

**К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ NMDA-ЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В СХЕМАХ
ТЕРАПИИ ОРГАНОФОСФАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА**

Субботина С.Н., Юдин М.А., Кузьмин А.А., Иванов И.М.

*Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-
медицинской академии имени С.М. Кирова*

195043 Санкт-Петербург, Лесопарковая ул. д.4, тел. +7-812-527-79-11

Электронная почта: toxlabs@ya.ru

Резюме. В экспериментах на животных показана возможность применения NMDA-литических средств в схемах терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома. Противосудорожная активность истинных NMDA-блокаторов определяется степенью аффинности к рецептору и сроком их введения после отравления (через 30 мин). Показано уменьшение средних эффективных доз NMDA-литических средств на фоне применения атропина и HI-6 – средств патогенетической терапии отравлений фосфорорганическими соединениями. Максимальное снижение средней эффективной противосудорожной дозы при применении в схемах комбинированной терапии отравлений модельным органофосфатом установлено для CNS-1102.

Ключевые слова: органофосфат-индуцированный судорожный синдром, противосудорожная эффективность, NMDA-литические средства, холинолитики с дополнительным NMDA-блокирующим действием, реактиваторы холинэстеразы

**THE QUESTION OF NMDA-ANTAGONISTIC COMPOUNDS USING IN SCHEMES OF
ORGANOPHOSPHATE-INDUCED SEIZURES THERAPY**

Subbotina S.N., Judin M.A., Kuzmin A.A., Ivanov I.M.

Scientific Research Institute of Military Medicine, S.M.Kirov's Military Medical Academy

195043 Saint-Petersburg, Lesoparkovaya 4, phone. +7-812-527-79-11, e-mail:

toxlabs@ya.ru

Summary. There was shown the possible use of NMDA- antagonistic compounds in shemes of organophosphate-induced seizures therapy in animal experiments. Anticonvulsant activity of source NMDA-blockers is determined by the degree of affinity to the receptor and by the period of administration after exposure (30 min.) There was shown the reduction of medium effective anticonvulsant dose of NMDA- antagonistic compounds provided the use of atropine and HI-6 – compounds of pathogenetic therapy for organophosphate poisoning. The maximum decrease in the effective anticonvulsant dose when used in combination therapy schemes for organophosphate poisoning model is established for CNS-1102.

Keywords: organophosphate-induced seizures, anticonvulsant effectivity, NMDA-antagonistic compounds, anticholinergic drugs with antiglutamatergic properties, reactivators of cholinesterase

Введение. До настоящего времени препаратами первой медицинской помощи при отравлении органофосфатами остаются антихолинергические средства – холинолитики (ХЛ) и реактиваторы холинэстеразы (рХЭ). Однако, несмотря на купирование отдельных признаков холинергического криза, их введение маскирует истинную тяжесть отравления и только частично устраняет механизмы патогенеза органофосфат-индуцированного судорожного синдрома [1]. Недостаточный лечебный эффект ХЛ и рХЭ позволяет сделать вывод о важности нехолинергических механизмов в патогенезе отравлений органофосфатами и подчеркивает необходимость их коррекции при проведении лечебных мероприятий. Введение бензодиазепинов в схему терапии отравлений антихолинэстеразными ядами позволяет частично решить проблему судорожного синдрома, однако не предупреждает формирование органической патологии в постинтоксикационном периоде [2, 3]. Недостаточная эффективность бензодиазепинов подтверждается отсутствием нормализации ЭЭГ-картины активности головного мозга в острый период после отравления фосфорорганическими соединениями [4].

Эти обстоятельства подчеркивают актуальность изучения новых средств патогенетической терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома, в частности, препаратов, нивелирующих нехолинергические эффекты ядов [5]. Учитывая липофильные свойства многих антихолинэстеразных соединений и важную роль NMDA-подтипа глутаматных рецепторов в поддержании судорожной активности, схемы лечения таких отравлений должны включать, помимо ХЛ и рХЭ, NMDA-литические средства. Использование средств с различной степенью аффинитета в отношении NMDA-рецепторов, а также антихолинергических препаратов с дополнительным NMDA-блокирующим действием, позволит уточнить механизмы поддержания судорожной активности и обозначить направления для совершенствования схем терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома.

Цель настоящего исследования состояла в экспериментальном изучении противосудорожной эффективности NMDA-литических средств в схемах терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 250 белых беспородных мышках-самцах массой 18–22 г, содержащихся в условиях вивария.

Изучали эффекты неконкурентных канальных блокаторов NMDA-рецепторов (мемантин (8-32 мг/кг) и CNS-1102 (0,01-1,6 мг/кг)), а также ХЛ с дополнительным NMDA-блокирующим действием (проциклидин (0,4-5 мг/кг) и тригексифенидил (0,4-3,2 мг/кг)) [6].

Развитие судорожного синдрома у экспериментальных животных вызывали внутримышечным введением модельного органофосфата в дозе 0,8 ЛД₅₀. Состояние животных оценивали визуально. Рассчитывали латентное время развития судорожного синдрома, среднее время продолжительности судорог (T_{cp}), а также отношение числа животных с купированным судорожным синдромом к общему количеству животных в группе, выраженное в %. По результатам экспериментов определяли среднюю эффективную противосудорожную дозу антиконвульсантов (ЕД_{50суд}). В качестве средств неотложной терапии отравлений модельным органофосфатом использовали атропин и НI-6 в недействующих по противосудорожному эффекту дозах. Эффективность препаратов оценивали при в/м введении в разные сроки после отравления (на первых признаках и через 30 мин после отравления) в комбинации с НI-6 и атропином.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием t -критерия Стьюдента и теста Манна-Уитни. Расчет эффективных доз осуществляли методом пробит-анализа по Финни [7]. Среднюю ошибку альтернативных показателей определяли с помощью таблицы Генеса [8]. Для оценки значимости межгрупповых различий альтернативных показателей применяли χ^2 -критерий Пирсона и точный метод Фишера.

Результаты.

Результаты изучения противосудорожной активности исследуемых фармакологических препаратов при их комбинированном введении с НИ-6 в дозе 5 мг/кг на первых признаках интоксикации представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность применения NMDA-литических средств в комбинации с НИ-6 при отравлении мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀ ($M \pm m_M$, n=6)

Группа (препарат)	Доза, мг/кг	T _{ср} , мин	Купирование судорог в течение 120 мин, %
Контроль	-	288,0±22,50	0+9
Атропин (препарат сравнения)	0,5	193,6±61,43	33±21
	1	139,2±58,94*	67±21*
	2,5	48,3±1,67***	100-17***
Проциклидин	0,4	270,3±59,11	0+17
	0,5	236,7±69,36	33±21
	1	83,8±27,19***	100-17***
Тригексифенидил	0,8	247,5±65,24	33±21
	1,6	141,3±75,34	50±22
Мемантин	8	310,0±31,36	0+17
	16	360,0±0,00**	0+17
CNS-1102	1	230,0±76,92	17±17
	1,6	263,8±77,55	17±17
Примечание: 1 - * - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,05$; 2 - ** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,01$; 3- *** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,001$			

Отмечено достоверное снижение T_{ср} в группах, в которых в качестве второго препарата применяли атропин в дозах 1-2,5 мг/кг и проциклидин в дозе 1 мг/кг. Применение тригексифенидила в комбинации с НИ-6 оказалось менее эффективным. Использование истинных блокаторов NMDA-рецепторов (мемантина и CNS-1102) на первых признаках отравления модельным токсикантом не оказывало влияния на продолжительность судорожного синдрома у мышей. Более того, с увеличением дозы мемантина увеличивалась длительность клонико-тонических судорог. В результате проведенных экспериментов противосудорожные дозы для мемантина и CNS-1102 при комбинированном введении с НИ-6 в дозе 5 мг/кг на первых признаках отравления рассчитать не удалось. Для атропина,

проциклидина и тригексифенидила указанные дозы составили $0,7 \pm 0,18$ мг/кг; $0,6 \pm 0,09$ мг/кг и $1,4 \pm 0,39$ мг/кг, соответственно.

Для сравнения результатов в следующей серии экспериментов исследуемые препараты применяли через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе $0,8 \text{ ЛД}_{50}$ (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность применения NMDA-литических средств при их введении через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе $0,8 \text{ ЛД}_{50}$ (в/м) на фоне лечения НИ-6 (5 мг/кг) ($M \pm m_M$, $n=6$)

Группа (препарат)	Доза, мг/кг	T_{cp} , мин	Купирование судорог в течение 120 мин, %
Контроль	-	$288,0 \pm 22,50$	0+9
Атропин (препарат сравнения)	1	$288,0 \pm 34,99$	0+17
	2,5	$233,3 \pm 35,28$	0+17
	5	$86,7 \pm 38,84^{**}$	$83 \pm 17^{**}$
	1	$196,7 \pm 58,43$	33 ± 21
Проциклидин	2,5	$115,0 \pm 28,64^{***}$	$67 \pm 21^*$
	5	$28,8 \pm 3,75^{***}$	$100-17^{***}$
	0,4	$260,0 \pm 20,00$	0+17
Тригексифенидил	0,8	$113,3 \pm 38,29^{**}$	$67 \pm 21^*$
	1,6	$95,0 \pm 40,52^{**}$	$83 \pm 17^{**}$
	3,2	$39,2 \pm 2,00^{***}$	$100-17^{***}$

Продолжение таблицы 2

Группа (препарат)	Доза, мг/кг	T_{cp} , мин	Купирование судорог в течение 120 мин, %
Мемантин	16	$225,0 \pm 49,75$	0+17
	22	$330,0 \pm 14,70$	0+17
CNS-1102	0,01	$209,2 \pm 44,84$	33 ± 21
	0,05	$190,8 \pm 50,36$	33 ± 21
	0,1	$140,0 \pm 31,46^{**}$	$67 \pm 21^*$
	0,4	$121,7 \pm 15,62^{***}$	$83 \pm 17^{**}$
	0,8	$102,5 \pm 24,00^{***}$	$83 \pm 17^{**}$
	1,6	$70,8 \pm 14,11^{***}$	$100-17^{***}$

Примечание:

1 - * - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,05$;

2 - ** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,01$;

3- *** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,001$

Полученные результаты сравнительной оценки противосудорожной активности препаратов не позволили сделать вывод о преимуществе холинолитиков над блокаторами NMDA-рецепторов, в частности CNS-1102. Для купирования судорожного синдрома требовались большие дозы атропина, тригексифенидила и проциклидина. В отличие от мемантина, применение CNS-1102 характеризовалось отчетливым дозозависимым влиянием на продолжительность судорожного синдрома. Достоверное уменьшение этого показателя отмечали, начиная с дозы 0,1 мг/кг. Введение препарата в дозе 1,6 мг/кг оказывало наиболее выраженное противосудорожное действие; купирование судорог регистрировали через $70,8 \pm 14,11$ мин (при $288,0 \pm 22,50$ мин в контроле) у всех отравленных животных ($p \leq 0,001$). Противоположные эффекты наблюдали после терапии, включающей введение НИ-6 (на первых признаках отравления) и мемантина (через 30 мин после отравления). При введении отравленным мышам такой комбинации картина интоксикации была схожей с контрольными животными.

Проведенные исследования позволили рассчитать средние эффективные противосудорожные дозы изучаемых соединений при их введении через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀ на фоне применения НИ-6 в дозе 5 мг/кг. Для атропина, проциклидина, тригексифенидила и CNS-1102 указанные дозы составили $3,3 \pm 0,71$ мг/кг, $1,58 \pm 0,44$ мг/кг, $0,61 \pm 0,21$ мг/кг и $0,05 \pm 0,028$ мг/кг, соответственно.

Анализ полученных данных позволил заключить, что для достижения противосудорожного эффекта при остром отравлении мышей модельным токсикантом в дозе 0,8 ЛД₅₀ целесообразно введение НИ-6 и проциклидина на первых признаках отравления, CNS-1102 через 30 мин после интоксикации ядом.

Противосудорожные свойства NMDA-литических средств при их применении с атропином в недействующей по противосудорожному эффекту дозе 1,26 мг/кг представлены в таблице 3. Изучаемые препараты применяли через 30 мин после отравления.

Наибольшую противосудорожную активность при введении в комбинации с атропином отмечали у проциклидина. Препарат дозозависимо уменьшал длительность судорожного синдрома. Его применение в дозе 4 мг/кг купировало судороги у 83 ± 17 % животных в течение 2 ч после интоксикации. В группе, в которой животным вводили тригексифенидил, этот показатель соответствовал 67 ± 21 %. Однако действие проциклидина было непродолжительным, и через 2-3 ч после отравления у животных отмечали рецидив судорог.

Таблица 3 – Эффективность применения NMDA-литических средств при их введении через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀ (в/м) на фоне лечения атропином (1,26 мг/кг) ($M \pm m_M$, n=6)

Группа (препарат)	Доза, мг/кг	T _{ср} , мин	Купирование судорог в течение 120 мин, %
Контроль	-	258,0 $\pm$ 22,50	0 $\pm$ 9
Проциклидин	1	152,5 $\pm$ 31,24*	17 $\pm$ 17
	2	138,3 $\pm$ 32,03**	33 $\pm$ 21
	4	90,8 $\pm$ 37,36**	83 $\pm$ 17***

Продолжение таблицы 3

Тригексифенидил	0,5	197,5 $\pm$ 43,37	17 $\pm$ 17
	1	173,3 $\pm$ 38,86	33 $\pm$ 21
	1,5	121,7 $\pm$ 56,37*	67 $\pm$ 21*
Мемантин	11	220,0 $\pm$ 30,59	17 $\pm$ 17
	22	198,3 $\pm$ 22,45	17 $\pm$ 17
	32	215,0 $\pm$ 22,45	0 $\pm$ 17
CNS-110	0,1	170,0 $\pm$ 30,89*	33 $\pm$ 21
	0,2	125,0 $\pm$ 32,00**	50 $\pm$ 22

Примечание:

1 - * - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,05$;

2 - ** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,01$;

3- *** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,001$

Из истинных блокаторов NMDA-рецепторов только CNS-1102 оказывал противосудорожное действие. Его введение в дозе 0,2 мг/кг достоверно снижало длительность судорог до 125,0 $\pm$ 32,00 мин по сравнению с контрольной группой (258,0 $\pm$ 22,50 мин) ($p \leq 0,01$).

Использование мемантина в комбинации с атропином не оказывало влияния на продолжительность судорог у отравленных животных, купирование судорог отмечали лишь в единичных случаях.

Проведенные исследования позволили рассчитать средние эффективные противосудорожные дозы изучаемых соединений при их введении через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀ на фоне применения атропина в дозе 1,26 мг/кг. Для проциклидина, тригексифенидила и CNS-1102 указанные дозы составили 2,2±0,43 мг/кг, 1,18±0,29 мг/кг и 0,14±0,033мг/кг, соответственно. Среднюю эффективную противосудорожную дозу мемантина рассчитать не удалось из-за отсутствия эффекта.

При введении NMDA-литических средств в варианте трехкомпонентной терапии эффективные дозы фармакологических препаратов заметно снижались. Эффективность применения исследуемых фармакологических препаратов в комбинации с атропином (0,2 мг/кг) и HI-6 (5 мг/кг) представлены в таблице 4.

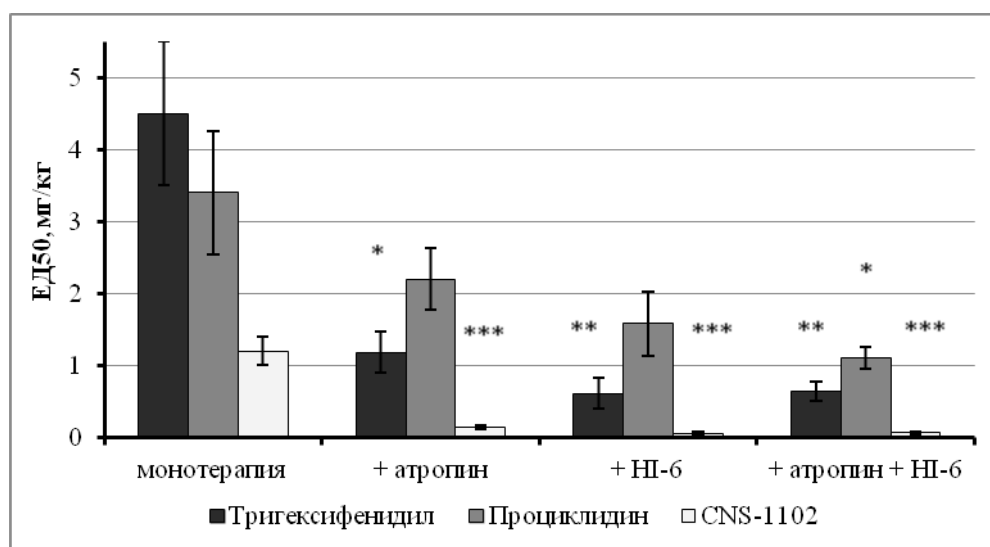
Таблица 4 – Эффективность применения NMDA-литических средств при их введении через 30 мин после отравления мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀ на фоне лечения атропином и HI-6 (M±m_M, n=6)

Группа (препарат)	Доза, мг/кг	T _{ср} , мин	Купирование судорог в течение 120 мин, %
Контроль	-	258,0±22,50	0+9
Проциклидин	1	144,2±48,44*	33±21
	1,5	74,2±4,64***	83±17***
	2	37,5±2,00***	100-17***
Тригексифенидил	0,4	155,8±34,66*	17±17
	1	105,0±24,65***	67±21*
	1,5	44,2±3,00***	100-17***
Мемантин	16	240,0±42,43	17±17
	22	235,0±52,31	0+17
CNS-1102	0,025	186,4±31,16	0+17
	0,05	134,2±29,66**	50±22
	0,1	98,3±19,27***	67±21*
	0,2	76,7±11,68***	100-17***
Примечание:			

- 1 - * - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,05$;
- 2 - ** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,01$;
- 3- *** - отличия по отношению к контрольной группе достоверны при $p \leq 0,001$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследуемые соединения, кроме мемантина, при введении в комбинации с атропином и НI-6 оказывали противосудорожное действие при остром отравлении мышей модельным органофосфатом в дозе 0,8 ЛД₅₀. При их использовании отмечали дозозависимое уменьшение продолжительности периода судорог. С увеличением дозы проциклидина, тригексифенидила и CNS-1102 увеличивалось количество животных, у которых судороги прекращались в течение 2 ч после отравления. Мемантин при введении в комбинации с НI-6 и атропином не проявлял противосудорожного действия, купирование судорог регистрировали в единичных случаях независимо от дозы препарата.

На рисунке 1 представлено изменение ЕД₅₀ препаратов при их комбинированном введении с атропином и НI-6 в недействующих дозах.



Примечания: * - различия с группой «монотерапия» достоверны при

$p < 0,05$; ** - при $p < 0,01$; *** - при $p < 0,001$

Рисунок 1 - Изменение ED_{50} NMDA-литических средств (по противосудорожному действию)
при введении в комбинации с атропином и HI-6

Совместное введение NMDA-литических средств с атропином и HI-6 позволяло снизить противосудорожную дозу проциклидина в 3 раза, тригексифенидила в 7 раз, а дозу CNS-1102 в 20 раз.

Обсуждение полученных результатов.

Проведенные исследования позволили заключить, что истинные NMDA-блокаторы проявляют наибольшую противосудорожную активность при их применении через 30 мин после отравления модельным органофосфатом. Выраженность их противосудорожного действия определяется аффинитетом к рецептору и подтверждается более высокой эффективностью CNS-1102 по сравнению с мемантином.

В результате проведенных экспериментов для каждого препарата была изучена динамика изменения противосудорожных доз в различных схемах их введения в комбинации с атропином и HI-6. Только в случае применения CNS-1102 в комбинации с ХЛ и рХЭ регистрировали значительное снижение противосудорожной дозы NMDA-антагониста (в 20 раз). Показано, что максимальное снижение противосудорожной дозы атропина (в 4,4 раза) отмечали при его введении на первых признаках отравления модельным органофосфатом в комбинации с HI-6. Эффективность проциклидина характеризовалась схожим действием. Максимальное снижение средней эффективной дозы регистрировали после его введения на первых признаках в комбинации с HI-6. Для достижения должной эффективности при применении его через 30 мин после отравления следовало применять препарат в больших дозах.

Положительный характер взаимодействия соединений наблюдали при комбинированном введении HI-6 и тригексифенидила. Минимальная среднеэффективная доза

тригексифенидила ($0,61 \pm 0,21$ мг/кг) отмечена в группе, в которой животным вводили препарат через 30 мин после отравления в комбинации с HI-6 (введение на первых признаках). Добавление к рассматриваемой комбинации атропина не влияло на изменение противосудорожной дозы препарата. Введение тригексифенидила через 30 мин после отравления в комбинации с HI-6 или атропином было более предпочтительным, чем его использование в варианте монотерапии или на первых признаках отравления.

Применение CNS-1102 на первых признаках отравления модельным органофосфатом было неэффективно. Использование препарата не оказывало влияния на продолжительность судорожного синдрома. Наиболее выраженное снижение средней эффективной дозы (по противосудорожному действию) CNS-1102 при введении его через 30 мин после отравления отмечали в комбинации с HI-6 (5 мг/кг), примененного на первых признаках интоксикации. Это позволило снизить ED_{50} соединения с $1,2 \pm 0,20$ мг/кг до $0,05 \pm 0,028$ мг/кг, т.е. в 24 раза по сравнению с использованием в варианте монотерапии.

Отсутствие противосудорожного действия у мемантина в схемах комбинированной терапии отравлений модельным органофосфатом, по-видимому, связано с его способностью негативно влиять на оксим-индуцированную реактивацию ацетилхолинэстеразы или его собственным ингибирующим действием в отношении фермента.

Таким образом, патогенетический подход к терапии судорожного синдрома при остром отравлении антихолинэстеразными соединениями подразумевает раннее введение ХЛ и рХЭ и применение NMDA-литических средств через 30 мин после отравления. Использование такой схемы терапии органофосфат-индуцированного судорожного синдрома позволяет существенно снизить средние эффективные дозы антагонистов NMDA-рецепторов и, тем самым, увеличить безопасность их применения.

Выводы:

1. Для достижения отчетливого противосудорожного эффекта целесообразно введение НИ-6 и проциклидина на первых признаках отравления или НИ-6 на первых признаках отравления и CNS-1102 через 30 мин после интоксикации ядом. Применение такой схемы позволяет более чем в 5 раз снизить эффективные дозы ХЛ и в 20 раз – антагониста NMDA-рецептора.
2. Препараты тригексифенидил и проциклидин могут рассматриваться в качестве препаратов выбора из группы ХЛ для замены атропина при лечении подобных отравлений.

Литература.

1. Anderson, D.R. Efficacy of injectable anticholinergic drugs against soman-induced convulsive/subconvulsive activity / D.R. Anderson, L.W. Harris, S.L. Bowersox [et al.] // Drug Chem Toxicol. – 1994. – Vol.17, N.2. – P.139-148.
2. Brodie, M.J. Established anticonvulsants and the treatment of refractory epilepsy / M.J. Brodie // Lancet. - 1990. – Vol. 336. – P. 350-354.
3. Walker, M.C. New antiepileptic drug trials in developing countries: are they necessary? / M.C. Walker, J.W. Sander // Seizure. – 1996. – Vol. 5. – P. 165-169.
4. Lallement, G. Interest in an glutamate antagonistic compound for the treatment of organophosphate poisoning / G. Lallement // Ann. Pharm. Fr. – 2000. – Vol. 58, N. 1. – P. 17-19.
5. Прозоровский, В.Б. Новые данные о несинаптических (дистантных) эффектах фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы. Обзор литературы / В.Б. Прозоровский, С.В. Чепур // Токсикол. вестн.- 2001.- № 4.- С.2-7.

6. Weissman, B.A. 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.
7. Finney, D.J. Probit analysis (3rd ed.) / D.J. Finney // New York: Cambridge. University Press. – 1971. – 333 p.
8. Генес, В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований / В.С. Генес. - М.: Наука, 1967. - 150 с.