

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И КРОВИ КРЫС ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ СУДОРОГ, ВЫЗВАННЫХ КАРБАМАТОМ

А.С. Мелехова\*, Л.Г. Кубарская, А.Н. Петров, А.Я. Беспалов, А.Б. Верведа,  
А.В. Бельская, М.В. Мельникова

ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»  
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

Для моделирования судорожного синдрома внутривенно вводили фенокарбамат в дозе 1 мг/кг. В качестве потенциальных противосудорожных лекарственных средств были исследованы аминоэфир вальпроевой кислоты (43 мг/кг), карамифен (50 мг/кг), диферидин (2 мг/кг). Кровь и ткань головного мозга для определения ацетилхолинэстеразы (АХЭ) отбирали через 10, 30, 60 мин, 6 и 24 ч после введения ксенобиотика. На основании полученных данных можно сделать предварительное заключение о том, что при отравлении обратимыми ингибиторами АХЭ только начальные проявления судорожной активности обусловлены накоплением ацетилхолина в синапсах ЦНС (вследствие угнетения активности АХЭ), а за процессы дальнейшего поддержания и рецидивирования судорог ответственны другие механизмы, не связанные с ингибированием АХЭ.

**Ключевые слова:** карбаматы, фенокарбамат, острое отравление, судороги, диферидин, карамифен, аминоэфир вальпроевой кислоты

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Мелехова А.С., Кубарская Л.Г., Петров А.Н., Беспалов А.Я., Верведа А.Б., Бельская А.В., Мельникова М.В. Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и крови крыс при фармакологической коррекции судорог, вызванных карбаматом. *Биомедицина*. 2022;18(3):27–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-27-31>

Поступила 29.03.2022

Принята после доработки 11.04.2022

Опубликована 10.09.2022

## DYNAMICS OF CHANGES IN ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE BRAIN AND BLOOD OF RATS DURING PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF SEIZURES CAUSED BY CARBAMATE

Aleksandra S. Melekhova\*, Larisa G. Kubarskaya, Aleksandr N. Petrov,  
Aleksandr Ya. Bepalov, Aleksey B. Verveda, Alisa V. Belskaya, Margarita V. Melnikova

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

To simulate a convulsive syndrome, phenylcarbamate was administered intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg. Valproic acid aminoester (43 mg/kg), caramiphen (50 mg/kg), and diferidine (2 mg/kg) were investigated as potential anticonvulsant drugs. Blood and brain tissue for the determination of acetylcholinesterase (AChE) were taken at 10, 30, 60 minutes, 6 and 24 hours after administration of the xenobiotic. In case

of poisoning with reversible inhibitors of AChE and accumulation of acetylcholine in the CNS synapses (due to inhibition of AChE activity), only the initial manifestations of convulsive activity are caused, and other mechanisms not associated with AChE inhibition are responsible for the processes of further maintenance and recurrence of seizures.

**Keywords:** carbamates, phenylcarbamate, acute poisoning, seizures, diphenhydramine, carbamazepine, amino ester of valproic acid

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Melekhova A.S., Kubarskaya L.G., Petrov A.N., Bespalov A.Ya., Verveda A.B., Belskaya A.V., Melnikova M.V. Dynamics of Changes in Acetylcholinesterase Activity in the Brain and Blood of Rats During Pharmacological Correction of Seizures Caused by Carbamate. *Journal Biomed.* 2022;18(3): 27–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-27-31>

Submitted 29.03.2022

Revised 11.04.2022

Published 10.09.2022

## Введение

Будущее место среди интоксикаций химической этиологии занимают отравления нейротропными ядами. К числу приоритетных химических веществ судорожного действия, требующих оказания медицинской помощи пострадавшим в чрезвычайных ситуациях химической природы и при массовых бытовых отравлениях, следует отнести вещества антихолинэстеразного действия — фосфорорганические соединения (ФОС) и карбаматы [4]. Основными причинами развития судорожных состояний в результате прямого действия конвульсантов является дисбаланс между основными возбуждающими и угнетающими нейромедиаторными системами головного мозга.

Карбаматы — производные (сложные эфиры и соли) карбаминовой кислоты. По механизму действия карбаматы являются обратимыми ингибиторами АХЭ. В основе ингибирования АХЭ лежит карбамирование её активного центра. Однако вследствие спонтанного декарбамилирования фермента активность АХЭ восстанавливается, как правило, в пределах 4–6 ч [1].

**Целью работы** явилось изучение изменения активности АХЭ в крови и головном мозге крыс при тяжёлом отравлении фенолкарбаматом (ФК) и фармакологической коррекции.

## Материалы и методы

В работе были использованы белые беспородные крысы-самцы в возрасте 3 мес. массой 200–220 г, источник получения — ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 и ГОСТ 33216-2014 от 01.07.2016. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Для моделирования судорожного синдрома в предварительных экспериментах определили дозу ФК (1 мг/кг) при внутрибрюшинном введении, вызывающую судорожный синдром у большинства крыс с минимальной гибелью животных. Средства фармакотерапии токсического судорожного синдрома вводили внутрибрюшинно, однократно, сразу при развитии судорог 4-го уровня по шкале Racine [5]. Шкала подразделяется на 6 уровней от снижения двигательной активности до полноценных тонических судорог.

В качестве средств для фармакологической терапии судорог использовали:

- карамифен, обладающий М-холиноблокирующими и NMDA-блокирующими эффектами, в дозе 50 мг/кг [3];
- диферидин — из группы ацетиленовых аминоспиртов, синтезирован в ФГБУ НКЦТ ФМБА России, в дозе 2 мг/кг;

• аминоксифир вальпроевой кислоты (АВК № 3), синтезирован в ФГБУ НКЦТ ФМБА России, в дозе 43 мг/кг.

После введения ФК, а также лечения у животных после декапитации производился забор крови и тканей головного мозга через определённые интервалы времени: 10, 30, 60 мин, 6 и 24 ч после введения ксенобиотика. На одну точку брали по 6 животных. Головной мозг промывали в физ. р-ре, высушивали и до проведения процедуры гомогенизации содержали при температуре 5–10 °С. Активность АХЭ определяли по методу Элмана [2].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью Statistica 13.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианы (Me), минимальных (Min) и максимальных (Max) значений — Me (Min; Max). Оценку различий двух независимых выборок проводили с использованием теста Манна–Уитни.

## Результаты и их обсуждение

После введения ФК в дозе 1 мг/кг в/б судорожный синдром 4–6-го уровня по шкале Racine развивался у 90% крыс. При этом латентный период наступления судорог составил 7,8 (6,2; 9,5) мин, продолжитель-

ность судорог — 87,9 (61; 99) мин ( $n=30$ ). При анализе степени выраженности судорог, вызванных ФК в дискретных временных промежутках после их появления, было установлено, что судороги 4-го уровня и выше у большинства крыс наблюдались на протяжении 50 мин.

В таблице приведены данные опытов по определению АХЭ в цельной крови и головном мозге контрольных и опытных групп и процентное соотношение (по отношению к контролю) ингибированной АХЭ после отравления фенилкарбаматом.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что статистически значимое угнетение АХЭ в головном мозге белых крыс наблюдалось в течение 6 ч, а в цельной крови — до 60 мин после введения ФК в дозе 1 мг/кг. Через 24 ч происходило полное восстановление активности фермента и даже его увеличение. Важно отметить, что через 6 ч после введения ФК при сохранявшемся ингибировании АХЭ в ЦНС (на 43,4%) судороги у крыс уже полностью прекращались.

В результате изучения влияния фармакологических средств на степень выраженности судорог, вызванных ФК, установлено, что в наибольшей степени противосудорож-

**Таблица.** Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и в крови белых крыс после введения ФК

**Table.** Dynamics of changes in acetylcholinesterase activity in the brain and blood of white rats after FC administration

Время	ФК ( $n=6$ )		Контроль ( $n=6$ )		% ингибирования, кровь	% ингибирования, мозг
	АХЭ, Е/мл крови	АХЭ, Е/мл мозга	АХЭ, Е/мл крови	АХЭ, Е/мл мозга		
10 мин	463,1 (365,4; 480,5)*	35,1 (32,7; 38,5)*	757,4 (606,4; 796,4)	78,0 (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)	92,0 (90,6; 104,5)	36,1 (28,3; 57,7)	31,0 (23,2; 44,2)
6 ч	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 ч	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:** \* — различия статистически значимы в сравнении с группой «Контроль» ( $p<0,05$ ).

**Note:** \* — differences are statistically significant in comparison with the “Control” group ( $p<0,05$ ).

ный эффект проявился при лечении крыс карамифеном и аминоксифром вальпроевой кислоты. Под влиянием карамифена интенсивность судорог резко снижалась сразу после его введения и через 10 мин достигала 0-го уровня, при этом ингибирование АХЭ в крови составляло 39,2%, в головном мозге — 54,7% по сравнению с интактной группой. При введении АВК № 3 наблюдалось исчезновение судорог 4-го уровня и выше через 20 мин, при этом ингибирование АХЭ в крови составляло 35,9%, в головном мозге — 32,9% по сравнению с контрольной группой. Под влиянием диферидина продолжительность судорог 4-го уровня и выше сокращалась до 30 мин, а ингибирование АХЭ в крови составляло 27,1%, в головном мозге — 28,8%.

Сопоставление степени угнетения активности АХЭ цельной крови и головного мозга крыс с выраженностью судорог, вызванных ФК, и при терапии судорожного синдрома изученными субстанциями выявило отсутствие прямой взаимосвязи между ингибированием АХЭ под влиянием фенилкарбамата и противосудорожной активностью изученных субстанций. Так,

при введении карамифена через 10 мин судороги прекращались, в то же время уровень ингибиции АХЭ оставался таким же, как и при введении одного судорожного агента. Подобная же картина наблюдалась и при использовании аминоксифра вальпроевой кислоты: на фоне ингибированной АХЭ в цельной крови и головном мозге судороги отсутствовали.

### Выводы

На основании представленных данных можно сделать заключение о том, что при отравлении обратимыми ингибиторами АХЭ с накоплением ацетилхолина в синапсах ЦНС (вследствие угнетения активности АХЭ) обусловлены только начальные проявления судорожной активности, а за процессы дальнейшего поддержания и рецидивов судорог ответственны другие механизмы, не связанные с ингибцией АХЭ. К этим процессам могут быть отнесены формирование глутаматергической гиперактивности, приводящей к эксайтотоксичности, и угнетение активности ГАМК-ергической системы в результате нарушений межмедиаторного баланса.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

---

1. Рамш С.М., Петров А.Н. Подходы к рациональному конструированию обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы в качестве средств для лечения болезни Альцгеймера. СПб.; 1999. [Ramsh S.M., Petrov A.N. Podkhody k ratsional'nomu konstruirovaniyu obratimyykh ingibitorov atsetilkholinesterazy v kachestve sredstv dlya lecheniya bolezni Al'tsgeymera [Approaches to the rational design of reversible acetylcholinesterase inhibitors as agents for the treatment of Alzheimer's disease]. St. Petersburg; 1999. (In Russian)].
2. Ellmann G.L., Courtney K.D., Andress V., Featherstone R.M. A new and rapid Colorimetric determination of activity acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7(2):88–95.
3. Figueiredo T.H., Aroniadou-Anderjaska V., Neuroprotective efficacy of caramiphen against soman and mechanisms of its action. *Br. J. of Pharmacology.* 2011;164:1495–1505.
4. Principles of Ecotoxicology. Ed. Walker C.H., et al. London, New York: Taylor& Francis Group., Boca Raton; 2006.
5. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1972;32(3):281–294.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Мелехова Александра Сергеевна\***, ФГБУ  
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [melehovaalexandra@gmail.com](mailto:melehovaalexandra@gmail.com)

**Aleksandra S. Melekhova\***, Golikov Research  
Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [melehovaalexandra@gmail.com](mailto:melehovaalexandra@gmail.com)

**Кубарская Лариса Георгиевна**, к.б.н., ФГБУ  
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [larkub@yandex.ru](mailto:larkub@yandex.ru)

**Larisa G. Kubarskaya**, Cand. Sci. (Biol.), Golikov  
Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [larkub@yandex.ru](mailto:larkub@yandex.ru)

**Петров Александр Николаевич**, д.м.н., проф.,  
ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [alexnikpetrov@gmail.com](mailto:alexnikpetrov@gmail.com)

**Aleksandr N. Petrov**, Dr. Sci. (Med.), Prof.,  
Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [alexnikpetrov@gmail.com](mailto:alexnikpetrov@gmail.com)

**Беспалов Александр Яковлевич**, к.х.н., ФГБУ  
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [albesp2011@yandex.ru](mailto:albesp2011@yandex.ru)

**Aleksandr Ya. Bepalov**, Cand. Sci. (Chem.),  
Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [albesp2011@yandex.ru](mailto:albesp2011@yandex.ru)

**Верведа Алексей Борисович**, к.м.н., ФГБУ  
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [aleksivan02@mail.ru](mailto:aleksivan02@mail.ru)

**Aleksej B. Verveda**, Cand. Sci. (Med.), Golikov  
Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [aleksivan02@mail.ru](mailto:aleksivan02@mail.ru)

**Бельская Алиса Владимировна**, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [belskayaalisa@gmail.com](mailto:belskayaalisa@gmail.com)

**Alisa V. Belskaya**, Golikov Research Clinical  
Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [belskayaalisa@gmail.com](mailto:belskayaalisa@gmail.com)

**Мельникова Маргарита Викторовна**, ФГБУ  
«Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;  
e-mail: [margarita10108@mail.ru](mailto:margarita10108@mail.ru)

**Margarita V. Melnikova**, Golikov Research  
Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [margarita10108@mail.ru](mailto:margarita10108@mail.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author