Т. 12, № 4.– С. 73-90.
32. Лудевиг, Р., Лос, К. Острые отравления: Пер. с нем. – М.: Медицина, 1983. – 560 с.
33. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2011. – 1216 с.
34. Медицинская токсикология: национальное руководство / Под ред. Е. А. Лужникова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
35. Мельникова, М.В. Влияние экстракта *Saccharina latissima* на показатели антиоксидантной системы крови крыс после отравления карбендазимом / М.В. Мельникова, В.А. Кашуро, Е.Г. Батоцыренова, Л.Г.

Кубарская, Е.А. Золотоверхая, Т.А. Колбасова, О.А. Вакуненко, А.С.Гладчук // Биомедицина. – 2022.– Т. 18, №3.– С.113-117.

36. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Изд-во Гриф и К, 2012. – 944 с.

37. Михайликова, В.В. Анализ рынка пестицидов в Российской Федерации / В.В. Михайликова, Н.С. Стребкова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2021. – №. 91. – С. 225-227.

38. Михайликова, В.В. Применение пестицидов и их действующих веществ в Российской Федерации / В.В. Михайликова, Н.С. Стребкова, Е.А. Пустовалова // Инновационные направления в химизации земледелия и сельскохозяйственного производства: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2019. – С. 84.

39. Москалева, П.В. Судорожный синдром. Часть 1. / П.В. Москалева, Н.А. Шнайдер, М.М. Петрова, Р.Ф. Насырова // Сибирское медицинское обозрение. – 2021.–№4.– С. 98-105.

40. Москалева, П.В. Судорожный синдром. Часть 2 / П.В. Москалева, Н.А. Шнайдер, М.М. Петрова, Р.Ф. Насырова // Сибирское медицинское обозрение. – 2022. – № 1(133). – С. 102-113. – DOI 10.20333/25000136-2022-1-102-113.

41. Одинак, М.М. Сравнительный анализ эффективности противосудорожных препаратов при эпилептическом статусе / М.М. Одинак, И. В. Литвиненко, И. А. Вознюк, Д. В. Свистов, М. Ю. Прокудин, С. Н. Базилевич, Б. В. Мартынов, Ю. В. Хлыстов, А. М. Моисеева, А. А. Лукаш, Д. А. Аверьянов // Скорая медицинская помощь.– 2015.– Т. 1.– С.42-48.

42. Остапенко Ю.Н. Токсическое поражение нервной системы / Неврология: Национальное руководство / Под ред. Е. И. Гусева, А.Н. Коновалова, В.И. Скворцова // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2018. – Т. 1. – С. 763-769.

43. Пат. 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.

44. Пат. 2754133 Российская Федерация, МПК (2006.01) А61К 31/27 А61К 31/325 А61Р 39/02 С07С 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., Чigareва 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.

45. Пат. 2629314 Российская Федерация, МПК А61Р 25/02 А61Л 31/065 А61К 31/121 А61Р 25/02 А61К 31/5415 Терапевтическая композиция и лекарственная форма на её основе / Петров А.Н. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» – 2015105334; заявл. 14.02.2015, опубл. 28.08.2017, Бюл. №11. – 6 с.

46. Перспективы применения бензодиазепинов в комплексной терапии отравлений антихолинэстеразными соединениями / М. А. Юдин, С.Н. Субботина, В.Н. Быков, С.В. Чепур, А.С. Никифоров // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 331-336.

47. Плужников, Н.Н. Цитопротекция: фундаментальные и прикладные проблемы / Н.Н. Плужников, А.Б. Белевитин, С.В. Чепур, А.Е. Сюсюкин, Л.С. Бакулина, Г.Г. Родионов, Б.В. Гайдар, И.В. Лагода, В.Н. Быков, И.В. Плужникова // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2008. – Т. 1, № 21. – С.3-38.

48. Профилактика, клиника, диагностика и лечение острых отравлений в войсках: Методические указания / М-во обороны Рос. Федерации, Гл. воен.-мед. упр.; [разраб. д.м.н., проф. А.Н. Гребенюком и др.]. – Москва: ГВМУ МО РФ, 2010. – 352 с.
49. Прозоровский, В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакол. биол. наркол. 2007. – Т. 7, № 3–4. – С. 2090–2120.
50. Разработка методологии диагностики и фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия. Методические рекомендации МР ФМБА России 12.08-18. – М., 2018. – 44 с.
51. Разумова, М.А. К фармакологии аминоспиртов ацетиленового ряда // Журнал фармакологии и токсикологии. – 1965. – № 2. – С.153 – 158.
52. Рамш, С.М. Подходы к рациональному конструированию обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы в качестве средств для лечения болезни Альцгеймера / С. М. Рамш, А. Н. Петров. – СПб: СПХФА, 1999.– 98 с.
53. Рожков, П.Г. Анализ обращаемости за информационно-консультативной G/U/ й токсикологической помощью по вопросам острых отравлений пестицидами за период 2019-2021 гг. / П.Г. Рожков, З.М. Гасимова, Т.А. Соколова, А.С. Ливанов //Современный взгляд на проблему травмы в неотложной медицине: Сборник материалов научно-практической конференции 24 июня 2022 г. Москва НПО ВМНИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского ДЗМ 2022. Труды института. – Т. 50. – С. 134-135.
54. Сомин, И.Н. Новые реактиваторы холинэстеразы // Труды Института токсикологии, посвященные 75-летию со дня основания. – СПб: ЭЛБИ-СПб, 2010. – С. 333-343.
55. Софронов, Г.А. Экстремальная токсикология: учебник / Г.А.Софронов [и др.]. – СПб: ЭЛБИ, 2012. – 256 с.
56. Субботина, С.Н. К вопросу о применении nmda-литических средств в схемах терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома / С.Н.

Субботина, М.А. Юдин, А.А. Кузьмин, И.М. Иванов // Medline. Фармакология. – 2012. – Т.13. – С.583-596.

57. Экстренная медицинская помощь при отравлениях. Р.Хоффман, Л.Нельсон, М.-Э.Хауланд, Н.Льюин, Н.Фломенбаум, Л.Голдфранк / Научный редактор К.В.Котенко. Пер. с англ. – М.: Практика, 2010. – 1440 с.

58. Элленхорн, М. Дж. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека: в 2 томах. Т.1. Пер. с англ. – М.: Медицина, 2003. – 1048 с.

59. Alozi, M. Treating organophosphates poisoning: management challenges and potential solutions / M. Alozi, M. Rawas-Qalaji // Crit Rev Toxicol.– 2020.– Vol. 50, N 9.– P. 764-779.

60. Al-Otaibi, F. An overview of structurally diversified anticonvulsant agents // Acta Pharm. – 2019. – Vol. 69, N. 3. – P. 321-344.

61. Amengual-Gual, M. Novel drugs and early polypharmacotherapy in status epilepticus / M. Amengual-Gual, I. Sánchez Fernández, M.S. Wainwright // Seizure. – 2019. – Vol. 68. – P.79-88.

62. Banday, T. H., Predictors of morbidity and mortality in organophosphorus poisoning: a case study in rural Hospital in Karnataka, India / T.H. Banday, B. Tathineni B, M.S. Desai, V. Naik // N Am J Med Sci. – 2015. – Vol. 7, N.6. – P.259 - 265.

63. Bibi, D. Epilepsia. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of (2S,3S)-sec-butylpropylacetamide (SPD) in rats and pigs-A CNS-active stereoisomer of SPD / D. Bibi, M. Bialer // Epilepsia. – 2020. – Vol. 61, N.1. – P. 149 - 156.

64. Bruun, D.A. Pretreatment with pyridostigmine bromide has no effect on seizure behavior or 24 hour survival in the rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication / D.A. Bruun, M. Guignet, D.J. Harvey, P.J. Lein // Neurotoxicology. – 2019. – Vol. 73. – P. 81-84.

65. Carpentier, P. Soman Induced Seizures and Related Brain Damage: How to Treat Seizures and Assess Their Effects NonInvasively? / P. Carpentier, G. Testylier, V.

Baille, F. Dhote, A. Job, B. Pouyatos, F. Pernot, A. Foquin, C. Delacour, M. Hamilton, F. Dorandeu // J Med CBR Def. – 2008. – Vol. 6. – P. 9-11.

66. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Seventh Edition / Editor: Curtis D. Klaassen Ph.D. – McGraw-Hill. – Medical Publishing Division, 2008. – 1331 p.

67. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Seventh Edition / Editor: Curtis D. Klaassen Ph.D. – McGraw-Hill. – Medical Publishing Division, 2013. – 1453 p.

68. Cavazos, J.E., Sutula T.P. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis / J.E. Cavazos, T.P. Sutula // Brain Res. – 1990. – Vol. 527, N.1. – P. 1-6.

69. Chaturvedi, D. Lessons from the Established Status Epilepticus Treatment Trial. Epilepsy and Behavior / D. Chaturvedi, H.R. Cock, L.D. Coles, J. Elm, R. Silbergleit, J.M. Chamberlain, J.C.Cloyd, N. Fountain, S. Shinnar, D. Lowenstein, R. Conwit, T.P. Bleck, J. Kapur // EandB. – 2019. – Vol. 101, N.B. – 17 p.

70. Chen, H.Y. Treatment of drug-induced seizures / H.Y. Chen, T.E. Albertson, K.R. Olson // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2016. – Vol. 81, N.3. – P. 412-419.

71. Chuang, M.C. One-year mortality among hospital survivors of cholinesterase inhibitor poisoning based on Taiwan National Health Insurance Research Database from 2003 to 2012 / M.C. Chuang, C.H. Chang, C.S. Lee // BMC Pharmacol Toxicol. – 2018. – Vol. 19, N.1. – 72 p.

72. Hirsch, L.J. Treatment of Refractory Status Epilepticus with Pentobarbital, Propofol, or Midazolam: A Systematic Review / L.J. Hirsch, R.G. Emerson, S.A. Mayer, //Epilepsia.– 2002. – V. 43. – P.146-153.

73. Colosio, Claudio SS21 NEW DEVELOPMENTS IN PESTICIDES: ENHANCING OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY / C. Colosio, S. Chandrasekar // Occupational Medicine. – 2024. – Vol. 1. – 74 p.

74. Delage, C. Valproate, divalproex, valpromide: Are the differences in indications justified? / C. Delage, M. Palayer, B. Etain, M. Hagenimana, N. Blaise,

J. Smati, M. Chouchana, V. Bloch, V.C. Besson // Biomed Pharmacother. – 2023. – 158 p.114 doi: 10.1016/j. biopha.2022.114051

75. DeLorenzo, R.J. Effects of glutamate on calcium influx and sequestration/extrusion mechanisms in hippocampal neurons / R.J. DeLorenzo, D.D. Jr. Limbrick // Adv Neurol. – 1996. – Vol. 71. – P.37-46.

76. Dobbs, M.R. Clinical Neurotoxicology: Syndromes, Substances, Environments. – SAUNDERS Elsevier, 2010. – 720 p.

77. Dobbs, M.R. Next Steps for Clinical Neurotoxicology / M.R. Dobbs, M. Ibraheem // Neurol Clin. – 2020. – Vol. 38, N.4. – P.13-14.

78. Eddleston, M. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. / M. Eddleston, F.R. Chowdhury // Br J Clin Pharmacol. –2016. – Vol. 81, N.3. – P.462-470.

79. Ecobichon, D.J. Our changing perspectives on benefits and risks of pesticides: a historical overview // Neurotoxicology. – 2000. – V. 21. – P.211–218.

80. Ecobichon, D.J. Pesticide Use in Developing Countries // Toxicology. – 2001. – Vol. 160. – P.27-33.

81. Eddleston, M. Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2019. – Vol. 59. – P. 341-360.

82. Ellis, L.B. Adult Organophosphate and Carbamate Insecticide Exposure and Sperm Concentration: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence / L.B. Ellis, K. Molina, C.R. Robbins, M. Freisthler, D. Sgargi, D. Mandrioli, M.J. Perry // Environ Health Perspect. – 2023. – Vol. 11. – 131 p.

83. Ellmann, G.L. A new and rapid Colorimetric determination of activity acetylcholinesterase / G.L. Ellmann, K.D. Courtney, V. Andress, R.M. Featherstone // Biochem.Pharmacol. – 1961. – Vol. 7, N.2. – P. 88-95.

84. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1959. – Vol. 82, N.1. – P. 70–77.

85. Figueiredo, T.H. The GluK1 (GluR5) Kainate/{alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor antagonist LY293558 reduces soman-

induced seizures and neuropathology / T.H. Figueiredo, F. Qashu, J.P. Apling, V. Aroniadou-Anderjaska, A.P. Souza, M.F. Braga // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2011. – Vol. 336, N. 2. – P.303-312.

86. Flanagan, R.J. Poisoning: fact or fiction? // *Med Leg J.* – 2012. – V. 80 (Pt 4). – 127 p.

87. Folbergrová, J. Oxidative Stress in Immature Brain Following Experimentally-Induced Seizures // *Physiol Res.* – 2013. – Vol. 62, N.1. – P.39-48.

88. Freireich, E. J. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man / E. J. Freireich, E. A. Gehan, D. P. Rall, L. H. Schmidt, H. E. Skipper // *Cancer Chemother.* – 1966. – Vol. 50, N. 4. – 219 p.

89. Garlich, F.M. Hemodialysis clearance of glyphosate following a life-threatening ingestion of glyphosate-surfactant herbicide / Garlich FM, Goldman M, Pepe J, et.al. // *Clin Toxicol (Phila).* – 2014. – Vol. 52, N. 1. – P. 66-71.

90. Ghosh, A.K. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry / A.K. Ghosh, M. Brindisi // *J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 63: – 2751 p.

91. Guidance on management of household pesticides World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Geneva: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), 2020. – 52p.

92. Gunduz, E. Factors affecting mortality in patients with organophosphate poisoning / E. Gunduz, R. Dursun, M. Icer, Y. Zengin, M.N. Gullu, H.M. Durgun, O. Gokalp // *J Pak Med Assoc.* – 2015. – Vol. 65, N. 9. – 967 p.

93. Habig, W.H. Assay for differentiation of glutathione S-transferases // *Methods in Enzymology.* – 1981. – Vol. 77. – P. 398-405.

94. Hadad, S. et al. Pharmacokinetic Analysis of Ester Prodrugs of Valproic Acid / S. Hadad // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 1992. – Vol. 81. – P. 1047-1050.

95. Haines, K.M. Comparative efficacy of valnoctamide and sec-butylpropylacetamide (SPD) in terminating nerve agent-induced seizures in pediatric rats / K.M. Haines, L.M. Matson, E.N. Dunn, C.E. Ardinger, R.L. Stubbs, D. Bibi, J.H. McDonough, M. Bialer // *Epilepsia.* – 2019. – Vol. 60, N. 2. – P. 315-321.

96. Hönack, D. Intravenous valproate: onset and duration of anticonvulsant activity against a series of electroconvulsions in comparison with diazepam and phenytoin / D. Hönack, W. Löscher // *Epilepsy Research*. – 1992. – Vol. 13, N. 3. – P. 215-221.
97. Hilal-Dandan, R., Brunton, L.L. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, Second Edition. – McGraw-Hill Education, 2014. – 1216 p
98. Huang, L. Case Report: Fatal Neurotoxicity Following Resmethrin Poisoning in a Child / L. Huang, S. Peng, R. Li [et al.] // *Front Pediatr*. – 2021. – Vol. 9. – P.746-950.
99. Imran, I. Effects of Three Anti-Seizure Drugs on Cholinergic and Metabolic Activity in Experimental Status Epilepticus / I. Imran, K. Koch, H. Schöfer, H. Lau, J. Klein // *J Pharm Pharm Sci*. – 2019.– Vol. 22, N. 1.– P. 340-351.
100. Jackisch, R. The antiparkinsonian drugs budipine and biperiden are use-dependent (uncompetitive) NMDA receptor antagonists / R. Jackisch, A. Kruchen, W. Sauermann, G. Hertting, T.J. Feuerstein // *Eur. J. Pharmacol*. – 1994. – Vol. 264, N. 2. – P.207-211.
101. Jazayeri, A. Anticonvulsant effect of Diazoxide against Dichlorvos-induced seizures in mice / A. Jazayeri, S. Zolfaghari, S. Ostadhadi // *The ScientificWorldJournal*. – 2013. – Vol. 2013, N.1. – 4 p.
102. Jett, D.A., Spriggs S.M. Translational research on chemical nerve agents // *Neurobiol Dis*. – 2020. – V. 133. – PMID: 104335.
103. Jungers, G. Petroleum in Pesticides: A Need to Change Regulatory Toxicology / G. Jungers, F. Portet-Koltalo, J. Cosme // *Toxics*. – 2022. – Vol. 10, N. 11. – 670 p.
104. Kang, E.J. Factors for determining survival in acute organophosphate poisoning / E.J. Kang, S.J. Seok, K.H. Lee, H.W. Gil, J.O. Yang, E.Y. Lee, S.Y. Hong // *Korean J Intern Med*. – 2009. – Vol. 24, N. 4. – 362 p.
105. Kaur, D. Autonomic neuropathies / D. Kaur, H. Tiwana, A. Stino, P. Sandroni // *Muscle Nerve*. – 2021. – Vol. 63, N. 1. – P. 10-21.

106. Kent, R. Olson, Ilene B. Anderson, Neal L. Benowitz, Paul D. Blanc, Richard F. Clark, Thomas Kearney Poisoning and Drug Overdose Publisher: McGraw-Hill Education / Medical: 7th edition. 2018. – 960 p.

107. Kim, K.H. Clinical significance of national patients sample analysis: factors affecting mortality and length of stay of organophosphate and carbamate poisoned patients / K.H. Kim, I.H. Kwon, J.Y. Lee, W.H. Yeo, H.Y. Park, K.H. Park, J. Cho, H. Kim, G.B. Kim, D.H. Park, Y.S. Yoon, Y.W. Kim // *Healthc Inform Res.* – 2013. – Vol. 19, N. 4. – P. 278-285.

108. King, A.M. Organophosphate and carbamate poisoning / A.M. King, C.K. Aaron // *Emerg Med Clin North Am.* – 2015. – Vol. 33, N.1. – P.133-151.

109. Kumar S. Forensic toxicological and analytical aspects of carbamate poisoning - A review / S. Kumar, T.R. Baggi, T. Zughaibi // *J Forensic Leg Med.* – 2022. – Vol. 92. – PMID: 102450.

110. Lasoń, W. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action / W.Lasoń, M. Chlebicka, K. Rejdak // *Pharmacol. Rep.* – 2013. – Vol. 65, N. 4. – P. 787-801.

111. Leung, M.C.K. Mitochondria as a target of organophosphate and carbamate pesticides: Revisiting common mechanisms of action with new approach methodologies / M.C.K. Leung, J.N. Meyer // *Reprod Toxicol.* – 2019. – Vol. 89. – P. 83-92.

112. Lee, F.Y. Organophosphate poisoning and subsequent acute kidney injury risk: anationwide population-based cohort study / F.Y. Lee, W.K. Chen, C.L. Lin et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2015. – N. 94. – PMID: e10.1097/MD.0000000000002107.

113. Lifshitz, M. Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in southern Israel / M. Lifshitz // *Isr Med Assoc J.* – 2008. – Vol. 10, N.11. – P. 767-770.

114. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. – Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. – Benzodiazepines.

115. Löscher, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs // *Neurochem Res.* – 2017. – Vol. 42, N. 7. – P. 1873-1888.
116. Lowenstein, D. H. Status epilepticus / D. H. Lowenstein, B. K. Alldredge // *New England Journal of Medicine.* – 1998. – Vol. 338, N. 14. – P. 970-976.
117. Mani, G.S. Laryngeal Dysfunction in Acute Organophosphorus and Carbamate Poisoning / G.S. Mani, S.S. Mathews, P. Victor [et.al.] // *Indian J Crit Care Med.* – 2022. – Vol. 26, N. 2. – P. 167-173.
118. Mangaly, A.J. Alternate Biochemical Markers in Organophosphate Poisoning / A.J. Mangaly, C. Radhakrishnan // *J Assoc Physicians India.* – 2023. – Vol. 71, N. 8. – P. 11-12.
119. Matosevic, A. Carbamate Group as Structural Motif in Drugs: A Review of Carbamate Derivatives used as Therapeutic Agents / A. Matosevic, A. Bosak // *Arh Hig Rada Toksikol.* – 2020. – Vol. 71, N. 4. – P. 285-299.
120. McCarren, H.S. Anticonvulsant discovery through animal models of status epilepticus induced by organophosphorus nerve agents and pesticides / H.S. McCarren, J.H. Jr. McDonough // *Ann N Y Acad Sci.* – 2016. – Vol. 1374, N. 1. – P. 144-150.
121. McDonough, J.H. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology / J.H. McDonough, T.M. Shih // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1997. – Vol. 21, N. 5. – P. 559 – 579.
122. Alexei, L. Smith Using Hydrogen Bonding to Control Carbamate C-N Rotamer / Alexei L. Moraczewski 1, Laura A. Banaszynski, Aaron M. From, Courtney E. White, Bradley D. // *Equilibria J Org Chem.* – 1998. – Vol. 16, N. 63. – P. 7258-7262.
123. Morgan, J.E. Refractory and Super-Refractory Status Epilepticus in Nerve Agent-Poisoned Rats Following Application of Standard Clinical Treatment Guidelines / J.E. Morgan, S.C. Wilson, B.J. Travis, K.H. Bagri, K.T. Pagarigan, H.M. Belski, C. Jackson, K.M. Bounader, J.M. Coppola, E.N. Hornung, J.E. Johnson, H.S. McCarren // *Front Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – PMID: 732213.

124. Mudryanselage, A.W., Differentiated Neurons Are More Vulnerable to Organophosphate and Carbamate Neurotoxicity than Undifferentiated Neurons Due to the Induction of Redox Stress and Accumulate Oxidatively-Damaged Proteins / A.W. Mudryanselage, B.C. Wijamunige, A. Kocon, W.G. Carter // *Brain Sci.* – 2023. – Vol. 13, N. 5. – 728 p.

125. van Melis, L.V.J. Organophosphate insecticides disturb neuronal network development and function via non-AChE mediated mechanisms / L.V.J. van Melis, H.J. Heusinkveld, C. Langendoen, A. Peters, R.H.S. Westerink // *Neurotoxicology.* – 2023. – Vol. 94. – P. 35-45.

126. Myhrer, T. Choice of approaches in developing novel medical counter measures for nerve agent poisoning / T. Myhrer, P. Aas // *Neurotoxicology.* – 2014. – Vol. 44. – P. 27-38.

127. Newmark, J. Therapy for acute nerve agent poisoning: An update // *Neurolog Clin Pract.* – 2019. – Vol. 9, N. 4. – P. 337-342.

128. Niquet, J. Rational polytherapy in the treatment of cholinergic seizures / J. Niquet, L. Lumley, R. Baldwin, F. Rossetti, L. Suchomelova, D. Naylor, I.B.F. Estrada, M. Schultz, M.A. Furtado, C.G. Wasterlain // *Neurobiol Dis.* – 2020. – Vol. 133. – PMID: 104537.

129. Noshad, H. Respiratory failure in organophosphate insecticide poisoning / H. Noshad, K. Ansarin, M.R. Ardalan, A.R. Ghaffari, J. Safa, N. Nezami // *Saudi Med J.* – 2007. – Vol. 28, N. 3. – P. 405–410.

130. Patel, P. The evolution of the concepts of seizures and epilepsy: What's in a name? / P. Patel, S.L. Moshé // *Epilepsia Open.* – 2020. – Vol. 5, N. 1. – P. 22-35.

131. Petreski, T. Cholinergic syndrome: a case report of acute organophosphate and carbamate poisoning. / T. Petreski, B. Kit, M. Strnad [et. al] // *Arh Hig Rada Toksikol.* – 2020. – V. 71, N. 2. – P. 163-166.

132. Phillips, H.N., Tormoehlen L. Toxin-Induced Seizures / H.N. Phillips, L. Tormoehlen // *NeurolClin.* – 2020. – Vol. 38, N. 4. – P. 867-879.

133. Preventing suicide: a resource for pesticide registrars and regulators ISBN 978-92-4-151638-9 (WHO) ISBN 978-92-5-131787-7 (FAO) © World Health

Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019. – 36 p.

134. Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* – 1972. – Vol. 32, N.3. – P.281 - 294.

135. Randa, Hilal-Dandan, Bjorn, Knollmann, Laurence, Brunton Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th Edition // McGraw-Hill Education. – 2017. – Vol. 13. – 1440 p.

136. Raveh, L. Caramiphen edisylate: an optimal antidote against organophosphate poisoning / L. Raveh, A. Eisenkraft, B.A. Weissman // *Toxicology.* - 2014. – Vol. 325. – P. 115 - 124.

137. Reddy, D.S. Mechanism-based novel antidotes for organophosphate neurotoxicity // *Curr Opin Toxicol.* – 2019. – Vol. 14. – P. 35 - 45.

138. Reddy, B.S. Factors associated with outcomes in organophosphate and carbamate poisoning: a retrospective study / B.S. Reddy, T.G. Skaria, S. Polepalli, S. Vidyasagar, M. Rao, V. Kunhikatta, S. Nair, G. Thunga // *Toxicol Res.*– 2020.– Vol. 36, N. 3.– P. 257 - 266.

139. Romoli, M. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences / M. Romoli, P. Mazzocchetti, R. D'Alonzo, S. Siliquini, V.E. Rinaldi, A. Verrotti, P. Calabresi, C. Costa // *Curr Neuropharmacol.* – 2019. – Vol. 17, N. 10. – P. 926 - 946.

140. Romoli, M. Antiepileptic drugs in migraine and epilepsy: Who is at increased risk of adverse events? / M. Romoli, C. Costa, S. Siliquini, I. Corbelli, P. Eusebi, C. Bedetti, S. Caproni, L. M.Cupini, P. Calabresi, P. Sarchielli // *Cephalalgia.* – 2018. – Vol. 38, N. 2. – P. 274 - 282.

141. Bleecker, J.L., Satoh, T., Jokanović, M. Toxicity and Novel Biomarkers of OP Exposure. In: Balali-Mood, M., Abdollahi, M. (eds) *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*. Springer. – London, 2014.

142. Scott et al. Synthesis and Evaluation of Amino Analogues of Valproic Acid // *Pharmaceutical Research.* – 1994. – Vol. 11. – P. 571-574.

143. Senarathne, R. Selected Liver Markers in Predicting the Severity of Organophosphate and Carbamate Poisoning / R. Senarathne, U. Hettiaratchi, L. Athiththan, H. Peiris, C. Sarathchandra, H. Senanayake, P. Weerawansa, S. Siribaddana // *J Environ Public Health*. – 2022. – PMID: 7826396.
144. Silberman, J. Carbamate Toxicity / Silberman J, Taylor A. 2023 May 1. In: *StatPearls [Internet]* // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan –. PMID: 29489157.
145. Sobolev, V.E. Molecular Mechanisms of Acute Organophosphate Nephrotoxicity / V.E. Sobolev; M.O. Sokolova, R.O. Jenkins. N.V. Goncharov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, N. 16. – PMID: 8855.
146. Sokolova, T.V. Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy / T.V Sokolova, Y.M. Zabrodsкая, A.V. Litovchenko, N.M. Paramonova, V.R. Kasumov, S.V. Kravtsova, E.N. Skiteva, D.A. Sitovskaya, E.D. Bazhanova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – P. 12561.
147. Sparenborg, Steven et al. “Dizocilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman // *Neuropharmacology*. – 1992. – Vol. 31. – P. 357-368.
148. Swissa, E. Midazolam and isoflurane combination reduces late brain damage in the paraoxon-induced status epilepticus rat model / E. Swissa, G. Bar-Klein, Y. Serlin, I. Weissberg, L. Kamintsky, A. Eisenkraft, L. Statlender, S. Shrot, Y. Rosman, O. Prager, A. Friedman // *Neurotoxicology*. – 2020. – Vol. 78. – P. 99-105.
149. Tetz, L.M. Development of a rat pilocarpine model of seizure/status epilepticus that mimics chemical warfare nerve agent exposure / L.M. Tetz, P.E. Rezk, R.H. Ratcliffe, R.K. Gordon, K.E. Steele, M.P. Nambiar // *Toxicol Ind Health*. – 2006. – Vol. 22, N. 6. – P. 255-266.
150. Thundiyil, J.G. Evolving epidemiology of drug-induced seizures reported to a Poison Control Center System / J.G. Thundiyil, T.E. Kearney, K.R. Olson // *J Med Toxicol*. – 2007. – Vol. 3, N. 1. – P.15-19.

151. Tsai, Y.H., Lein P.J. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity / Y.H. Tsai, P.J. Lein // *Curr Opin Toxicol.* – 2021. – Vol. 26. – P. 49-60.
152. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Analytical Biochemistry.* – 1978. – V. 86, N. 1. – P. 271–278.
153. Vijayaraghavan, R. Autoinjector device for rapid administration of drugs and antidotes in emergency situations and in mass casualty management // *J Int Med Res.* – 2020. – Vol. 48, N. 5. – PMID: 300060520926019.
154. Worek, F. Organophosphorus compounds and oximes: a critical review / Worek F, Thiermann H, Wille T. // *Arch Toxicol.* – 2020. – Vol. 94, N. 7. – P. 2275-2292.
155. Wang, R., Reddy P.H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease / R. Wang, P.H. Reddy // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 57, N. 4. – P. 1041-1048.
156. Weissman, B.A., Raveh L. Therapy against organophosphate poisoning: the importance of anticholinergic drugs with antiglutamatergic properties / B.A. Weissman, L. Raveh // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 232, N. 2. – P.351-358.
157. Yadav, I. Study of Sick Euthyroid Syndrome in Organophosphate Poisoning.// *J Assoc Physicians India.* – 2022. – Vol. 70, N. 4. – P.11-12.
158. Zarubenko, I.I. Electroconvulsive shock induces neuron death in the mouse hippocampus: correlation of neurodegeneration with convulsive activity / I.I. Zarubenko, A.A. Yakovlev, M.Y. Stepanichev, N.V.Gulyaeva // *Neurosci Behav Physiol.* – 2005. – Vol. 35, N. 7. – P. 715–721.
159. Zhang, Y. Cerebral Glutamate Regulation and Receptor Changes in Perioperative Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction / Y. Zhang, J.M. Chu, G.T. Wong // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12, N. 4. – 597 p.
160. Zolkowska, D. Characterization of seizures induced by acute and repeated exposure to tetramethylenedisulfotetramine / D. Zolkowska, C.N. Banks, A. Dhir, B. Inceoglu, J.R. Sanborn, M.R. McCoy, D.A. Bruun, B.D. Hammock, P.J. Lein, M.A. Rogawski // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2012. – Vol. 341, N. 2. – P. 435-446.