

Оценка острой токсичности и нейротоксичности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола

Малыгин А. С.

ординатор, кафедра фармакологии и клинической фармакологии

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автор для корреспонденции: Малыгин Александр Сергеевич; **e-mail:** dr.a.s.m@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Аннотация

Цель – экспериментальная оценка острой токсичности и нейротоксичности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола. Материалы и методы. Острую токсичность N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид (вальпрозоламида) оценивали методом пробит-анализа в экспериментах на мышах. Нейротоксичность определяли в тестах вращающегося стержня и подтягивания на перекладине у мышей. Влияние вальпрозоламида на ориентировочно-исследовательскую активность мышей оценивали в тестах «открытое поле» и «темная/светлая камера». Результаты. Значения DL_{50} и TD_{50} вальпрозоламида при внутривенном введении мышам составили соответственно 924,8 (756,9-1063,7) мг/кг и 456,7 (325,4-603,6) мг/кг. Заключение. Новое амидное производное вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола (вальпрозоламид) относится к группе малотоксичных веществ.

Ключевые слова: противоэпилептические средства, вальпроевая кислота, 1,3,4-тиадиазол, острая токсичность, нейротоксичность

doi: 10.29234/2308-9113-2019-7-3-37-46

Для цитирования: Малыгин А. С. Оценка острой токсичности и нейротоксичности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола. *Медицина* 2019; 7(3): 37-46

Введение

Препараты вальпроевой (пропилпентановой) кислоты являются одними из наиболее широко применяемых антиконвульсантов, так как эффективны при эпилептических припадках различных форм (в том числе при парциальных, генерализованных, миоклонических, атонических, тонико-клонических) и других заболеваниях ЦНС, сопровождающихся судорожным синдромом [1,2]. Вальпроаты обычно хорошо переносятся пациентами, однако при их применении возможно развитие ряда серьезных неблагоприятных реакций, среди которых наиболее значимыми являются поражение печени (в том числе развитие жирового гепатоза) и тератогенность. Препараты вальпроевой кислоты могут оказывать негативное влияние на обменные процессы,

ослабляя окисление жирных кислот в митохондриях и нарушая цикл мочевины, что может привести к развитию гипераммониемии и гипераммонемической энцефалопатии. При применении в высоких дозах может снижаться скорость психомоторных реакций и мышления, развиваться повышенная сонливость, поведенческие нарушения, изменения настроения [3-5]. Существенным недостатком вальпроатов является нелинейный характер фармакокинетики, что требует проведения терапевтического лекарственного мониторинга при их использовании [6-9]. Перспективным направлением повышения эффективности и безопасности препаратов этого ряда является модификация их химической структуры. В настоящее время получены различные амидные производные вальпроевой кислоты, которые в экспериментальных условиях продемонстрировали более высокую противоэпилептическую активность и меньшую нейротоксичность [10,11]. Одним из таких соединений является новое амидное производное вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола [12]. Важнейшим этапом доклинических исследований оригинальных лекарственных средств является оценка их токсичности, в том числе острой и специфической, что необходимо для обеспечения безопасности лекарственной терапии.

Цель

Целью настоящего исследования явилась экспериментальная оценка острой токсичности и нейротоксичности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явилось новое противоэпилептическое средство из группы производных вальпроевой (пропилпентановой) кислоты и 1,3,4-тиадиазола – N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид (вальпразоламид). Оценку острой токсичности и нейротоксичности вальпразоламида проводили в экспериментах с использованием белых аутбредных мышей-самцов SHK массой 19-21 г. Условия содержания подопытных животных соответствовали правилам надлежащей лабораторной практики [13]. Все эксперименты осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств [14] с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Directive 2010/63/EU) и при наличии разрешения этического комитета Тверского государственного медицинского университета.

Острую токсичность вальпразоламида оценивали при внутрибрюшинном введении подопытным мышам в дозах от 150 мг/кг до 1500 мг/кг. В каждую опытную группу входило по 8 мышей. Продолжительность наблюдения за подопытными грызунами после

введения вальпрозоламида составляла 14 дней, в течение которых отмечали общее состояние и летальность животных в каждой группе. В первый день после введения исследуемого лекарственного средства подопытные мыши находились под непрерывным видеонаблюдением. По результатам исследования рассчитывали значения DL_{50} (полулетальной дозы), DL_{16} , DL_{84} с помощью пробит-анализа методом Финни. Расчет доз осуществляли с указанием 95% доверительного интервала. Определение класса токсичности вальпрозоламида проводили по значению DL_{50} [15]. В качестве препарата сравнения использовали вальпроовую кислоту (Sigma Aldrich, США), для которой методом пробит-анализа определяли значение DL_{50} при внутрибрюшинном введении аутбредным мышам SHK.

Оценку неврологического дефицита проводили в тестах вращающегося стержня и подтягивания на перекладине у мышей. Вальпрозоламид вводили внутрибрюшинно в дозах 75-900 мг/кг за час до тестирования. В каждую опытную группу входило по 6 мышей. В тесте вращающегося стержня оценивали способность подопытных животных удерживаться на вращающемся стержне (диаметром 2,5 см и скоростью вращения 6 об/мин) в течение 1 минуты. При постановке теста подтягивания на перекладине подопытных мышей подвешивали передними конечностями на проволоку диаметром 0,4 см, натянутую на высоте 30 см от поверхности стола. Как проявление неврологического дефицита расценивали неспособность подопытных животных подтянуть задние конечности на проволоку. Значение TD_{50} (среднетоксической дозы, вызывающей неврологический дефицит у 50% животных) определяли методом пробит-анализа.

Оценку угнетения ориентировочных рефлексов проводили в экспериментах на мышах с использованием тестов «открытое поле» и «темная/светлая камера» [16,17]. Наблюдение за подопытными грызунами в установке «открытое поле» (ООО «НПК Открытая наука», Россия) проводили в течение 5 минут с использованием видеокамеры, подвешенной на штатив над установкой. Дополнительно оценивали поведение мышей в установке «темная/светлая камера» (ООО «НПК Открытая наука», Россия). Подопытных животных помещали в светлый отсек установки, регистрировали число перемещений между отсеками и время нахождения в темном и светлом отсеках камеры в течение 3-х минут наблюдения. Анализ паттернов поведения подопытных мышей проводили при изучении видеозаписи эксперимента. Как проявление неврологического дефицита расценивали угнетение горизонтальной и вертикальной двигательной активности подопытных животных.

Результаты исследований обрабатывали статистически с применением программного обеспечения «AnalystSoft Inc., BioStat – программа статистического анализа. Версия 2009». Анализ вида распределения количественных признаков и проверку равенства дисперсий проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия множественного сравнения Тьюки HSD, в случае ненормального распределения

использовали критерий Краскела-Уоллиса и U-тест Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне вероятности 95% и более ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

После однократного внутрибрюшинного введения вальпрозоламида в дозе 600 мг/кг и менее гибели подопытных мышей в течение 14 дней наблюдения зарегистрировано не было. В сериях опытов с использованием вальпрозоламида в дозах 900 мг/кг, 1200 мг/кг и 1500 мг/кг погибло соответственно 50%, 87,5% и 100% подопытных животных (табл.1).

Таблица 1. Летальность мышей при однократном внутрибрюшинном введении вальпрозоламида

Доза вальпрозоламида	Число погибших мышей					Летальность, %
	1 день	2 день	3 день	4 – 14 дни	Всего	
150 мг/кг	0	0	0	0	0/8	0
300 мг/кг	0	0	0	0	0/8	0
450 мг/кг	0	0	0	0	0/8	0
600 мг/кг	0	0	0	0	0/8	0
900 мг/кг	3	1	0	0	4/8	50,0
1200 мг/кг	6	1	0	0	7/8	87,5
1500 мг/кг	8	0	0	0	8/8	100

Основными признаками общетоксического действия вальпрозоламида были ослабление двигательной активности и ориентировочно-исследовательской деятельности до состояния полной адинамии, что проявлялось отсутствием горизонтальной и вертикальной двигательной активности подопытных животных в тестах «открытое поле» и «темная/светлая камера». У всех мышей отмечалось угнетение реакции на неспецифические раздражители (механические, звуковые, световые) и снижение мышечного тонуса, о чем свидетельствовала неспособность подопытных животных подтягиваться на горизонтальной перекладине и удерживаться на вращающемся стержне.

По экспериментальным данным методом пробит-анализа было рассчитано, что значение DL_{50} для внутрибрюшинного введения вальпрозоламида составило 924,8 мг/кг (95% ДИ: 756,9-1063,7). Значения летальных доз DL_{16} и DL_{84} были соответственно равны 764,0 мг/кг (95% ДИ: 492,5-880,3) и 1119,3 мг/кг (95% ДИ: 984,5-1518,7).

При внутрибрюшинном введении вальпроевой кислоты в дозах до 300 мг/кг гибели подопытных мышей отмечено не было. В сериях опытов с использованием вальпроевой кислоты в дозах 450 мг/кг, 600 мг/кг и 750 мг/кг в течение 24 часов погибло соответственно 33%, 67% и 100% подопытных грызунов. По результатам пробит-анализа значение DL_{50} вальпроевой кислоты составило 512,9 мг/кг (95% ДИ: 399,0-611,7).

Для оценки нейротоксических свойств нового производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола исследовали его влияние на способность подопытных мышей удерживаться на вращающемся стержне. В сериях опытов с внутрибрюшинным введением исследуемого вальпроата в дозах от 75 мг/кг до 300 мг/кг достоверных нарушений координации движений в данном тесте выявлено не было. При применении вальпрозоламида в дозах 450 мг/кг и 600 мг/кг неспособность удерживаться на вращающемся стержне была отмечена соответственно у 50% и 66,7% подопытных мышей. При внутрибрюшинном введении вальпрозоламида в дозе 900 мг/кг и более у всех подопытных животных были выявлены нарушения координации движений и отсутствие способности удерживаться на вращающемся стержне (табл. 2).

Таблица 2. Удержание мышей на вращающемся стержне при однократном внутрибрюшинном введении вальпрозоламида

Доза вальпрозоламида	Число мышей, удерживающихся на вращающемся стержне более 1 минуты/всего мышей	Удержание на вращающемся стержне, %
75 мг/кг	6/6	100
150 мг/кг	6/6	100
300 мг/кг	5/6	83,3
450 мг/кг	3/6	50,0
600 мг/кг	2/6	33,3
900 мг/кг	0/6	0

Пробит-анализ показал, что значение среднетоксической дозы, вызывающей неврологический дефицит у 50% животных (TD_{50}), было равно 456,7 мг/кг (95% ДИ: 325,4-603,6). Значения токсических доз TD_{16} и TD_{84} составили соответственно 311,3 мг/кг (95% ДИ: 127,5-402,0) и 669,9 мг/кг (95% ДИ: 526,8-1428,6).

Влияние вальпрозоламида на мышечный тонус оценивали в тесте подтягивания на перекладине. При внутрибрюшинном введении исследуемого вальпроата в дозах 75-300 мг/кг все подопытные мыши при подвешивании за передние лапы на горизонтальную проволоку подтягивали задние конечности, что являлось дополнительным подтверждением отсутствия нейротоксического действия нового производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола при использовании в дозах менее 300 мг/кг. При увеличении дозы до 600 мг/кг неспособность подтягиваться на перекладину отмечалась у 33,3% подопытных мышей. При введении вальпрозоламида в дозе 900 мг/кг и более все подопытные животные утрачивали способность удерживаться на горизонтальной перекладине (табл. 3).

С помощью пробит-анализа были определены токсические дозы для данного теста. Значения TD_{50} , TD_{16} и TD_{84} составили соответственно 546,7 мг/кг (95% ДИ: 443,5-736,4), 452,5 мг/кг (95% ДИ: 184,9-525,2) и 660,4 мг/кг (95% ДИ: 566,4-1851,7).

Таблица 3. Число мышей, подтягивающихся на перекладине при однократном внутрибрюшинном введении вальпрозоламида

Доза вальпрозоламида	Число мышей, подтягивающихся на перекладине/всего мышей	Подтягивание на перекладине, %
75 мг/кг	6/6	100
150 мг/кг	6/6	100
300 мг/кг	6/6	100
450 мг/кг	5/6	83,3
600 мг/кг	4/6	66,7
900 мг/кг	0/6	0

Угнетение ориентировочных рефлексов под влиянием вальпрозоламида оценивали в тестах «открытое поле» и «темная/светлая камера» (табл. 4).

Таблица 4. Влияние вальпрозоламида на горизонтальную и вертикальную двигательную активность мышей в тесте «открытое поле», $m \pm SEM$

Серия опытов	Доза, мг/кг	Горизонтальная активность, число пересеченных секторов	Вертикальная двигательная активность, число стоек
Вальпрозамид	75	116,5 \pm 10,3	23,0 \pm 2,1
Вальпрозамид	150	119,7 \pm 14,1	24,1 \pm 1,9
Вальпрозамид	300	127,5 \pm 11,5	27,4 \pm 3,4
Вальпрозамид	450	47,4 \pm 5,6*	3,7 \pm 1,8*
Вальпрозамид	600	28,8 \pm 9,4	2,2 \pm 1,4*
Вальпрозамид	900	нет активности	нет стоек
Контроль	-	122,4 \pm 11,5	25,6 \pm 2,3

Примечание: * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим использованием теста множественного сравнения Тьюки).

Результаты исследования показали, что при однократном внутрибрюшинном введении вальпрозоламида в дозах 300 мг/кг и менее изменений горизонтальной и вертикальной двигательной активности подопытных мышей в тесте «открытое поле» не отмечалось. При использовании исследуемого производного вальпроовой кислоты и 1,3,4-тиадиазола в дозах 450 мг/кг и 600 мг/кг выявлено статистически значимое уменьшение числа пересеченных секторов и вертикальных стоек (подъемов подопытных животных на задние лапы) по сравнению с контролем. В сериях опытов с введением вальпрозоламида в дозе 900 мг/кг двигательной активности подопытных животных в данном тесте не отмечалось.

Полученные данные о возможном угнетении ориентировочных рефлексов при внутрибрюшинном введении вальпрозоламида в дозе более 450 мг/кг подтвердили результаты теста «темная/светлая камера». Показано, что при внутрибрюшинном введении вальпрозоламида в дозе 450 мг/кг и более статистически значимо уменьшалось число переходов из камеры в камеру и большую часть времени подопытные животные

проводили в темной части установки. В серии опытов с использованием вальпрозоламида в дозе 900 мг/кг перемещений подопытных животных в данном тесте отмечено не было (табл. 5).

Таблица 5. Число переходов между камерами и время нахождения мышей в светлой камере при внутрибрюшинном введении вальпрозоламида в тесте темная/светлая камера, Me (LQ - UQ)

Серия опытов	Доза, мг/кг	Число переходов	Время нахождения в светлой камере, с
Вальпрозоламид	75	8 (7-10)	87 (79-93)
Вальпрозоламид	150	10 (6-12)	97 (94-105)
Вальпрозоламид	300	12 (9-14)	113 (91-115)
Вальпрозоламид	450	4 (2-5)*	39 (31-47)*
Вальпрозоламид	600	2 (1,25-2,75)*	12,5 (10,25-15,5)*
Вальпрозоламид	900	нет переходов	-
Контроль	-	8 (7-11)	96 (87-103)

Примечание: * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$, U-тест Манна-Уитни).

Заключение

Результаты проведенных экспериментов показали, что значение DL_{50} нового амидного производного вальпроовой кислоты и 1,3,4-тиадиазола при внутрибрюшинном введении мышам составило 924,8 мг/кг (95% ДИ: 756,9-1063,7) и было выше, чем у вальпроовой кислоты. Полученные данные подтверждают сведения о том, что введение в химическую структуру лекарственных веществ тиадиазольного радикала может существенно снижать их токсичность [18,19]. Согласно классификации химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения новое амидное производное вальпроовой кислоты и 1,3,4-тиадиазола можно отнести к группе малотоксичных веществ.

При использовании в высоких дозах вальпрозоламид, аналогично другим антиконвульсантам, может вызывать развитие неврологического дефицита. Значение среднетоксической дозы (TD_{50}) вальпрозоламида (внутрибрюшинно) в тесте вращающегося стержня у мышей составило 456,7 мг/кг (95% ДИ: 325,4-603,6). Отмечено, что при применении исследуемого вальпроата в дозе TD_{50} также наблюдаются снижение мышечного тонуса в тесте подтягивания мышей на перекладине и угнетение ориентировочных рефлексов в тестах «открытое поле» и «темная/светлая камера». При использовании в дозах менее 300 мг/кг, что соответствует терапевтическим для противоэпилептической активности, неврологических нарушений и угнетения ориентировочных рефлексов у подопытных животных обнаружено не было.

Список литературы

1. Фрейдкова Н.В., Пылаева О.В., Мухин К.Ю. Вальпарин ХР в лечении эпилепсии (обзор литературы и описание клинических случаев). *Русский журнал детской неврологии* 2015; 10(3): 37-42.
2. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 2012; 16 (10): 695-714.
3. Пилюгина М.С. Хроническая интоксикация препаратами вальпроевой кислоты: диагностика и методы коррекции. *Вестник Клинической больницы №51* 2011; (2-3): 75-80.
4. Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика* 2016; 8 (2): 94-99.
5. Sztajnkrzyer M.D. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40(6): 789-801.
6. Collins-Yoder A., Lowell J. Valproic acid: special considerations and targeted monitoring. *J. Neurosci Nurs.* 2017; 49 (1):56-61.
7. Леонова М.В., Ивжиц М.А., Тищенко И.Ф. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей в реальной практике. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния* 2017; .9 (1): 26-34.
8. Малыгин А.С., Попов Н.С., Демидова М.А., Кудряшова М.Н., Горшкова М.А. Использование ВЭЖХ-масс-спектрометрии для терапевтического лекарственного мониторинга вальпроатов. *Верхневолжский медицинский журнал* 2018; 17 (2): 27-33
9. Якунина А.В., Повереннова И.Е. Роль терапевтического лекарственного мониторинга при использовании противозэпилептических препаратов. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния* 2016; 8 (3): 66-73.
10. Jorge Diaz R.A., Enrique Cami Gerardo. Salts of 5-amino-2-sulfonamide-1,3,4-thiadiazole, a structural and analog of acetazolamide, show interesting carbonic anhydrase inhibitory properties, diuretic, and anticonvulsant action. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2016; 12 (6): 1102-1111.
11. Trojnar MK., Wierzchowska-Cioch E., Krzyzanowski M., Jargiełło M., Czuczwar SJ. New generation of valproic acid. *Pol J Pharmacol.* 2004; 56 (3): 283-8.
12. Желтухин Н.К., Демидова М.А., Коротконожкин А.В., Попов Н.С., Скачилова С.Я., Садчикова Н.П., Малыгин А.С. N-(5-Этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид, обладающий противозэпилептической и обезболивающей активностями; заявитель и патентообладатель ОАО ВНЦ БАВ. – 267288; заявл. 13.03.2018; опубл. 20.11.2018, Бюл. № 32. 1 с.
13. Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 199н "Правила надлежащей лабораторной практики".
14. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.
15. Березовская И.В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях. *Токсикологический вестник.* 2010; (5): 17-22.
16. Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Крайнева В.А Поведенческие экспериментальные модели депрессии. *Фармакокинетика и фармакодинамика* 2017; (3):14-19.
17. Малыгин А.С., Ломоносова И.А. Богомолова О.А., Демидова М.А. Влияние вальпрозоламида на ориентировочно-исследовательское поведение мышей. *Медицина* 2018; (4):109-119.

18. Dogan H., Duran A., Rollas S. et al. Synthesis of new 2,5-Disubstituted-1,3,4-thiadiazoles and preliminary evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10 (9): 2893-2898.
19. Matysiak J. Biological and pharmacological activities of 1,3,4-thiadiazole based compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2015; 15 (9):762-775.

Research of the Antiepileptic Activity of the New Amydic Derivative Valproic Acid and 1,3,4-Thiadiazole

Malygin A. S.

Resident Physician, Chair for Pharmacology and Clinical Pharmacology

Tver State Medical University, Tver, Russia

Corresponding author: Malygin A.S.; E-mail: dr.a.s.m@yandex.ru

Conflict of interests: None declared

Funding: The study had no sponsorship

Abstract

Aim: Experimental evaluation of the acute toxicity and neurotoxicity of a new amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole. **Materials and Methods:** The acute toxicity of N-(5-ethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-propylpentanamide (valprazolamide) was evaluated by probit analysis in experiments in mice. Neurotoxicity was determined in a rotating rod test and pull-up bar test in mice. The effect of valprazolamide on the exploratory behavior of mice in "open field" test and in a "dark/light transition" test was evaluated. **Results:** The DL_{50} and TD_{50} values of valprazolamide (intraperitoneally) for mice were 924.8 (756.9-1063.7) mg/kg and 456.7 (325.4-603.6) mg/kg, respectively. **Conclusion:** A new amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole (valprazolamide) belongs to the group of low-toxic substances.

Keywords: antiepileptic drugs, valproic acid, 1,3,4-thiadiazole, acute toxicity, neurotoxicity

References

1. Freydkova N.V., Pylayeva O.V., Mukhin K.Yu. Val'parin KHR v epilepsii (obzor literatury i opisaniye klinicheskikh sluchayev) [Valparin XP in the treatment of epilepsy (review of the literature and the description of clinical cases)]. *Russkiy zhurnal detskoy nevrologii [Russian Journal of Pediatric Neurology]* 2015; 10 (3): 37-42. (In Russ.)
2. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs.* 2012;16(10): 695-714.
3. Pilyugina M.S. Khronicheskaya intoksikatsiya preparatov val'proyevoy kisloty: diagnostika i metody korrektsii [Chronic intoxication with valproic acid preparations: diagnosis and methods of correction]. *Vestnik Klinicheskoy bol'nitsy №51 [Bulletin of the Clinical Hospital №51]* 2011; 2-3: 75-80. (In Russ.)
4. Shnayder N.A., Dmitrenko D.V. Khronicheskaya intoksikatsiya val'proyevoy kislotoy v epileptologii: diagnostika i lecheniye [Chronic intoxication with valproic acid in epileptology: diagnosis and treatment]. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika [Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics]* 2016; 8 (2): 94-99. (In Russ.)
5. Sztajnkrzyer M.D. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40(6):789-801.
6. Collins-Yoder A., Lowell J. Valproic acid: special considerations and targeted monitoring. *J. Neurosci Nurs.* 2017; 49 (1): 56-61.

7. Leonova M.V., Ivzhits M.A., Tishchenkova I.F. et al. Terapevticheskiy lekarstvennyy monitoring antikonvul'santov u detey v real'noy praktike [Therapeutic drug monitoring of anticonvulsants in children in actual practice]. *Epilepsiya i paroksizmal'nyye sostoyaniya [Epilepsy and paroxysmal states]* 2017; 9 (1): 26-34. (In Russ.)
8. Malygin A.S., Popov N.S., Demidova M.A., Kudryashova M.N., Gorshkova M.A. Ispol'zovaniye VEZHKH-mass-spektrometrii dlya terapevticheskogo lekarstvennogo monitoringa val'proatov [Use of HPLC-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of valproates]. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal [Upper Volga Medical Journal]* 2018; 17 (2): 27-33. (In Russ.)
9. Yakunina A.V., Poverennova I.Ye. Rol' terapevticheskogo lekarstvennogo monitoringa pri ispol'zovanii protivoepilepticheskikh preparatov [The role of therapeutic drug monitoring when using antiepileptic drugs]. *Epilepsiya i paroksizmal'nyye sostoyaniya [Epilepsy and paroxysmal states]* 2016; 8 (3): 66-73. (In Russ.)
10. Jorge Diaz R.A., Enrique Cami Gerardo. Salts of 5-amino-2-sulfonamide-1,3,4-thiadiazole, a structural and analog of acetazolamide, show interesting carbonic anhydrase inhibitory properties, diuretic, and anticonvulsant action. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2016; 12(6): 1102-1111.
11. Trojnar M.K., Wierzchowska-Cioch E., Krzyzanowski M., Jargiełło M., Czuczwar S.J. New generation of valproic acid. *Pol J Pharmacol.* 2004; 56 (3): 283-8.
12. Zheltukhin N.K., Demidova M.A., Korotkonozhkin A.V., Popov N.S., Skachilova S.Ya., Sadchikova N.P., Malygin A.S. N- (5-Etil-1,3,4-tiadiazol-2-il) -2-propilpentanamid, obladayushchiy protivoepilepticheskoy i obezbolivayushchey aktivnostyami [N- (5-Ethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) -2-propylpentanamide, which has antiepileptic and analgesic activities]. Russian Federation Patent 267288 filed by OAO VNTS BAV 13.03.2018 and issued 20.11.2018. (In Russ.)
13. Prikaz MZ RF ot 01.04.2016 № 199n "Pravila nadležashchey laboratornoy praktiki" [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 01.04.2016 No. 199n "Rules of good laboratory practice"]. (In Russ.)
14. Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Manual for preclinical studies of drugs]. Moscow: Grif i K., 2012. (In Russ.)
15. Berezovskaya I.V. Prognoz bezopasnosti lekarstvennykh sredstv v doklinicheskikh toksikologicheskikh issledovaniyakh [Forecast of drug safety in preclinical toxicological studies]. *Toksikologicheskij vestnik [Toxicological Bulletin]* 2010; (5): 17-22. (In Russ.)
16. Voronina T.A., Garibova T.L., Krayneva V.A. Povedencheskiye eksperimental'nyye modeli depressii [Behavioral experimental models of depression]. *Farmakokinetika i farmakodinamika [Pharmacokinetics and pharmacodynamics]* 2017; 3: 14-19. (In Russ.)
17. Malygin A.S., Lomonosova I.A., Bogomolova O.A., Demidova M.A. Vliyaniye val'prazolamida na oriyentirovochno-issledovatel'skoye povedeniye myshey [Impact of Valprazolamide on the Exploratory Behavior in Mice]. *Meditsina [Medicine]* 2018; 4: 109-119. (In Russ.)
18. Dogan H., Duran A., Rollas S. et al. Synthesis of new 2,5-Disubstituted-1,3,4-thiadiazoles and preliminary evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 2893-2898.
19. Matysiak J. Biological and pharmacological activities of 1,3,4-thiadiazole based compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2015; 15(9):762-775.