

© МЕЛЕХОВА А.С., ШУСТОВ Е.Б., ЗОРИНА В.Н., БЕСПАЛОВ А.Я., МЕЛЬНИКОВ М.В., БЕЛЬСКАЯ А.В., БОНДАРЕНКО А.А., 2023

Мелехова А.С., Шустов Е.Б., Зорина В.Н., Беспалов А.Я., Мельникова М.В., Бельская А.В., Бондаренко А.А.

Изучение противосудорожной активности оригинального аминоксифира вальпроевой кислоты на различных моделях судорожного синдрома

ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства, 192019, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Введение. Несмотря на значительное количество антидотов (атропин, пиридоксин) и средств купирования судорожного синдрома в клинической практике (бензодиазепины, барбитураты, вальпроаты, анестетики), существует потребность разработки новых антидотов для купирования рефрактерных судорог и рецидивирования судорожного синдрома.

Цель работы — изучение специфической фармакологической активности нового оригинального производного вальпроевой кислоты в эксперименте на моделях судорожного синдрома с различными механизмами действия.

Материал и методы. Сравнительное изучение эффективности оригинального сложного эфира ((1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид, АВК) проводилось на электрошоковой, ГАМК-литической, катехоламин-зависимой моделях судорог у крыс и мышей.

Результаты. В группе с профилактическим введением АВК в диапазоне доз 11, 27 и 65 мг/кг выявлено достоверное снижение судорожной активности по сравнению с контрольной группой, получавшей только фенилкарбамат. При межгрупповом сравнении малая доза (11 мг/кг) в большей мере оказывала влияние на латентный период возникновения фенилкарбаматных судорог, средняя (27 мг/кг) снижала длительность судорожного периода, высокая (65 мг/кг) влияла на выраженность судорог, при этом интегральный показатель (судорожная активность) не различался в подгруппах со средней и высокой дозой. Не выявлено достоверного снижения судорожной активности на моделях с применением коразола, камфоры и модели максимального электрошока.

Ограничения исследования. Тестирование новых фармацевтических субстанций (изучение эффективности и безопасности) должно проводиться на лабораторных животных до подтверждения эффективности на человеке. Количество животных, использованных в исследовании, было ограничено необходимостью соответствия биоэтическим принципам, и составило по 6 особей в каждой группе.

Заключение. Высвобождение вальпроевой кислоты в процессе метаболизма АВК происходит медленно и её концентрации недостаточно для реализации универсальной противосудорожной активности АВК. Необходимо дополнительно изучить влияние на когнитивные функции и нейропротекторные свойства. Поскольку ранее продемонстрирована антидотная эффективность, превосходящая атропин, АВК рекомендован для разработки в качестве антидота при отравлении фосфорорганическими соединениями.

Ключевые слова: нейротоксиканты; противосудорожные средства; вальпроаты; судорожный синдром; антидоты

Соблюдение этических стандартов. Работа с животными одобрена биоэтической комиссией ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России.

Для цитирования: Мелехова А.С., Шустов Е.Б., Зорина В.Н., Беспалов А.Я., Мельникова М.В., Бельская А.В., Бондаренко А.А. Изучение противосудорожной активности оригинального аминоксифира вальпроевой кислоты на различных моделях судорожного синдрома. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(5): 288–296. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-5-288-296>

Для корреспонденции: Зорина Вероника Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной токсикологии и фармакологии отдела токсикологии ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: nilimmun@yandex.ru

Участие авторов: Мелехова А.С. – проведение научных исследований (эксперименты на животных), обработка материала, написание текста; Мельникова М.В., Бельская А.В., Бондаренко А.А. – проведение научных исследований (эксперименты на животных); Беспалов А.Я. – разработка и синтез аминоксифира вальпроевой кислоты для проведения экспериментов; Зорина В.Н. – обработка материала, написание текста; Шустов Е.Б. – научное руководство при проведении исследований, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 22 июня 2023 / Принята к печати: 19 октября 2023 / Опубликовано: 30 октября 2023

Aleksandra S. Melekhova, Evgeniy B. Shustov, Veronika N. Zorina, Aleksandr Ya. Beshpalov,
Margarita V. Mel'nikova, Alisa V. Belskaya, Anastasiya A. Bondarenko

Study of the anticonvulsant activity of the original valproic acid amino ester in various models of convulsive syndrome

The Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

Introduction. Despite a significant number of antidotes (atropine, pyridoxine) and anti-seizure drugs in clinical practice (benzodiazepines, barbiturates, valproates, anesthetics), the development of new antidotes for the relief of refractory seizures and recurrence of convulsive syndrome is actual problem.

The aim of the work was to study the specific pharmacological activity of a new original derivative of valproic acid in an experiment on models of convulsive syndrome with different mechanisms of action.

Material and methods. A comparative study of the effectiveness of the original substance ((1-methylpiperidin-4-yl)-2-propylpentanoate hydrochloride, VAA) was carried out on electroshock, GABA-lytic, catecholamine-dependent seizure models in rats and mice.

Results. A significant decrease in seizure activity was revealed in the group with prophylactic administration of VAA in the dose range of 11, 27 and 65 mg/kg in comparison with the control group received only phenylcarbamate. In an intergroup comparison, a low dose (11 mg/kg) more than others had an effect on the latent period of the onset of phenylcarbamate seizures, an average dose (27 mg/kg) reduced the duration of the seizure period, a high dose (65 mg/kg) affected the severity of convulsions, while the integral indicator (convulsive activity) did not differ between the medium and high dose subgroups. There was no significant decrease in seizure activity in models with the use of corazol, camphor, and the model of maximum electric shock.

Limitations. Testing of new pharmaceutical substances (study of efficacy and safety) should be carried out on laboratory animals before confirmation of efficacy in humans. The quantity of animals was limited by the need to comply with bioethical principles and sufficient number for statistically significant results and amounted 6 individuals in each group.

Conclusion. The release of valproic acid during the metabolism of VAA is slow and its concentration is insufficient to realize the universal anticonvulsant activity of VAA. It is necessary to further study the effect on cognitive functions and neuroprotective properties. Since antidote efficacy superior to atropine has been previously demonstrated, VAA is recommended for development as an antidote for organophosphorus poisoning.

Keywords: neurotoxicants; anticonvulsants; valproates; convulsive syndrome; antidotes

Compliance with ethical standards. The experiment with animals was approved by the bioethical commission of the Golikov Research Center of Toxicology.

For citation: Melekhova A.S., Shustov E.B., Zorina V.N., Beshpalov A.Ya., Mel'nikova M.V., Belskaya A.V., Bondarenko A.A. Study of the anticonvulsant activity of the original valproic acid amino ester in various models of convulsive syndrome. *Toksikologicheskii vestnik / Toxicological Review*. 2023; 31(5): 288-296. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-5-288-296> (In Russian)

For correspondence: Veronika N. Zorina, Doctor of Biological Science, Leading Researcher of laboratory of applied toxicology and pharmacology of toxicology department of Golikov Research Center of Toxicology, 192019 St. Petersburg, Russian Federation. E-mail: nilimmun@yandex.ru

Information about authors :

Melekhova A.S., <https://orcid.org/0000-0003-1803-3815>

Zorina V.N., <https://orcid.org/0000-0001-9183-7663>

Shustov E.B., <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>

Beshpalov A.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-8118-8396>

Mel'nikova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2996-5151>

Belskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9343-4144>

Bondarenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9754-1537>

Scopus Author ID: 57140576000

Scopus Author ID: 57075004700

Scopus Author ID: 57224461637

Scopus Author ID: 26663551900

Author contributions: Melekhova A.S. – conducting scientific research (experiments on animals), material processing, text writing; Melnikova M.V., Belskaya A.V., Bondarenko A.A. – conducting scientific research (experiments on animals); Beshpalov A.Ya. – development and synthesis of valproic acid amino ester for experiments; Zorina V.N. – material processing, text writing; Shustov E.B. – scientific guidance during research, text editing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was carried out according to the research plan within the framework of a state assignment.

Received: June 22, 2023 / Accepted: October 19, 2023 / Published: October 30, 2023

Введение

Поражение нейротоксикантами судорожного действия приводит к развитию генерализованного судорожного синдрома (ГСС) и эпилептического статуса, которые могут длиться 30 мин и более, сопровождаясь глубокими органическими повреждениями головного мозга, нейровоспалением и гибелью нейронов, значительно повышая риск формирования неврологического и когнитивного дефицита, поведенческих нарушений и хронической эпилепсии в долговременной перспективе [1, 2]. Нейротоксиканты, провоцирующие развитие ГСС, могут иметь различное происхождение (фосфорорганические соединения (ФОС) и карбаматы в составе бытовой химии, агрохимикаты или лекарства, компоненты ракетных топлив, наркотические средства, антибиотики), механизм их действия также различается (нейростимуляторы, холинергические соединения, антагонисты гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), агонисты глутамата, антагонисты гистамина, антагонисты аденозина и другие) [3]. Ежегодно в мире фиксируется более 1 млн случаев отравления ФОС, около 10% пострадавших умирают [4], частота поражения другими конвульсантами значительно меньше. Наиболее распространённым средством для профилактики и раннего купирования судорожного синдрома при отравлении ФОС является атропин (монотерапия или в комбинации с оксимами) [4, 5], однако действие атропина и оксимов ограничено во времени: 5–10 мин после воздействия [5, 6] и повторное применение не рекомендуется, вследствие значительного снижения эффективности [4, 6]. При отравлении производными гидразинов и некоторыми антибиотиками в качестве антидота применяется пиридоксин [3].

Несмотря на наличие принципиальных различий в механизмах действия антидотов, схема дальнейшего купирования ГСС как при отравлении нейротоксикантами, так и при истинном эпилептическом припадке, во многом схожа [7, 8]. В течение первых 30 мин рекомендовано применение препаратов бензодиазепинового ряда (лоразепама, диазепама) или мидазолама. Однако установлено, что при отсроченном введении (5 мин и более), бензодиазепины не обеспечивают длительного контроля над судорогами, эффективность мидазолама также снижается [1]. При продолжении или рецидивировании судорог чаще всего применяют схему купирования ГСС при истинной эпилепсии, с использованием левитирацетама, фенобарбитала, фенитоина, фосфенитоина или вальпроатов, примерно с 50%

эффективностью. При неэффективном применении вышеупомянутых средств состояние приравнивают к рефрактерному эпилептическому статусу, дополнительно назначают общие анестетики (пентобарбитал или пропофол) [4, 7, 8]. Большинство вышеперечисленных средств (за исключением антидотов на основе бензодиазепинов или мидазолама) рекомендуется вводить под контролем врача, желательно в условиях стационара. При рецидивировании ГСС, в том числе при длительной транспортировке пострадавшего, их повторное ведение нежелательно, поскольку эффективность значительно снижается, растёт количество нежелательных побочных эффектов [4, 6].

Необходимо отметить, что из вышеперечисленных средств комплексное действие (не только купирование ГСС, но и нейропротекция) оказывают только вальпроевая кислота и её производные. Применение вальпроатов (в отличие от бензодиазепинов и барбитуратов) не сопровождается ухудшением гемодинамики, угнетением дыхания, нарушениями сознания, не развивается привыкание [9]. Однако эффективная доза вальпроевой кислоты при ГСС на фоне отравления нейротоксикантами очень высока [10], что ограничивает эффективность её применения.

Для повышения эффективности противосудорожной терапии ГСС при остром отравлении ведётся разработка комплексных подходов, например, совместное применение диазепама и пентобарбитала, атропина и кетамина [5, 7], диазепама и вальпроата [2], вальпроевой кислоты, кетамина и мидазолама. В доступной зарубежной литературе обнаружены сведения о возможности подобного лечения, в том числе и при отравлении ФОС, используемых в составе боевых отравляющих веществ [9, 11]. Ещё одним направлением является синтез производных вальпроевой кислоты с повышенной эффективностью. Например, валноктамид более эффективен при отравлении ФОС, в том числе при отложенном применении (через 20 мин), и имеет меньше побочных эффектов по сравнению с вальпроатом натрия [8, 10]. Сек-бутилпропилацетамид (SPD) является более мощным гомологом валноктамида, при дозе в 4–5 раз меньше, чем эффективная доза вальпроевой кислоты, действует даже через 30 мин, однако малорастворим [10], что ограничивает возможности его применения.

Необходимо отметить, что ни одна из вышеперечисленных разработок пока не вышла за рамки научных экспериментов, изучаемые вещества не зарегистрированы как готовые лекарственные формы, новые схемы лечения не входят в перечни

клинических рекомендаций. Это обосновывает необходимость разработки новых средств профилактики и купирования ГСС.

Одним из перспективных направлений в разработке подобных лекарственных средств является синтез комплексных соединений, фрагменты которых имеют свою специфическую активность. Компоненты подобного «пролекарства» должны высвобождаться из общей молекулы в процессе метаболизма уже после введения в организм. В ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова уже много лет ведутся работы по синтезу различных соединений, обладающих противосудорожной активностью. В числе перспективных разработок — оригинальная молекула на основе аминоксифира вальпроевой кислоты, имеющая фрагмент, способный взаимодействовать с анионным центром М-холинорецепторов в центральной нервной системе (ЦНС), блокируя рецепторы от перевозбуждения избытком ацетилхолина и обеспечивая антидотный эффект при отравлении веществами с антихолинэстеразной активностью.

Для всесторонней проверки специфической (противосудорожной) фармакологической активности новых субстанций необходимо проводить серию экспериментов с применением моделей судорожного синдрома с различными механизмами действия. К числу известных моделей ГСС можно отнести модель максимального электрошока, а также модели ГСС с использованием пилокарпина (М-холиномиметик), параоксона, каиновой кислоты, диизопропилфторфосфата [1, 2], фенилкарбамата (обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы), пентилентетразола (неконкурентный антагонист ГАМК_A-рецептора, способный активировать также натриевые каналы нейронов), модель стрихниновых судорог, камфорную модель [12]. Показателями эффективности исследуемого средства фармакологической терапии чаще всего являются латентный период, выраженность и продолжительность судорожного синдрома или летальность, вызванные судорожным агентом.

Цель исследования — изучение специфической фармакологической активности нового оригинального производного вальпроевой кислоты в эксперименте на моделях судорожного синдрома с различными механизмами действия.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использован оригинальный сложный эфир 2-пропилпентановой кислоты и N-метилпиперидин-4-ола. Образец (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпен-

таноата гидрохлорида (аминоксифир вальпроевой кислоты, АВК; формула $C_{14}H_{27}NO_2 \times HCl$; молекулярная масса 277,835 Да) был синтезирован *de novo* на базе лаборатории синтеза лекарственных препаратов ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, чистота составляла >95%, подлинность подтверждена методами УЭЖХ-МС и протонной ЯМР-спектроскопии.

Изучена противосудорожная активность АВК при профилактической схеме введения (за 30 мин до введения токсиканта). В качестве основной дозы применялось введение АВК в виде 1% водного раствора, 27 мг/кг. Доза подобрана по результатам предварительных экспериментов, с учетом того, что одним из предполагаемых путей реализации противосудорожной активности является высвобождение вальпроевой кислоты в процессе гидролиза соединения (эквивалентная доза вальпроевой кислоты составляет 20 мг/кг).

Для изучения фармакологической активности АВК в качестве тест-системы были использованы беспородные белые мыши самцы и беспородные белые крысы самцы, возраст 3 мес, поступившие из питомника НИЦ «Курчатовский институт» — ПЛЖ «Рапполово». Животных содержали в стандартных условиях, в соответствии с правилами, утвержденными санитарным врачом РФ от 29.08.2014 г. № 51, корм и вода давались *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (22 ± 3 °C и относительная влажность воздуха 30–70%) с 12-часовым циклом освещения. Перед проведением экспериментов животные были разделены на контрольные (получавшие только соответствующий нейротоксикант) и экспериментальные группы. Масса тела животных к моменту проведения экспериментов составляла 18–22 г для мышей и 180–220 г для крыс. Возраст и масса животных в контрольных и экспериментальных группах достоверно не различались.

В эксперименте с применением токсикантов химической природы, вызывающих развитие генерализованных судорог, оценивалось влияние:

1) фенилкарбамата (ФК) в дозе 1 мг/кг, при введении крысам внутрибрюшинно;

2) пентилентетразола (коразол) в дозе 65 мг/кг, при введении крысам подкожно в область шейного отдела спины;

3) камфоры (масляный раствор) в дозе 715 мг/кг, при введении мышам внутрибрюшинно. Введение вышеперечисленных токсикантов вызывало ГСС у 100% контрольных животных.

Для оценки выраженности судорог при моделировании судорожных состояний на крысах использовалась модификация шкалы Racine,

Таблица 1 / Table 1

Влияние аминоэфира вальпроевой кислоты (ABK) в дозе 27 мг/кг на судорожную активность (площадь под кривой судорог), вызванную нейротоксикантами химической природы у крыс
The effect of valproic acid amino ester (VAA) at a dose of 27 mg/kg on seizure activity (area under the seizure curve) caused by chemical neurotoxicants in rats

Вещество, доза	Группа	Судорожная активность (площадь под кривой), балл · мин				p-уровень (U-тест Манна-Уитни)
		численность выборки, n	Me (медиана)	LQ (нижняя квартиль)	UQ (верхняя квартиль)	
Фенилкарбамат, 1 мг/кг	Контроль	6	321,25	256,50	337,50	0,0002
	ABK	6	79,8	71,5	81,5	
Коразол, 65 мг/кг	Контроль	6	59,50	48,00	65,00	0,589
	ABK	6	68,50	22,50	93,50	
Камфора, 715 мг/кг	Контроль	6	52,25	20,00	80,50	0,818
	ABK	6	58,00	28,50	68,50	

в которой моторные нарушения характеризовались на следующих уровнях:

- уровень 0 — нет поведенческих изменений;
- уровень 1 — снижение активности;
- уровень 2 — движения ртом/головы, жевание, кивание головой;
- уровень 3 — унилатеральный/билатеральный клонус передних лап без роющих движений, симптом Штрауба, вытягивание тела;
- уровень 4 — клонус обеих передних конечностей с роющими движениями;
- уровень 5 — вытягивание тела и лежащее положение;
- уровень 6 — полноценные тонические судороги, зачастую заканчивающиеся гибелью животных [13].

В эксперименте с применением метода максимального электрошока (МЭШ) на мышах, через корнеальные электроды проводились электрические стимулы (50 Гц, 50 мА) длительностью 0,2 с. Максимальная тоническая экстензия задних конечностей возникала у 100% контрольных животных. Для оценки эффективности применения ABK использовалась шкала, где 1 балл — подергивание, 2 балла — клонические судороги, 3 балла — тоническая экстензия задних конечностей и 4 балла — гибель животного. Поскольку в тесте максимального электрошока судороги у животных развиваются сразу же при воздействии (латентный период судорог отсутствует), состояние мышей оценивалось по выраженности судорог в баллах и по продолжительности судорог в минутах.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов Microsoft Excel и Statistica 10.0, с применением методов непараметрической статистики. Для оценки различий между двумя группами был ис-

пользован U-тест Манна-Уитни (Mann–Whitney test). Для сравнения нескольких групп (более двух) применяли ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (Kruskal–Wallis ANOVA). В случае установления статистически значимых различий между всеми группами, для выявления различий между отдельными группами использовали апостериорный метод «Сравнение средних рангов для всех групп» (непараметрический Dunn-test), который учитывает проблему множественных сравнений. Величина ошибки для подтверждения нулевой гипотезы (p) > 0,05. Сравнительную оценку исследуемых параметров проводили с учётом поправки на множественность сравнения. С целью компенсации «проблемы множественных сравнений» использовали скорректированный уровень статистической значимости с учётом поправки Бонферрони, который рассчитывали по формуле:

$$p' = 1 - 0,951 / n,$$

где n — количество проводимых сравнений.

При трёх сравниваемых группах проводили 3 сравнения, скорректированный уровень значимости составил 0,025.

Результаты

Межгрупповая сравнительная оценка выраженности судорог, вызванных внутрибрюшинным введением фенилкарбамата в дозе 1 мг/кг, через 30 мин после внутримышечного введения аминоэфира вальпроевой кислоты в дозе 27 мг/кг продемонстрировала высокодостоверные различия в судорожной активности между контрольной группой (ФК без лечения) и группой, получившей ABK (табл. 1).

Таблица 2 / Table 2

Влияние аминоэфира вальпроевой кислоты в дозе 27 мг/кг на выраженность судорог (в баллах) и на продолжительность судорог, вызванных электрическим стимулом, подаваемым через корнеальные электроды у мышей

The effect of valproic acid amino ester at a dose of 27 mg/kg on the severity of seizures (in points) and on the duration of seizures induced by an electrical stimulus applied through corneal electrodes in mice

Показатель	Группа	Численность выборки, <i>n</i>	Me (медиана)	LQ (нижняя квартиль)	UQ (верхняя квартиль)	<i>p</i> -уровень (U-тест Манна-Уитни)
Выраженность судорог, баллы	Контроль	10	3,00	2,00	3,00	0,631
	ABK	10	3,00	1,00	3,00	
Продолжительность судорог, мин	Контроль	10	23,50	10,00	60,00	0,971
	ABK	10	26,50	10,00	67,00	

Таблица 3 / Table 3

Влияние разных доз аминоэфира вальпроевой кислоты (ABK) на судорожную активность, вызванную фенолкарбаматом в дозе 1 мг/кг

Effect of different doses of valproic acid amino ester (VAA) on seizure activity induced by phenylcarbamate at a dose of 1 mg/kg

Группа	Судорожная активность, балл · мин				<i>p</i> -уровень (Kruskal–Wallis ANOVA)
	численность выборки, <i>n</i>	Me (медиана)	LQ (нижняя квартиль)	UQ (верхняя квартиль)	
Контроль (ФК)	6	321,25	256,50	337,50	0,0002*
ABK (11 мг/кг)	6	167,0	163,0	175,5	
ABK (27 мг/кг)	6	79,8	71,5	81,5	
ABK (65 мг/кг)	6	72,5	71,5	72,5	

Примечание. * – различия между всеми группами статистически значимы ($p < 0,05$).

Межгрупповая сравнительная оценка выраженности судорог, вызванных подкожным введением коразола в дозе 65 мг/кг после внутримышечного введения ABK в дозе 27 мг/кг, выявила отсутствие статистически достоверных различий между контролем и животными, получившими ABK (см. табл. 1).

При сравнении судорожной активности у животных после внутрибрюшинного введения камфоры в дозе 715 мг/кг также не выявлено достоверных различий между группой, получавшей ABK и контрольной группой (см. табл. 1).

Межгрупповая сравнительная оценка выраженности судорог в баллах, вызванных электрическим стимулом, подаваемым через корнеальные электроды после внутримышечного введения ABK в дозе 27 мг/кг, продемонстрировала отсутствие достоверных различий между контрольной группой и животными, которым вводили ABK. Анализ продолжительности судорог также не выявил существенной разницы между группами (табл. 2).

Поскольку на модели фенолкарбаматных судорог было выявлено выраженное противосудорожное действие ABK, был проведён дополнительный анализ эффективности ABK при введении трех различных доз (табл. 3).

Установлено, что ABK во всем диапазоне доз снижает судорожную активность. В низкой дозе (11 мг/кг) этот эффект умеренный, в средней и повышенной дозе – выраженный, причем разница между эффектом средней и высокой дозы не является существенной (табл. 4).

Таблица 4 / Table 4

Квадратичная матрица апостериорных сравнений (*p*-уровни) выраженности судорог в исследуемых группах с использованием Dunn-test

Quadratic matrix of post hoc comparisons (*p*-levels) of seizure severity in study groups using the Dunn-test

Группа (вещество, доза)	Контроль (ФК)	ФК + ABK		
		11 мг/кг	27 мг/кг	65 мг/кг
Контроль (ФК)	–	0,8499	0,0045*	0,0004*
ФК + ABK 11 мг/кг	0,8499	–	0,3459	0,0723
ФК + ABK 27 мг/кг	0,0045*	0,3459	–	1,0000
ФК + ABK 65 мг/кг	0,0004*	0,0723	1,0000	–

Примечание. * – различия статистически значимы ($p < 0,05$) для группы в строке по сравнению с группой, представленной в соответствующем столбце.

Анализ противосудорожной активности аминоэфира вальпроевой кислоты по компонентам судорожного действия при введении фенолкарбамата в дозе 1 мг/кг
Analysis of the anticonvulsant activity of valproic acid amino ester according to the components of the convulsive action when administered phenylcarbamate at a dose of 1 mg/kg

Показатель	Контроль (ФК)	АВК		
		11 мг/кг	27 мг/кг	65 мг/кг
Судорожная активность, баллы в мин	304 ± 16	163 ± 3 (–45%)	76,2 ± 3,1 (–75%)	72,5 ± 0,7 (–76%)
<i>p</i>		4 · 10 ^{–4}	2 · 10 ^{–5}	4 · 10 ^{–5}
Латентный период, мин	2,5 ± 0,4	5,7 ± 0,7 (+127%)	0,7 ± 0,3 (–75%)	4,0 ± 0,1 (+60%)
<i>p</i>		4 · 10 ^{–4}	0,02	0,020
Выраженность судорог средняя, баллы	3,6 ± 0,2	2,3 ± 0,1 (–36%)	2,0 ± 0,1 (–45%)	1,6 ± 0,1 (–54%)
<i>p</i>		9 · 10 ^{–4}	2 · 10 ^{–4}	2 · 10 ^{–4}
Выраженность судорог максимальная, баллы	3,7 ± 0,2	3,0 ± 0,0 (–18%)	2,8 ± 0,2 (–23%)	2,0 ± 0,0 (–45%)
<i>p</i>		0,02	0,01	6 · 10 ^{–4}
Длительность судорог, мин	85,8 ± 0,9	72,2 ± 1,9 (–16%)	39,3 ± 0,4 (–54%)	45,8 ± 0,1 (–47%)
<i>p</i>		3 · 10 ^{–4}	5 · 10 ^{–5}	5 · 10 ^{–11}
Летальность во время судорог, %	0	0	0	0

Изучены дополнительные признаки судорожного действия фенолкарбамата — латентный период, максимальная и средняя выраженность судорог, их длительность при введении трех различных доз АВК. Результаты эксперимента представлены в табл. 5.

Установлено, что АВК в малой дозе (11 мг/кг) преимущественно оказывает влияние на латентный период возникновения фенолкарбаматных судорог, и, в меньшей степени, на выраженность и длительность судорог. В средней рабочей дозе (27 мг/кг) основной эффект АВК реализуется в снижении длительности судорожного периода, при этом влияние на выраженность судорог несколько ниже.

В высоких дозах (65 мг/кг) АВК в большей степени влияет на выраженность судорог как на максимальную, так и на среднюю за период их проявления, и слабее — на их длительность.

Важно отметить, что интегральный показатель — судорожная активность — в подгруппах со средней и высокой дозой препарата не различался, что позволяет говорить о сопоставимой противосудорожной эффективности.

Обсуждение

Ограничения данного исследования включают в себя необходимость тестирования новых веществ на лабораторных животных для изучения эффективности и безопасности до подтверждения эффективности на человеке. В данном исследовании в качестве тест-системы были ис-

пользованы крысы и мыши как наиболее предпочтительный вид грызунов в токсикологических исследованиях. Количество животных, использованных в исследовании, было ограничено необходимостью соответствия биоэтическим принципам и составляло по 6 особей в каждой группе. Соответствие исследования биоэтическим нормам подтверждено положительным заключением биоэтической комиссии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России. Количество животных, используемых в исследовании, было достаточным для получения статистически достоверных результатов изучаемых параметров.

Согласно полученным результатам, противосудорожное действие АВК не является универсальным. В проведенном исследовании не было выявлено противосудорожной активности на электрошоковой, ГАМК-литической, катехоламин-зависимой моделях судорог. Известно, что вальпроевая кислота отличается универсальным противосудорожным действием на моделях камфорных, пикротоксиновых и коразоловых судорог [14], а также на моделях хронической эпилептической активности [12]. Механизмы действия вальпроевой кислоты связаны с ингибированием ГАМК-аминотрансферазы, активацией глутаматдекарбоксилазы, снижением чувствительности потенциал-чувствительных натриевых и кальциевых каналов нейронов [9]. Таким образом, можно предположить, что предполагаемое высвобождение вальпроевой кислоты в процессе метаболизма АВК происходит медленно и содержание образующейся вальпроевой кислоты в течение

30 мин после введения недостаточно для реализации универсальной противосудорожной активности АВК. Тем не менее, необходимо изучить другие возможные эффекты АВК (нейропротекция, сохранение когнитивных функций), а также эффекты повторного введения в дополнительных экспериментах, для однозначного заключения о возможностях его применения в качестве профилактического противосудорожного средства при истинной эпилепсии.

Выявленная высокая профилактическая активность АВК в отношении ацетилхолин-индуцируемых судорог, связанных с воздействием на организм животных ингибиторов ацетилхолинэстеразы, позволяет предположить наличие у АВК центральных холинолитических свойств, характерных для катионной части его комплексной молекулы. Учитывая, что ранее в эксперименте на животных было продемонстрировано двукратное уменьшение продолжительности судорожного синдрома при

острых отравлениях ингибиторами ацетилхолинэстеразы на фоне профилактического введения АВК, по сравнению с животными, которым вводился атропин [15], можно рекомендовать субстанцию АВК в качестве основы для разработки антидотов при отравлении фосфорорганическими соединениями.

Заключение

Разработанный в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России оригинальный аминоксир вальпроовой кислоты ((1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид) перспективен для разработки антидота при отравлении фосфорорганическими соединениями. Субстанция не подходит для терапии острых отравлений нейротоксикантами иной химической природы, возможность применения для лечения истинной эпилепсии требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–11, 13 см. в References)

- Егорова Е.В., Дмитренко Д.В., Усольцева А.А., Иптышев А.М., Шнайдер Н.А., Насырова Р.Ф. Моделирование хронической эпилепсии на животных с помощью химических методов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18(4): 185–96. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-4-185-196>
- Рыбальченко Т.Л., Штрыгол С.Ю., Георгианц В.А. Определение спектра противосудорожного действия новых антиконвульсантов – производных 1,2,3-триазола и 1,3,4-оксадиазола. *Научные ведомости. Серия Медицина, фармацевтика*. 2014; 26(1): 199–203.
- Мелехова А.С., Петров А.Н., Беспалов А.Я., Мельникова М.В., Зацепин Э.П. и др. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжёлого отравления карбаматом. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2019; 20(2): 294–306.
- Wu X., Kuruba R., Reddy D.S. Midazolam-Resistant Seizures and Brain Injury after Acute Intoxication of Diisopropylfluorophosphate, an Organophosphate Pesticide and Surrogate for Nerve Agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018; 367(2): 302–21. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.247106>
- Araujo Furtado M., Rossetti F., Chanda S., Yourick D. Exposure to nerveagents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology*. 2012; 33(6): 1476–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.001>
- Phillips H.N., Tormoehlen L. Toxin-Induced Seizures. *NeuroClin*. 2020; 38(4): 867–79. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2020.07.004>
- Alozi M., Rawas-Qalaji M. Treating organophosphates poisoning: management challenges and potential solutions. *Crit Rev Toxicol*. 2020; 50(9): 764–79. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1837069>
- Myhrer T., Aas P. Choice of approaches in developing novel medical counter measures for nerve agent poisoning. *Neurotoxicology*. 2014; 44: 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.04.011>
- Reddy D.S. Mechanism-based novel antidotes for organophosphate neurotoxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2019; 14: 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.08.001>
- Morgan J.E., Wilson S.C., Travis B.J., Bagri K.H., Pagarigan K.T., Belski H.M., et al. Refractory and Super-Refractory Status Epilepticus in Nerve Agent-Poisoned Rats Following Application of Standard Clinical Treatment Guidelines. *Front Neurosci*. 2021; 15: 732213. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.732213>
- Amengual-Gual M., Sánchez Fernández I., Wainwright M.S. Novel drugs and early polypharmacotherapy in status epilepticus. *Seizure*. 2019; 68: 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.08.004>
- Romoli M., Mazzocchetti P., D'Alonzo R., Siliquini S., Rinaldi V.E., Verrotti A., et al. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Curr Neuropharmacol*. 2019; 17(10): 926–46. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
- Haines K.M., Matson L.M., Dunn E.N., Ardinger C.E., Stubbs R.L., Bibi D., et al. Comparative efficacy of valnoctamide and sec-butylpropylacetamide (SPD) in terminating nerve agent-induced seizures in pediatric rats. *Epilepsia*. 2019; 60(2): 315–21. <https://doi.org/10.1111/epi.14630>
- Niquet J., Lumley L., Baldwin R., Rossetti F., Suchomelova L., Naylor D., et al. Rational polytherapy in the treatment of cholinergic seizures. *Neurobiol Dis*. 2020; 133: 104537. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104537>
- Egorova E.V., Dmitrenko D.V., Usoltseva A.A., Iptyshev A.M., Shnayder N.A., Nasyrova R.F. Modeling of chronic epilepsy in animals through chemical methods. *Byulleten' sibirskoj mediciny*. 2019; 18(4): 185–96. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-4-185-196> (in Russian)
- Lüttjohann A., Fabene P.F., van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav*. 2009; 98 (5): 579–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>
- Rubalchenko T.L., Shtrygol S.Y., Georgiyants V.A. Definition of spectrum of the anticonvulsant activity for the new anticonvulsants – 1,2,3-triazole and 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Nauchny'e vedomosti. Seriya Medicina, farmaciya*. 2014; 26(1): 199–203. (in Russian)
- Melekhova A.S., Petrov A.N., Bepalov A.Y., Melnikova M.V., Zatselin E.P. et al. Experimental pharmacotherapy of convulsive syndrome in the stimulation of severe carbamate poisoning. *Rossiiskij biomeditsinskij zhurnal*. 2019; 20(2): 294–306. (in Russian)

ОБ АВТОРАХ:

Мелехова Александра Сергеевна (Aleksandra S. Melekhova) – старший научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: melehovaalexandra@gmail.com

Шустов Евгений Борисович (Evgeniy B. Shustov) – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научного информационно-аналитического отдела ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: shustov-msk@mail.ru

Зорина Вероника Николаевна (Veronika N. Zorina) – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной токсикологии и фармакологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: nilimmun@yandex.ru

Беспалов Александр Яковлевич (Aleksandr Ya. Bespalov) – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории синтеза лекарственных препаратов ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: albsp2011@yandex.ru

Мельникова Маргарита Викторовна (Margarita V. Mel'nikova) – научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: margarita10108@mail.ru

Бельская Алиса Владимировна (Alisa V. Belskaya) – научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: belskayaalisa@gmail.com

Бондаренко Анастасия Александровна (Anastasiya A. Bondarenko) – научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. E-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

