

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Мелеховой Александры Сергеевны на тему: «Экспериментальное обоснование применения средств лечения судорожного синдрома, вызываемого карбамидами», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.4 – токсикология

Актуальность темы исследования. К достаточно частым проявлениям экзогенный интоксикаций являются судороги. Генерализованные судороги представляют непосредственную угрозу жизни пострадавших. В развитии судорожного синдрома важную роль играют нарушения медиаторных систем головного мозга: холинергических, ГАМК-ергических, глутаматных, глициновых и др. Он нередко наблюдается при отравлении антихолинэстеразными веществами, ГАМК-литиками, пикротоксином, бемегридом и пр. В мире отмечается значительное количество отравлений пестицидами, гербицидами на основе ингибиторов холинэстераз (ХЭ), в частности карбаматов (сложных эфиров и солей карбаминовой кислоты). В отдалённые периоды интоксикации тяжёлой степени может отмечаться снижение умственной и физической трудоспособности, инвалидизация. Карбаматы нашли широкое применение в бытовой химии, агрохимикатах. Свойство некоторых из них – обратимо ингибировать ацетилхолинэстеразу (АХЭ) широко используется при создании лекарственных средств (прозерин, калемин и др.), в том числе и антидотов фосфорорганических соединений (ФОС), таких как пиридопиримин. Некоторые высокотоксичные карбаматы рассматриваются в качестве средств химического терроризма. Следует отметить, что карбаматы можно отнести к одним из основных химических соединений судорожного действия, лекарственная терапия отравлений которыми требует совершенства. Безусловно, поиск и разработка эффективных средств терапии отравлений карбамидами должны проводиться на основе дальнейшего изучения патогенеза интоксикаций ими, с использованием адекватных экспериментальных моделей. В связи с этим данная работа весьма актуальна для токсикологии, так как её целью является экспериментальное обоснование эффективности новых средств фармакотерапии токсического судорожного синдрома на модели острого отравления карбаматом.

Степень разработанности темы исследования. Судорожный синдром является характерным проявлением интоксикации антихолинэстеразными веществами, в частности карбамидами, тяжёлой степени. Несвоевременное купирование его может привести к летальным исходам пострадавших. Кроме того, у отравленных могут развиваться выраженные отдалённые инвалидизирующие последствия. Однако перечень лекарственных средств, эффективных при лечении токсического судорожного синдрома, вызванного воздействием карбаматов, весьма ограничен. Это свидетельствует о необходимости дальнейшей разработке таких препаратов, целесообразности проведения исследований в выбранного автором научном направлении.

Задачи, решаемые в работе, полностью соответствуют цели исследования.

Научная новизна работы. Научная новизна исследования заключается в том, что А. С. Мелеховой впервые в опытах на крысах разработана модель судорожного синдрома, вызванного внутрибрюшинным введением фенолкарбамата (обратимого ингибитора ХЭ).

Выявлено, что интоксикация фенолкарбаматом, сопровождающаяся судорогами, приводит к формированию структурных повреждений головного мозга, к изменению ряда

Вх. № 46
«18» августа 2015 г.
ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России

биохимических показателей периферической крови, регистрируемых в течение длительного периода после прекращения судорог. При отравлении фенилкарбаматом тяжёлой степени установлено отсутствие прямой зависимости между степенью ингибирования активности АХЭ, выраженностью и продолжительностью судорог.

Впервые отмечено, что при отравлении животных фенилкарбаматом лекарственный препарат карамифен из группы блокаторов М – холинорецепторов и NMDA – рецепторов, а также оригинальный аминоксифир вальпроевой кислоты (гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата) по ряду показателей проявляют выраженную противосудорожную активность, а также предотвращают гибель животных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа имеет теоретическую и, безусловно, практическую значимость. Полученные автором данные на разработанной экспериментальной модели токсического действия фенилкарбамата позволили изучить его влияние на функциональное состояние животных и выявить ряд патогенетических особенностей интоксикации, а также патоморфологические изменения тканей мозга в течение 21 суток на фоне отсутствия выраженных нарушений поведения и когнитивных функций, что свидетельствовало о необходимости профилактики неврологических нарушений у отравленных.

Автором выявлены новые механизмы действия ряда лекарственных препаратов (карамифена, тригексифенидида, диферицина) и субстанций (аминоксифира вальпроевой кислоты) при купировании судорожного синдрома, вызванного фенилкарбаматом. Определены перспективные антиконвульсанты.

Методология и методы исследования. Используемые в работе методология и методы исследования токсического судорожного синдрома позволили автору выполнить исследования на современном уровне, осуществить моделирование интоксикаций, оценить функциональное состояние органов и систем у отравленных животных. Исследование проведено в соответствии с нормативными и руководящими документами.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы, имеют высокую степень проработки и подтверждены результатами экспериментов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Правильность и значимость их подкрепляется использованием в работе современных методик статистической обработки данных, адекватных исследованию. Степень достоверности обусловлена также достаточным объёмом проведённых исследований.

Работа выполнена в рамках плановых научно-исследовательских работ ФГБУН ИТ ФМБА России (в настоящее время ФГБУ НКЦТ им С.Н. Голикова ФМБА России) шифры «Антитон», «Антитон-2», «Антистатус» в 2015 – 2023 гг.

Апробация и обсуждение материалов диссертации А.С. Мелеховой осуществлены на ряде научных и научно-практических конференциях, в том числе с международным участием, в 2016 – 2022 гг.

Результаты исследований использованы в методических рекомендациях «Разработка методов диагностики и фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия» (МР ФМБА России 12.08.-18), утверждённых и введенных в действие ФМБА России 28.02.2018, а также они внедрены в учебный процесс кафедры военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ.

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования РФ, 1 монография, получено 2 патента РФ на изобретения.

Личный вклад автора в работу заключается непосредственном участии в планировании и проведении экспериментальных исследований, поиске и отборе литературы, выборе методов исследований, анализе и статистической обработке полученных данных. Исходя из представленного материала он, по различным позициям, составляет 80 – 100 %.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 186 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трёх глав результатов собственных исследований, главы обсуждения полученных результатов, заключения, содержащего перспективы дальнейшей разработки темы, выводы, практические рекомендации, а также списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 160 источников, из них 56 отечественных и 104 иностранных. Диссертация содержит 67 таблиц и иллюстрирована 56 рисунками.

В разделе «**Введение**» обоснована актуальность темы работы на основании освещения современного состояния проблемы лечения острых отравлений карбамидами, характеризующихся развитием судорожного синдрома. Обоснована необходимость проведения исследований, направленных на дальнейшее изучение патогенеза интоксикации, поиск новых эффективных лекарственных средств, перспективных для включения в схему терапии отравлений этими токсикантами. Оценена степень разработки выбранной темы, определены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, а также представлены данные о степени достоверности и апробации результатов исследования, внедрении их в практику, о публикациях, личном вкладе автора, сведения о структуре и объёме диссертации.

В главе 1 (**обзор литературы**) содержится информация о современных представлениях о токсическом судорожном синдроме и подходах к его лечению. Представлен перечень основных веществ, вызывающих судороги, а также проведен анализ клинических проявлений судорожного синдрома, механизмов его развития. Рассмотрены механизмы действия токсикантов и выраженность влияния их на органы и системы, центральную нервную систему (ЦНС). Отмечено, что одной из основных нейромедиаторных систем, ответственных за развитие процессов возбуждения, является глутаматергическая система. Особое внимание уделено рассмотрению токсического судорожного синдрома при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия, таких как ФОС и карбаматы. Отмечено, что карбаматы отличаются от ФОС не только по взаимодействию с ферментами, но и имеют ряд особенностей влияния на биологические свойства, в том числе на проявление токсичности. Описаны клинические проявления интоксикации, наблюдаемые при отравлении карбамидами. Отдельное внимание обращено на токсическое действие ФОС и карбаматов, связанное с их нехолинергическим действием. Завершающий главу 1 подраздел 1.3 посвящён терапии токсического судорожного синдрома при острых отравлениях веществами антихолинэстеразного действия. В нём рассмотрены мероприятия экстренной медицинской помощи при отравлении судорожными агентами. Представлены лекарственные средства, традиционно применяемые при интоксикациях: антидоты, средства патогенетической и симптоматической терапии. В заключении главы автором отмечено, что необходима

дальнейшая разработка эффективных средств лечения отравлений карбаматами, сопровождающихся судорогами, на основе новых экспериментальных моделей. Автором представлены фармакологические группы препаратов, на основе которых целесообразно проводить разработку перспективных лекарственных средств для купирования судорожного синдрома при интоксикации карбаматами тяжёлой степени. В целом представленный обзор литературы свидетельствует о знании автором современных научных данных о выбранном автором направлении исследований.

Вторая глава диссертации посвящена **материалам и методам исследования**. В данной главе представлен дизайн исследования, содержащий его этапы, схему экспериментов по сравнительному изучению судорожных токсикантов и др. Для разработки экспериментальной модели судорожного синдрома применялись - фенилкарбамат, коразол, тиосемикарбазид; для фармакотерапии судорожного синдрома, вызванного введением фенилкарбамата, – атропина сульфат, реланиум, а также ряд перспективных соединений и др. Указаны животные (крысы-самцы), с использованием которых проведено исследование и их содержание. Определён порядок определения токсикометрических параметров фенилкарбамата. Представлены данные о моделировании судорожного синдрома и его оценке, а также о методах оценки поведения, памяти и двигательной активности животных, состояния сердечно-сосудистой и других систем. Отмечено, что статистическая обработка данных выполнена с помощью математических методов с использованием пакета статистических программ. В целом работа выполнена на высоком методическом уровне.

В **третьей главе** представлены результаты исследований по разработке экспериментальной модели судорожного синдрома при острой интоксикации фенилкарбаматом. В опытах на крысах проведена оценка его острой токсичности. На основании полученных результатов сделан вывод, что он может быть отнесён ко второму классу опасности (высокотоксичные) химической продукции. Осуществлена сравнительная оценка характера судорог при введении различных конвульсантов (фенилкарбамата, коразола и тиосемикарбазида). Отмечено, что внутрибрюшинное введение крысам фенилкарбамата в качестве модельного токсиканта позволяет воспроизводить развитие генерализованного судорожного синдрома у животных. Даны основные характеристики разработанной экспериментальной модели интоксикации этим карбаматом. В результате оценки влияния фенилкарбамата на показатели поведения и двигательной активности животных выявлено, что через 48 часов после его применения развивается угнетение большинства регистрируемых показателей, что может свидетельствовать о начинающихся органических повреждениях ЦНС, т.е. разработанную модель в перспективе можно использовать для оценки отдалённых последствий интоксикации. Выявлено, что фенилкарбамат вызывает судорожный синдром, но его интоксикация не приводит к развитию нарушений когнитивной функции в ранние сроки наблюдения (до 3 суток). Отмечено, что использованная модель по выраженности влияния карбамата на функцию сердечно-сосудистой системы сопоставима с общепризнанными моделями, используемыми для разработки противосудорожных средств, за исключением влияния токсиканта на частоту сердечных сокращений. Оценены биохимические показатели крови, а также показатели про/антиоксидантной системы крови и перекисного окисления липидов после развития судорожного синдрома. Результаты исследований позволили заключить, что помимо ингибирующего действия на АХЭ, приводящего к развитию холинергического кризиса, интоксикация этим обратимым ингибитором ХЭ вызывает нарушение обменных

процессов, поражению, помимо ЦНС, многих органов и систем организма. При гистологическом исследовании образцов тканей головного мозга у животных, отравленных фенилкарбаматом, выявлено, что даже воздействие его в субсудорожной дозе приводит к возникновению нарушений в структуре тканей головного мозга, т.е. он обладает выраженной нейротоксичностью. Эти данные были подтверждены результатами опытов по оценке апоптических TUNEL – положительных клеток в тканях головного мозга крыс. Определена динамика ингибирования активности АХЭ при отравлении фенилкарбаматом с развитием у животных судорог. В результате обобщения полученных данных автором сделано заключение, что выбранный в качестве нового модельного токсиканта карбамат обладает всеми необходимыми характеристиками для использования его в экспериментальной модели для тестирования противосудорожных средств. При валидации данной экспериментальной модели судорог отмечено, что она может быть рекомендована для проведения доклинических исследований.

Глава 4 посвящена экспериментальному обоснованию эффективности средств терапии острой интоксикации и отложенных проявлений нейротоксичности. Определена эффективность терапии лекарственными средствами по влиянию их на летальность, выраженность и продолжительность судорог у животных, отравленных фенилкарбаматом в различных дозах. Использованы: атропина сульфат (антидот при отравлениях ФОС), реланиум (препарат, применяемый для купирования судорог), а также ряд перспективных, по мнению автора, средств, в том числе карамифен, обладающий М– и NMDA-холиноблокирующими эффектами, диферидин (блокатор центральных М– и Н–холинорецепторов, периферических М– холинорецепторов), а также тригексифенидил и четыре оригинальных аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК № 1 - 4). Препараты применяли животным через 1 – 2 минуты после развития судорожного синдрома, вызванного введением фенилкарбамата в судорожной дозе (1,0 мг/кг).

Отмечено, что введение крысам исследованных препаратов на фоне интоксикации фенилкарбамата в летальной дозе (гибель 18%) способствовало высокой выживаемости животных во всех исследуемых группах. По показателям выраженности и продолжительности судорог выявлены различия в лечебном действии средств. В целом по показателям летальности и продолжительности судорог при отравлении фенилкарбаматом наибольшую лечебную эффективность проявили: карамифен, оригинальный аминоэфир вальпроевой кислоты № 3 (гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата), диферидин и реланиум, которые и были выбраны для последующего изучения.

При оценке влияния фармакотерапии на поведение и память животных, отравленных фенилкарбаматом, по результатам теста «Открытое поле», отмечено, что большая часть изученных средств не оказывала существенного влияния на двигательную активность ни в кратковременные, ни в длительные сроки наблюдения, за исключением карамифена, провоцирующего выраженное снижение ряда показателей двигательной активности в первые сутки после его введения. Наблюдалось незначительно снижение двигательной активности в группе с применением АВК № 3. Предположена возможность защитного действия эти двух средств по отношению к функции ЦНС за счёт снижения её активности.

В результате изучения памяти обучаемости крыс после интоксикации карбаматом и применения фармакотерапии в тесте «Экстраполяционное извлечение» выявлено, что использованные средства не оказывают существенного влияния на показатели их памяти.

Оценка функции сердечно-сосудистой системы по данным электрокардиографии показала, что введение АВК № 3 и карамифена способствует снижению частоты сердечных

сокращений у животных, отравленных фенилкарбаматом, Изучено влияния лечебного применения препаратов на степень ингибирования АХЭ при интоксикации карбаматом, сопровождающейся судорогами. Выявлено, что в условиях проведения фармакотерапии крысам, отравленных фенилкарбаматом, зависимость между степенью ингибирования АХЭ головного мозга, крови животных и выраженностью судорог отсутствовала.

В результате гистологического изучения срезов головного мозга крыс через 1; 7 и 14 суток после возникновения судорог, вызванных введением фенилкарбамата, и при последующим применением фармакотерапии отмечено, что наибольший нейропротективный эффект проявлял карамифен, который также оказывал выраженное противосудорожное действие.

Обобщая результаты исследования главы 3 автором сделано заключение, что при отравлении фенилкарбаматом, сопровождающимся развитием судорог, по противосудорожному действию, а также по ряду других показателей, в том числе проявлении определённых защитных свойств, связанных с предотвращением неврологических нарушений в отдалённые периоды интоксикации, наибольшую эффективность отмечена у карамифена и АВК № 3.

Глава 5. Экспериментальное обоснование фармакологической терапии нейротоксических нарушений, формирующихся после интоксикации фенилкарбаматом. Проведена сравнительная оценка влияния известных лекарственных препаратов, обладающих нейротропным и нейропротективным действием: мемантин, мексидол, ноопепт, циклодол на двигательную и исследовательскую (поведение) активность крыс после развития судорожного синдрома, вызванного фенилкарбаматом, по результатам теста «Открытое поле». Исследование проводили на 1 и 2 сутки после начала судорог. Препараты вводили внутривенно на протяжении недели. Выявлено, что наибольший нормализующий эффект по регистрируемым параметрам проявили циклодол и мемантин. При этом циклодол был наиболее эффективен только в течение 24 часов, а мемантин обладал более длительным действием. С использованием теста «условной реакции пассивного избегания болевого раздражителя» оценены когнитивные функции у животных при профилактике вышеуказанными четырьмя препаратами последствий острой интоксикации карбаматом. Выраженный нормализующий эффект на состояние когнитивных функций выявлен у крыс после введения мемантина и циклодоло. Проведена патоморфологическая и гистологическая оценка состояния ЦНС крыс, отравленных фенилкарбаматом и получавших в течение 7 суток фармакотерапию мемантином, мексидолом, ноопептом и циклодолом. Гистологическое исследование образцов тканей головного мозга осуществляли через 24, 48, 72, 96 часов, а также 5 и 7 суток после введения карбамата. Выявлено, что наиболее перспективными в качестве средств профилактики неврологических нарушений после интоксикации карбаматом являются ноопепт и мексидол. Следует отметить, что по результатам ранее проведенных исследований при оценке влияния средств фармакотерапии на поведение животных, отравленных фенилкарбаматом, в качестве перспективных средств профилактики неврологических нарушений были определены мемантин и циклодол.

В заключении кратко изложены основные итоги выполненного исследования. В частности отмечено, что наилучшие показатели по критериям противосудорожной активности, выживаемости животных, отравленных фенилкарбаматом, выявлены у карамифена и оригинального аминоксифира вольпоевой кислоты № 3. Результаты исследования обсуждены с привлечением данных научной литературы.

Анализ полученных данных позволил автору сделать 6 выводов, определить перспективы дальнейшей разработки темы, представить практические рекомендации по теме диссертационного исследования.

Оформление диссертации, включая содержание её структурных элементов, выполнено в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.4 — токсикология.

Автореферат диссертации отражает этапы и результаты проведённого исследования. Основной материал диссертации изложен на 25 страницах автореферата. Он написан хорошим литературным языком, иллюстрирован тремя рисунками и содержит 4 таблицы. Оформление автореферата диссертации выполнено в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11 – 2011.

В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

Вопросы:

1 Каковы особенности токсического действия карбаматов по сравнению с другими антихолинэстеразными веществами?

2. Что Вы имели в виду в положении № 1, выносимом на защиту, проводя аналогию проявлений судорожного синдрома у животных и человека при отравлении фенилкарбаматом, который синтезирован на базе ФГБУ НКЦТ им С.Н. Голикова ФМБА России и используется только в экспериментальных исследованиях?

3. Чем обусловлен выбор метода В.Б. Прозоровского для определения токсикометрических параметров нового карбамата – фенилкарбамата (стр. 58)? Известно, что его применение, в отличие от пробит - анализа и других методов, позволяет определить только ЛД₅₀ вещества.

Имеется ряд замечаний, не имеющих принципиального значения и не снижающих научную ценность представленного диссертационного исследования:

1. В диссертационной работе использовался только один карбамат – фенилкарбамат. В связи с этим её название следовало завершить не «карбаматами», а более конкретно – «фенилкарбаматом».

2. В выводе № 1, практических рекомендациях не указано, что фенилкарбамат по результатам оценки его острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном введении крысам относится ко второму классу опасности (высокотоксичные) химической продукции. Это важно для соблюдения техники безопасности при его использовании в экспериментах.

3. В разделе 4.2 и 4.3. при оценке лечебного действия противосудорожных средств: реланиум, АВК №1 – 4 по показателям выраженности, продолжительности судорог у крыс, отравленных фенилкарбаматом, в качестве препарата сравнения использовался атропина сульфат. Известно, что холинолитик атропин является антидотом при отравлении ФОС и не относится к противосудорожным препаратам, как, например, реланиум. Применение его в качестве препарата сравнения в данном случае недостаточно обосновано. В тоже время использование его при оценке влияния исследуемых веществ на летальность крыс, отравленных карбаматом (таблица 34), безусловно оправдано.

4. На рисунках 17 – 21 не указаны конкретные сроки гистологического исследования образцов тканей головного мозга крыс, отравленных фенилкарбаматом в дозе 0,1 мг/кг. В тексте диссертации (стр. 93) отмечается, что «...отбор материала проведен через 24, 72, 96 и 120 часов».

Заключение. Диссертационная работа Мелеховой Александры Сергеевны на тему: «Экспериментальное обоснование применения средств лечения судорожного синдрома, вызываемого карбаматами», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.4 – токсикология, является завершённым научно-квалификационным, самостоятельно выполненным трудом, в котором на основе выполненных автором экспериментальных исследований решена важная для современной токсикологии научно-практическая задача, связанная с созданием и испытанием новых лекарственных средств, эффективных при лечении отравлений карбаматами, сопровождающихся развитием судорожного синдрома.

По своей актуальности, новизне, методическому уровню, содержанию, объёму, достоверности полученных результатов, личному вкладу, теоретической и практической значимости диссертация М.А. Мелеховой полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п. 9, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции постановлений Правительства РФ № 723 от 30.06.2014, № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021, № 1690 от 26.09.2022, № 101 от 26.01.2023, № 415 от 18.03.2023, № 1786 от 26.10.2023, № 62 от 25.01.2024, № 1382 от 16.10.2024), а сам автор Мелехова Александра Сергеевна достойна присуждения искомой учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.4 — токсикология.

Официальный оппонент — Старший научный сотрудник
научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты)
Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный
научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»
Министерства обороны Российской Федерации
доктор медицинских наук (по специальности 14.00.20 — токсикология), профессор
В. П. Федонюк

«07» августа 2025 г.

Подписи доктора медицинских наук, профессора В. П. Федонюка заверяю.
Начальник отдела кадров и строевого
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

«07» 08 2025 г.

В. Н. Наумов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, дом 4.
Тел. +7 (812) 775-02-84. Адрес электронной почты: e-mail: giiivm_2@mil.ru