



## Фармакологический скрининг нового производного вальпроевой кислоты с использованием метода фармакоэнцефалографии у крыс

Ю. И. Сысоев<sup>1,2✉</sup>, Д. Д. Шиц<sup>3</sup>, М. М. Пучик<sup>3</sup>, Т. А. Гутий<sup>1</sup>, Е. В. Федорова<sup>1</sup>,  
В. А. Приходько<sup>1,4</sup>, И. А. Титович<sup>1</sup>, А. С. Мелехова<sup>5</sup>, А. Я. Беспалов<sup>5</sup>, И. С. Князева<sup>4</sup>,  
Е. Б. Шустов<sup>5</sup>, С. В. Оковитый<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук» (ИФ им. И. П. Павлова). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

<sup>3</sup> Институт трансляционной биомедицины. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ИТБМ. ФГБОУ ВО СПбГУ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева Российской академии наук» (ИМЧ РАН). 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, лит. А

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России). 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

✉ Контактное лицо: Сысоев Юрий Игоревич. E-mail: [susoyev92@mail.ru](mailto:susoyev92@mail.ru)

ORCID: Ю. И. Сысоев – <http://orcid.org/0000-0003-4199-5318>; Д. Д. Шиц – <https://orcid.org/0009-0007-3804-0197>;

М. М. Пучик – <http://orcid.org/0000-0003-1281-4354>; Т. А. Гутий – <http://orcid.org/0009-0002-3843-0770>;

Е. В. Федорова – <http://orcid.org/0009-0002-7781-3563>; В. А. Приходько – <http://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; А. С. Мелехова – <http://orcid.org/0000-0003-1883-3815>;

А. Я. Беспалов – <http://orcid.org/0000-0002-8118-8306>; И. С. Князева – <http://orcid.org/0000-0003-0026-6047>;

Е. Б. Шустов – <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; С. В. Оковитый – <http://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 18.03.2024

Статья принята в печать: 00.04.2024

Статья опубликована: 26.04.2024

### Резюме

**Введение.** Наивный байесовский классификатор в комбинации с методом главных компонент позволяет эффективно различать эффекты антипсихотических средств, а также оценивать их дозозависимость по влиянию на параметры электрокортикограмм (ЭКоГ) у крыс. Для дальнейшего развития предложенного метода необходима его валидация в качестве инструмента скрининга новых малоизученных молекул. Перспективной нейрофармакологической группой являются производные вальпроевой кислоты, оказывающие не только противосудорожное, но также и нормотимическое, противомигренозное, нейропротекторное и обезболивающее действие.

**Цель.** Целью настоящей работы стало проведение фармакологического скрининга аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК), проявляющего свойства антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными средствами.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах с хронически имплантированными электрокортикографическими электродами. АВК вводили в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг. В качестве обучающей выборки, относительно которой классифицировали эффекты каждой дозы изучаемого соединения, использовали матрицы эффектов 7 препаратов: вальпроата натрия, блокатора дофаминовых D<sub>2</sub>-рецепторов галоперидола, М-холиноблокатора тропикамида, H<sub>1</sub>-гистаминоблокатора хлоропирамина, ингибитора ацетилхолинэстеразы галантамина, а также седативного средства дексмететомидина и анксиолитика фензепамы.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что АВК в дозе 0,5 мг/кг проявляет ЭКоГ-феномены, схожие с эффектами вальпроата натрия, а 10-кратное увеличение дозы приводит к преобладанию атропиноподобного действия. При введении в дозе 30 мг/кг соединение демонстрирует дексмететомидиноподобное действие. Способность АВК блокировать центральные М-холинорецепторы подтверждает арколиновый тест, в котором вещество в дозе 88 мг/кг полностью отменяло наступление тремора у мышей. Дексмететомидиноподобное действие блокировало введение атипамезола в эквивалентных количествах, что может говорить о способности АВК в высоких дозах активировать центральные α<sub>2</sub>-адренорецепторы. Результаты молекулярного докинга позволяют предположить, что этот эффект связан именно с исходной молекулой аминоэфир вальпроевой кислоты, а не с ее вероятными активными метаболитами.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают эффективность наивного байесовского классификатора как инструмента прогнозирования фармакологической активности соединений по их влиянию на параметры ЭКоГ у крыс. Определение новых фармакологических эффектов малоизученных соединений может расширить потенциальный спектр применения в клинической практике, а также выявить возможные нежелательные лекарственные реакции их будущих препаратов.

**Ключевые слова:** аминоэфир вальпроевой кислоты, фармакоэнцефалография, электрокортикография, метод главных компонент, наивный байесовский классификатор, крысы

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый – идея и планирование эксперимента. А. Я. Беспалов – синтез аминоэфира вальпроевой кислоты. Ю. И. Сысоев, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, Т. А. Гутий, Е. В. Федорова, И. А. Титович – проведение экспериментов и обработка данных. Ю. И. Сысоев, В. А. Приходько, Т. А. Гутий – подготовка иллюстраций. Ю. И. Сысоев, Е. В. Федорова, А. С. Мелехова, А. Я. Беспалов, И. А. Титович, В. А. Приходько, И. С. Князева, Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый – подготовка и редакция рукописи.

© Сысоев Ю. И., Шиц Д. Д., Пучик М. М., Гутий Т. А., Федорова Е. В., Приходько В. А., Титович И. А., Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Князева И. С., Шустов Е. Б., Оковитый С. В., 2024

© Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Gutiy T. A., Fedorova E. V., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Melekhova A. S., Bepalov A. Ya., Knyazeva I. S., Shustov E. B., Okovityi S. V., 2024

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-75-01051 (создание библиотеки записей, валидация метода).

**Для цитирования:** Сысоев Ю. И., Шиц Д. Д., Пучик М. М., Гутий Т. А., Федорова Е. В., Приходько В. А., Титович И. А., Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Князева И. С., Шустов Е. Б., Оковитый С. В. Фармакологический скрининг нового производного вальпроевой кислоты с использованием метода фармакоэнцефалографии у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1804>

## Pharmacological screening of a new valproic acid derivative using the pharmacoencephalography method in rats

Yuriy I. Sysoev<sup>1,2</sup>✉, Darya D. Shits<sup>3</sup>, Maria M. Puchik<sup>3</sup>, Timur A. Gutiy<sup>1</sup>, Elizaveta V. Fedorova<sup>1</sup>, Veronika A. Prikhodko<sup>1,4</sup>, Irina A. Titovich<sup>1</sup>, Aleksandra S. Melekhova<sup>5</sup>, Aleksandr Ya. Bespalov<sup>5</sup>, Irina S. Knyazeva<sup>4</sup>, Evgeniy B. Shustov<sup>5</sup>, Sergey V. Okovityi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

<sup>2</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. 6, naberezhnaya Makarova, Saint-Petersburg, 199034, Russia

<sup>3</sup> Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University. 7–9, Universitetskaya naberezhnaya, Saint-Petersburg, 199034, Russia

<sup>4</sup> N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain, RAS. 12A, Academician Pavlova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

<sup>5</sup> Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the FMBA. 1, Bekhtereva str., Saint-Petersburg, 192019, Russia

✉ **Corresponding author:** Yuriy I. Sysoev. E-mail: susoyev92@mail.ru

**ORCID:** Yuriy I. Sysoev – <http://orcid.org/0000-0003-4199-5318>; Darya D. Shits – <https://orcid.org/0009-0007-3804-0197>; Maria M. Puchik – <http://orcid.org/0000-0003-1281-4354>; Timur A. Gutiy – <http://orcid.org/0009-0002-3843-0770>; Elizaveta V. Fedorova – <http://orcid.org/0009-0002-7781-3563>; Veronika A. Prikhodko – <http://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Aleksandra S. Melekhova – <http://orcid.org/0000-0003-1883-3815>; Aleksandr Ya. Bespalov – <http://orcid.org/0000-0002-8118-8306>; Irina S. Knyazeva – <http://orcid.org/0000-0003-0026-6047>; Evgeniy B. Shustov – <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; Sergey V. Okovityi – <http://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

**Received:** 18.03.2024

**Accepted:** 00.04.2024

**Published:** 26.04.2024

### Abstract

**Introduction.** The naïve Bayes classifier combined with principal component analysis allows to distinguish the effects of antipsychotic agents effectively as well as evaluate their dose-dependency based on their impact on electroencephalogram parameters in rats. Further development of this method requires its validation as an instrument for the screening of new understudied molecules. Valproic acid derivatives appear to be a promising neuropharmacological group as they exhibit not only antiepileptic activity but also mood-stabilizing, antimigraine, neuroprotective and analgesic effects.

**Aim.** This work was carried out to perform the pharmacological screening of a valproic acid aminoester (AVA) that exhibits antidote properties in case of poisoning with anticholinesterase agents.

**Materials and methods.** The experiments were conducted in white outbred rats with chronically implanted electrocorticographic electrodes. AVA was administered at doses of 0,5, 5 and 30 mg/kg. The training set, used as a reference to determine the pharmacological effects of each dose of the investigated substance, included matrixes of effects of 7 drugs: the antiepileptic agent sodium valproate, the D<sub>2</sub>-dopamine receptor blocker haloperidol, the M-cholinergic receptor blocker tropicamide, the H<sub>1</sub>-histamine receptor blocker chloropyramine, the acetylcholinesterase inhibitor galantamine, the sedative dexmedetomidine, and the anxiolytic phenazepam.

**Results and discussion.** AVA at the dose of 0,5 mg/kg showed effects similar to those of sodium valproate, while a tenfold dose increase led to the predominance of an atropine-like effect. When administered at the dose of 30 mg/kg, the compound exhibited dexmedetomidine-like action. The central M-anticholinergic effect of AVA was confirmed by an arecoline test in mice, in which the substance at a dose of 88 mg/kg completely abolished the onset of tremor. Dexmedetomidine-like action was cancelled by the administration of atipamezole in equimolar quantities, which may indicate the potential capability of AVA to activate  $\alpha_2$ -adrenergic receptors at a high dose. The results of molecular docking suggest that this effect is related specifically to the original aminoester molecule and not to its presumable active metabolites.

**Conclusion.** The obtained results confirm the effectiveness of the naïve Bayes classifier as an instrument for the prediction of the pharmacological activity of compounds based on their impact on electroencephalogram parameters in rats. Identification of new pharmacological effects of understudied compounds may widen the potential range of their clinical application as well as reveal probable adverse effects.

**Keywords:** valproic acid aminoester, pharmacoencephalography, electrocorticography, principal component analysis, naïve Bayes classifier, rats

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Yuriy I. Sysoev, Sergey V. Okovityi – experimental design and planning. Aleksandr Ya. Bespalov – valproic acid aminoester synthesis. Yuriy I. Sysoev, Darya D. Shits, Maria M. Puchik, Timur A. Gutiy, Elizaveta V. Fedorova, Irina A. Titovich – experiment conduction and data analysis. Yuriy I. Sysoev, Veronika A. Prikhodko, Timur A. Gutij – visualization. Yuriy I. Sysoev, Elizaveta V. Fedorova, Veronika A. Prikhodko, Irina A. Titovich, Aleksandra S. Melekhova, Aleksandr Ya. Bespalov, Irina S. Knyazeva, Evgeniy B. Shustov, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

**Funding.** The work was carried out with the support of the Russian Science Foundation grant 23-75-01051 (electrocorticogram library creation, method validation).

**For citation:** Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Gutiy T. A., Fedorova E. V., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Melekhova A. S., Bespalov A. Ya., Knyazeva I. S., Shustov E. B., Okovityi S. V. Pharmacological screening of a new valproic acid derivative using the pharmacoencephalography method in rats. *Drug development & registration*. 2024;13(2). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1804>

## ВВЕДЕНИЕ

Фармакоэнцефалография (фармако-ЭЭГ) является чувствительным инструментом скрининга и классификации эффектов психоактивных молекул [1–3]. Несмотря на то, что в экспериментах на животных моделях данный метод предполагает регистрацию полевых потенциалов с имплантированных электродов, записываемый сигнал во многом аналогичен таковому при записи с поверхности головы. С развитием методов машинного обучения возникают новые возможности использования данных фармако-ЭЭГ для решения задач прогнозирования. В ранее опубликованной работе было показано, что наивный байесовский классификатор (НБК) в комбинации с методом главных компонент (МГК) позволяет дифференцировать действие антипсихотических средств от седативного, а также сравнивать эффекты препаратов данной группы между собой по их влиянию на параметры электрокортикограмм (ЭкоГ) у крыс [4]. Позже предложенный подход был эффективно использован для выявления дозозависимости эффектов хлорпромазина и прометазина, двух препаратов с выраженным дофамино- и холиноблокирующим действием [5].

Для дальнейшего развития предлагаемого метода необходима оценка его эффективности как инструмента фармакологического скрининга новых малоизученных соединений. В последние годы большой интерес фармакологов вызывают алифатические амиды, циклические аналоги и другие производные вальпроевой кислоты [6]. Вальпроевая кислота имеет множество молекулярных мишеней действия [7], что позволяет использовать ее не только как противоэпилептический препарат, но и как потенциальное средство лечения мигрени [8], биполярного расстройства [9], болезни Альцгеймера [10], болезни Паркинсона [11] и нейропатической боли [12]. Ее химическая модификация позволяет снизить риск возникновения нежелательных лекарственных реакций, а также расширить спектр фармакологического действия [6].

В лаборатории синтеза лекарственных препаратов ФГБУ НКТЦ им. С.Н. Голикова ФМБА России был синтезирован аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК, гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата), проявляющий свойства антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными средствами (АХЭС) [13]. Молекула представляет собой сложный эфир вальпроевой кислоты с N-метилпиперидин-4-олом. Последний способен взаимодействовать с анионным центром M-холинорецепторов в ЦНС, тем самым блокируя их от перевозбуждения избытком ацетилхолина в результате угнетения ацетилхолинэстеразы АХЭС. Образующаяся при гидролизе сложноэфирной связи вальпроевая кислота, вероятно, определяет противосудорожный эффект АВК [14, 15]. Сочетание в одной молекуле двух перечисленных фармакофорных фрагментов

обеспечивает комплексный характер ее фармакологической активности и позволяет достигать высокой эффективности как антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными токсикантами в дозе 43 мг/кг при умеренной собственной токсичности ( $LD_{50}$  у белых беспородных крыс при внутривенном введении составляет  $170 \pm 1,2$  мг/кг) [13].

Несмотря на то, что для соединения были показаны холинолитическая и противосудорожная активность, дозозависимость этих эффектов, а также влияние на работу других нейротрансмиссивных систем головного мозга у крыс неизвестны. В связи с этим **целью настоящей работы** был фармакологический скрининг разных доз АВК с использованием метода фармако-ЭЭГ у крыс. В качестве математического алгоритма классификации эффектов изучаемой молекулы был использован НБК. Обучающей выборкой служили эффекты различных доз вальпроевой кислоты, а также препаратов с M-холиноблокирующим, дофамино- и гистаминолитическим, антихолинэстеразным, анксиолитическим, седативным и снотворным действием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с использованием лабораторных животных были выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европы от 22 сентября 2010 г., принципами Базельской декларации и рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Протокол эксперимента был утвержден биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол-заявка R-PEEG3-SA-2022 от 12.09.2022). Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий.

### Лабораторные животные

Исследование фармако-ЭЭГ было выполнено на 66 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3 месяцев и массой 250–300 г, ареколиновый тест проводили на 14 белых беспородных мышах-самцах возрастом 3 месяца и массой 18–20 г. Животные были получены из ФГУП НИЦ «Курчатowski институт» – питомник «Рапполово» (Россия). Крыс содержали по 5 особей в клетке, мышей – по 7 особей при температуре в помещении 20–22 °С и световом режиме «12 ч свет 750 лк / 12 ч темнота». Все животные получали стандартный пищевой рацион (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм, рецепт ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) и имели свободный доступ к пище и воде. Перед началом экспериментов мыши и крысы прошли карантин в течение 14 суток.

## **Изготовление и имплантация ЭКoГ-электродов**

Этапы изготовления нихромовых кортикографических электродов, протокол их имплантации, а также процедуры послеоперационного ухода за животными были подробно описаны в ранее опубликованной работе [16]. Для наркотизации животных использовали тилетамин и золазепам («Золетил 50», 10 мг/кг, внутримышечно, Virbac, Франция). Электроды FP1 и FP2 располагали в области первичной двигательной коры (AP = 0.0, ML = 2.5, DV = 1.0), C3 и C4 – первичной соматосенсорной коры над гиппокампом (AP = -4.0, ML = 2.5, DV = 1.0), O1 и O2 – вторичной зрительной коры (AP = -7.0, ML = 2.5, DV = 1.0). Референтный электрод имплантировали в носовую кость, заземляющий – под кожу в области шеи.

## **Процедуры послеоперационного ухода**

Прооперированных крыс содержали в индивидуальных клетках с доступом к воде и корму *ad libitum* в течение всего периода исследования. Состояние животных оценивали сразу после выхода из наркоза и далее ежедневно утром и вечером; по необходимости обрабатывали швы 5%-м спиртовым раствором йода. Для профилактики возникновения инфекции сразу после операции животным вводили «Бициллин-3» (5000 ЕД/кг, подкожно, ОАО «Синтез», Россия), для снятия послеоперационной боли – кетопрофен (2,5 мг/кг, подкожно 1 раз в день в течение 3 дней, ООО «Велфарм», Россия). Во избежание обезвоживания крысам вводили подкожно 0,9%-й раствор натрия хлорида (5 мл 1 раз в день, ООО «Гротекс», Россия) в течение первых 3 дней после операции.

## **Условия регистрации ЭКoГ**

Запись ЭКoГ у животных делали не ранее 8-го дня после имплантации с помощью 8-канального энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» (ООО «Нейрософт», Россия) с полосой пропускания 0,5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Регистрацию сигнала проводили одновременно с видеосъемкой поведения в условиях домашней клетки при искусственном освещении. Длительность записи составляла 1 час и включала в себя 30 минут фоновой активности (до введения препарата или физиологического раствора) и 30 минут после инъекции. Для дальнейшего анализа брали два участка записи по 60 секунд: непосредственно перед введением и спустя 20 минут после. На основании результатов предыдущих работ [4, 5] и собственного опыта использования поведенческих тестов большинство лекарственных средств, оказывающих влияние на ЦНС при внутрибрюшинном введении, успевают реализовать выраженный эффект в течение 20 минут. Исключение составляют препараты с субстратным механизмом действия (например, ноотропы) или пролекарства, но таковые в настоящей работе не использовались. Выбранные для ана-

лиза фрагменты содержали запись ЭКoГ в спокойном бодрствующем состоянии, так как двигательная активность (локомоция, стойки, груминг или скрэтчинг) могут в значительной мере затруднять выявление и различие эффектов препаратов на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс [17]. Рассматриваемый в этой работе и описанный в предыдущих статьях [4, 5] подход к классификации и прогнозированию не ограничивает продолжительность отбираемых участков кортикограмм. Однако ввиду высокой фоновой активности некоторых крыс и, следовательно, необходимости очистки сигнала 60-секундная длительность была выбрана как оптимальная.

## **Вводимые препараты**

Все используемые препараты вводили внутрибрюшинно, при необходимости предварительно растворив в физиологическом растворе до нужной концентрации. АВК вводили в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг исходя из ранее опубликованных работ [13, 15], а также имеющихся записей разных доз тропикамида [5]. Аналогичным образом были выбраны дозы вальпроата натрия, однако, учитывая, что в настоящем исследовании доза 0,5 мг/кг не оказала значимого эффекта на параметры ЭКoГ у крыс, максимальную дозу увеличили до 100 мг/кг. В обучающую выборку, относительно которой выявляли фармакологические эффекты АВК, были включены вальпроат натрия (VPA), а также использованные в предыдущих работах [4, 5] тропикамид (TRO), галоперидол (HAL), хлоропирамин (CPM), галантамин (GAL), дексмететомидин (DEX) и феназепам (PHE) (таблица 1). В качестве контроля вводили физиологический раствор (ООО «Гротекс», Россия) в дозе 0,5 мл. Для оценки роли  $\alpha_2$ -адренорецепторов в развитии фармакологического эффекта максимальной дозы АВК были собраны записи ( $n = 5$ ), в которых крысам через 10 мин после введения АВК в дозе 30 мг/кг вводили антагонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов атипамезол (ООО «Апиценна», Россия) в эквимолярном количестве (20 мг/кг).

Для каждого препарата было сделано по 10 записей у разных животных. Например, АВК в дозе 30 мг/кг вводили крысам: #34, #38, #39, #41, #44, #47, #48, #56, #59, #60. Введение нового препарата осуществляли не ранее чем через 2–3 дня после предыдущей записи для исключения взаимодействия и остаточных эффектов. Число тестирований (обычно не больше 5–6) той или иной крысы определялось сохранностью хэдплага (коннектора с электродами), а также общим состоянием животного. В случае признаков инфекционного воспаления (гноя вокруг хэдплага, появления порфирина в области носа или глаз и др.) вводили повторно «Бициллин-3» (5000 ЕД/кг, подкожно, ОАО «Синтез», Россия) и следующее тестирование проводили не ранее чем через неделю. Если состояние не улучшалось, то животное

**Таблица 1.** Препараты и их дозы, используемые в качестве обучающей выборки для классификации эффектов аминоэфир вальпроевой кислоты. ГАМК –  $\gamma$ -аминофенилмасляная кислота, АХЭ – ацетилхолинэстераза; М-ХР – М-холинорецепторы;  $\alpha_2$ -АР –  $\alpha_2$ -адренорецепторы. VPA – вальпроат натрия; ТРО – тропикамид; HAL – галоперидол; СРМ – хлоропирамин; GAL – галантамин; DEX – дексдетомидин; PHE – феназепам

**Table 1.** Agents used as the training set to classify the effects of the valproic acid aminoester and their doses.

GABA –  $\gamma$ -aminophenylbutyric acid, AChE – acetylcholinesterase; M-ChR – M-cholinergic receptors;  $\alpha_2$ -AR –  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. VPA – sodium valproate; TRO – tropicamide; HAL – haloperidol; CPM – chloropyramine; GAL – galantamine; DEX – dexmedetomidine; PHE – phenazepam

Препарат Agent	Производитель Manufacturer	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Мишень* Target*	Действие у крыс Effects in rats
VPA	G. L. Pharma GmbH (Австрия) G. L. Pharma GmbH (Austria)	5.0	Na <sup>+</sup> -каналы, Ca <sup>2+</sup> -каналы, ГАМК <sub>A</sub> -рецепторы (?) Na <sup>+</sup> channels, Ca <sup>2+</sup> channels, GABA <sub>A</sub> receptors (?)	Противосудорожное [18] Anticonvulsant [18]
		30.0		
		100.0		
TRO	Tocris Bioscience (Великобритания) Tocris Bioscience (Great Britain)	0,5	M-ХР M-ChR	Атропиноподобное [19] Atropine-like [19]
		5.0		
		30.0		
HAL	ООО «Велфарм» (Россия) LLC "Velpharm" (Russia)	0.3	D <sub>2</sub> -рецепторы D <sub>2</sub> receptors	Антипсихотическое [20] Antipsychotic [20]
		2.0		Каталептогенное [21] Cataleptogenic [21]
CPM	EGIS Pharmaceuticals PLC (Венгрия) EGIS Pharmaceuticals PLC (Hungary)	20.0	H <sub>1</sub> -рецепторы H <sub>1</sub> receptors	Седативное (?) Sedative (?)
GAL	Sopharma AD (Болгария) Sopharma AD (Bulgaria)	1.0	АХЭ AChE	↓ АХЭ в головном мозге [22] ↓ AChE in the brain [22]
DEX	Orion Corporation (Финляндия) Orion Corporation (Finland)	0.005	$\alpha_2$ -АР $\alpha_2$ -AR	Умеренное седативное [23] Moderate sedative [23]
		0.1		Сильное седативное [23] Strong sedative [23]
PHE	АО «Новосибхимфарм» (Россия) JSC "Novosibchimpharm" (Russia)	1.0	ГАМК <sub>A</sub> -рецепторы GABA <sub>A</sub> receptors	Седативное/снотворное [24] Sedative/hypnotic [24]

**Примечание.** \* Преимущественные молекулярные мишени действия.

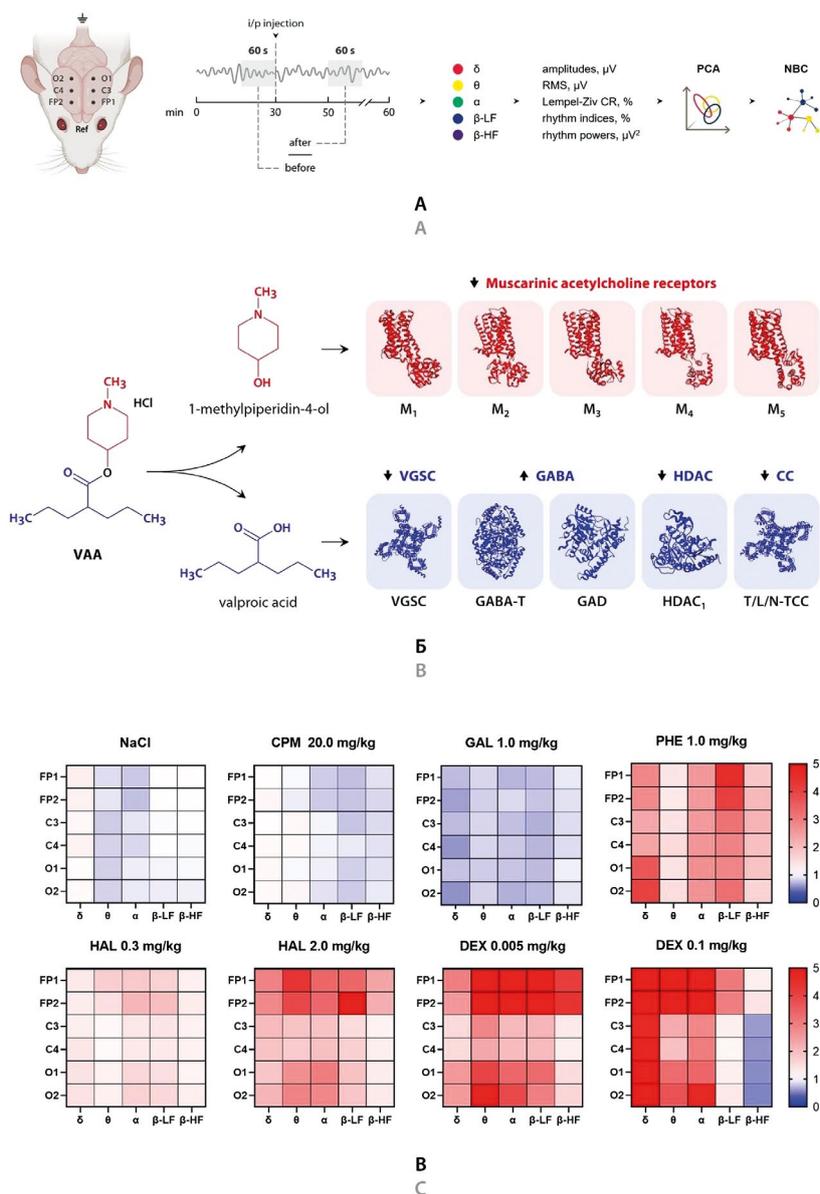
**Note.** \* Preferential molecular targets of action.

выводили из эксперимента. Еще одним критерием исключения было снижение качества фонового ЭКГ-сигнала, что обычно происходит при длительном (более месяца) использовании животного. Наиболее часто ухудшение сигнала проявляется в виде выраженного снижения амплитуды во всех отведениях либо появления всплесков эпиактивности (спайков и острых волн на ЭКГ). Всего в общий анализ вошли данные, полученные на 66 крысах.

### **Анализ ЭКГ-сигнала, уменьшение размерности и прогнозирование**

Анализ полученных записей осуществляли с помощью программы «Нейрон-Спектр.NETomega 1.6.10.8» (ООО «Нейрософт», Россия). Для всех 6 отведений (FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2) рассчитывали в общей сложности 132 амплитудно-спектральных характеристики ЭКГ, включавших в себя среднюю и максимальную амплитуды сигнала, среднеквадратичное отклонение амплитуды сигнала и степень сжатия по Лемпелю – Зиву. Последний характеризует повторяемость сигнала, т.е. чем повторяемость больше, тем степень сжатия выше. Этот показатель

встроен во многие программные комплексы работы с биомедицинскими сигналами и используется некоторыми исследователями для анализа ЭЭГ у крыс [25]. С помощью быстрого преобразования Фурье сигнал ЭКГ переводили из временной в частотную область. Из сигнала выделяли  $\delta$ - (0.5–4.0 Гц),  $\theta$ - (4.0–8.0 Гц),  $\alpha$ - (8.0–14.0 Гц) и  $\beta$ -ритмы (низкочастотные (НЧ) – 14.0–20.0 Гц и высокочастотные (ВЧ) – 20.0–35.0 Гц). Рассчитывали средние амплитуды ритмов волн, индексы и средние мощности ритмов. Индекс ритмов определяли как отношение площади под графиком спектра в частотном диапазоне конкретного ритма к общей площади под графиком спектра в полосе пропускания. Средняя мощность была рассчитана как усредненная мощность спектра в заданном частотном диапазоне. Параметры расчетов мощности: частота квантования – 500 Гц, длина эпохи анализа – 5 с, максимальное перекрытие эпох – 30 %, число точек для быстрого преобразования Фурье – 2048. Данные выражали как соотношения значений параметров после введения препарата к значениям соответствующих параметров до введения (рисунок 1).



**Рисунок 1. А.** Этапы эксперимента:

I/p – внутривенно; RMS – среднеквадратичное отклонение; CR – степень сжатия; LF – низкочастотные; HF – высокочастотные; PCA – метод главных компонент; NBC – наивный байесовский классификатор; Ref – референтный электрод.

**Б.** Структурная формула аминокислоты вальпроат, предполагаемые активные метаболиты и их фармакологические мишени:

VGSC, voltage-gated sodium channels – потенциалзависимые натриевые каналы; GABA-T, GABA transaminase – трансаминаза ГАМК; GAD, glutamate decarboxylase – глутаматдекарбоксилаза; HDAC1, histone deacetylase 1 – гистондеацетилаза-1; T/L/N-TCC, T/L/N-type calcium channels – кальциевые каналы T/L/N-подтипа.

**В.** Тепловые карты медианных значений средней мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении физиологического раствора (NaCl), галоперидола (HAL), галантамина (GAL), дексмететомидина (DEX), хлоропирамина (CPM) и феназепам (PHE). Исходными данными были отношения значений средней мощности ритмов спустя ~20 мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения (~30-я минута фоновой записи). Для каждой группы было сделано по 10 записей

**Figure 1. A.** Stages of the experiment:

I/p – intraperitoneal; RMS – root mean square; CR – compression ratio; LF – low-frequency; HF – high-frequency; PCA – principal component analysis; NBC – naïve Bayes classifier; Ref – reference electrode.

**B.** Structural formula of AVA, its presumed active metabolites and their pharmacological targets:

VGSC, voltage-gated sodium channels; GABA-T,  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase; GAD, glutamate decarboxylase; HDAC1, histone deacetylase 1; T/L/N-TCC, T/L/N-type calcium channels.

**C.** Heatmaps of mean rhythm power for the  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - and  $\beta$ -rhythms in channels FP1, FP2, C3, C4, O1, and O2 following administration of saline (NaCl), haloperidol (HAL), galantamine (GAL), dexmedetomidine (DEX), chlorpyramine (CPM), phenazepam (PHE). The heatmap reflects the ratios of mean rhythm power values at ~20 min after drug administration to the respective values before the administration (~30<sup>th</sup> minute into the baseline record). 10 records per group were made

Обработку и последующий анализ полученных данных выполняли с помощью надстройки для MS Excel XLSTAT 2016.02.28451. Уменьшение размерности данных осуществляли с помощью метода главных компонент (МГК), который применяли к стандартизованным данным  $X_{norm}$  ( $X - \text{mean}(X)/\text{std}(X)$ ). Далее делали разложение корреляционной матрицы  $X_{norm}^T \cdot X$ . После обучали модель НБК и проводили классификацию по 4 новым интегративным показателям PC1, PC2, PC3 и PC4, описывающим порядка 80 % дисперсии данных [5]. В качестве обучающей выборки были использованы матрицы эффектов вальпроата натрия, тропикамида, галантамина, галоперидола, хлоропирамина, дексмететомидина и феназепам.

### Ареколиновый тест

Ареколиновый тест используют для выявления центрального М-холиноблокирующего действия веществ, о котором говорит уменьшение продолжительности тремора или его полное устранение [26]. Ареколин – М-холиномиметик, по действию похожий на пилокарпин, но лучше проникающий через ГЭБ, в связи с чем проявляющий центральные М-холиномиметические эффекты. Животные были разделены на 2 группы по 7 животных: контроль и мыши, которым вводили АВК подкожно в дозе 88 мг/кг ( $1/2 LD_{50}$ ) однократно за 30 мин до инъекции ареколина (25 мг/кг подкожно в область холки). Регистрировали латентный период наступления тремора (минуты), длительность тремора (минуты), выраженность генерализованного мелко- и средне-амплитудного тремора тела животного (баллы, в среднем за период тремора).

### Молекулярный докинг

Для компьютерного моделирования из базы данных Protein Data Bank<sup>1</sup> загружали объемные структуры  $\alpha_2$ -адренорецепторов (ADRA2): А (PDB ID: 6KUX) с разрешением 2.70 Å, полученный методом рентгеноструктурного анализа (РСА); В (PDB ID: 6K41) с разрешением 2.90 Å, полученный методом криоэлектронной микроскопии; С (PDB ID: 6KUW) с разрешением 2.80 Å, полученный методом РСА. Молекулярный докинг был проведен сервером Galaxy7TM<sup>2</sup>. Подготовка структур белков и лигандов при pH = 7.4, оптимизация структур «белок – лиганд» и расчет свободной энергии связывания методом MM/GBSA выполняли с помощью скриптов, написанных на языке программирования Python 3.9 с использованием

<sup>1</sup> Protein Data Bank (PDB). Available at: <https://www.rcsb.org/> Accessed: 18.03.2024.

<sup>2</sup> Galaxy7TM. Available at: <http://galaxy.seoklab.org/7TM>. Accessed: 18.03.2024.

библиотек RDKit и OpenBabel. Оценку связывания лигандов в активных сайтах и их визуализацию проводили в программе PyMOL 2.5.4<sup>3</sup>, объем полостей в белках рассчитан в модуле PyVOL 1.7.6. Объем Ван-дер-Ваальса лигандов был вычислен с помощью программы MarvinSketch 23.16. Конкретные аминокислотные остатки названы согласно трехбуквенной номенклатуре с добавлением их порядкового номера в цепи рецептора.

### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 9.0.0. Достоверность различий оценивали по непараметрическому методу точной вероятности Фишера. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Прогнозирование фармакологической активности АВК с помощью НБК

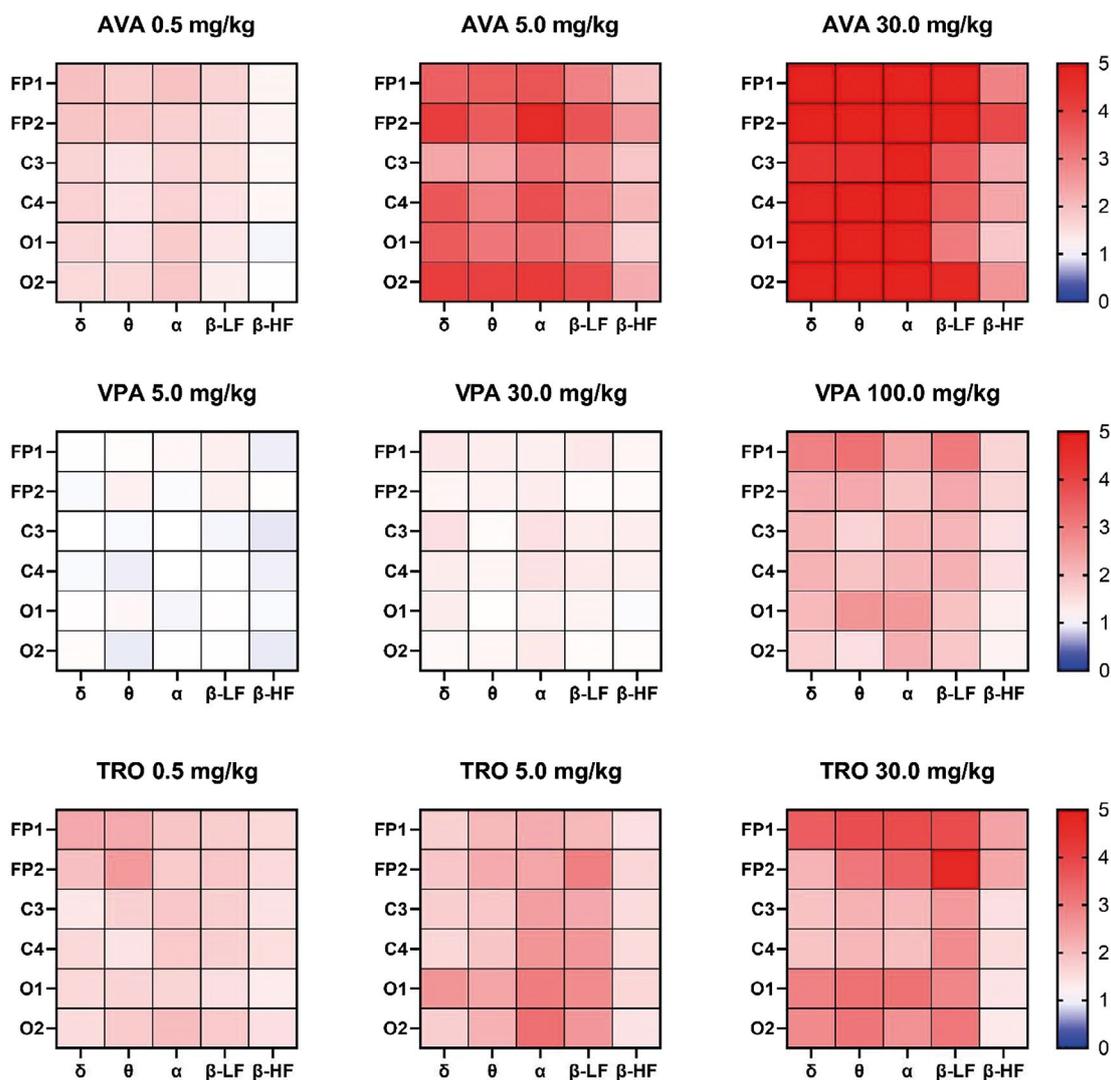
Введение препаратов из обучающей выборки вызывало специфические изменения амплитудно-спектральных характеристик электрокортикограмм (ЭКОГ) у крыс. На рисунках 1 и 2 представлены тепловые карты медианных значений средней мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов в регистрируемых отведениях при введении физиологического раствора, галоперидола, галантамина, дексмететомидина, хлоропирамина, феназепам и тропикамида. Стоит отметить, что в контрольной группе также были отмечены характерные изменения, проявляющиеся некоторым подъемом активности  $\delta$ - и снижением  $\theta$ -,  $\alpha$ -ритмов. Вероятно, это связано с тем, что в течение 50 минут после начала записи (30 минут фона и 20 минут после инъекции) испытываемые животные теряют интерес к экспериментаторам и к расположенным рядом компьютеру, штативу для проводов и пр. Введение галантамина в дозе 1 мг/кг снижало среднюю мощность  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов во всех отведениях. Эффекты хлоропирамина, галоперидола, феназепам и дексмететомидина (рисунок 1 С), а также тропикамида (рисунок 2) были описаны в предыдущей работе [5].

Введение вальпроевой кислоты (рисунок 2) в наименьшей из тестируемых доз (5 мг/кг) несколько увеличивало мощность  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -НЧ-ритмов во фронтальных отведениях и снижало активность  $\beta$ -НЧ-ритмов во всех областях. Увеличение дозы препарата до 30 мг/кг усиливало мощность преимущественно

<sup>3</sup> PyMOL. Available at: <https://pymol.org/2/> Accessed: 18.03.2024.

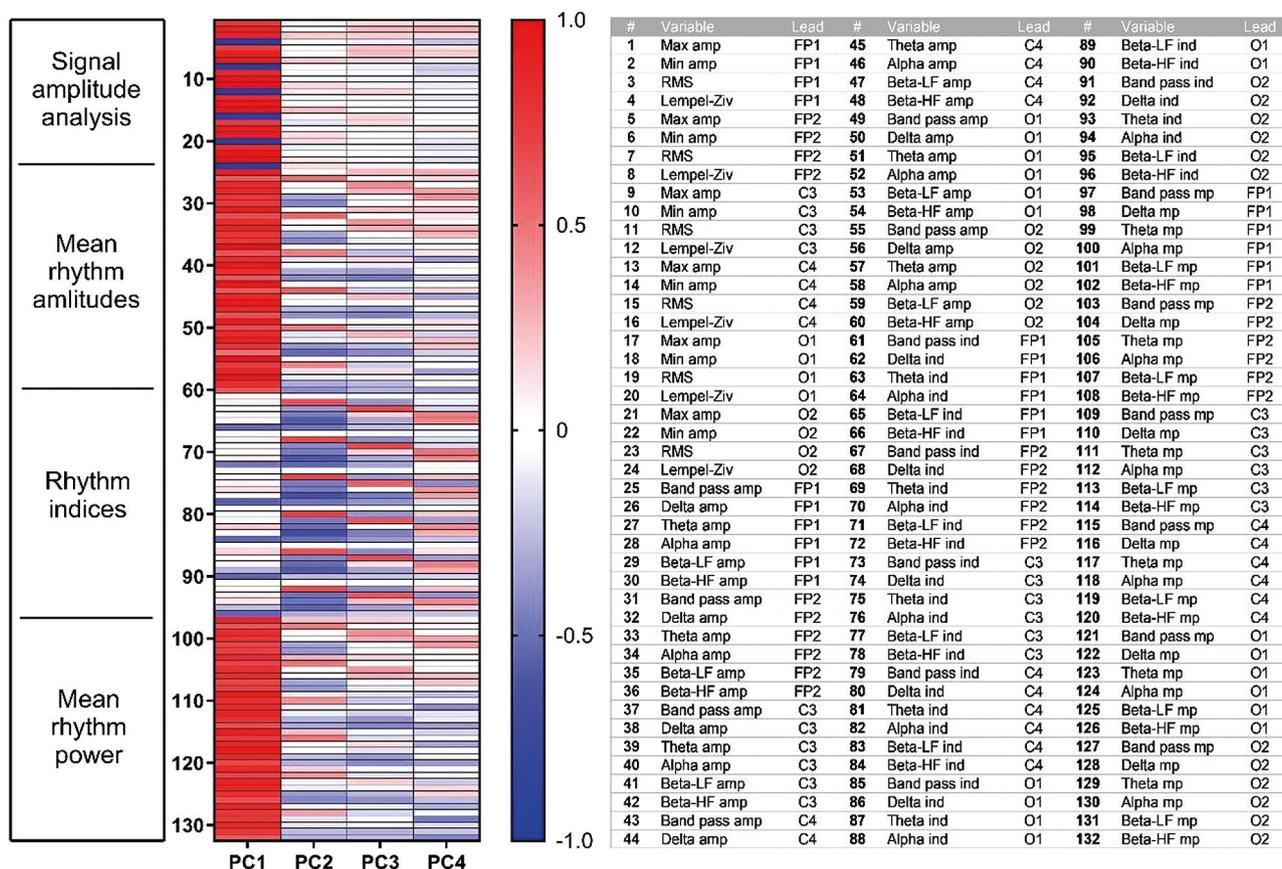
но  $\delta$ - и  $\alpha$ -ритмов (в  $\sim 1,5$  раза по сравнению с базовым уровнем) без какой-либо выраженной специфичности. Также для этой дозы было характерно слабое увеличение активности обоих  $\beta$ -ритмов в области первичной соматосенсорной коры (электроды C3 и C4). Доза вальпроевой кислоты 100 мг/кг в 2–2,5 раза увеличивала среднюю мощность  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -НЧ-ритмов и в  $\sim 1,5$  раза –  $\beta$ -ВЧ-ритмов. АВК во всех тестируемых дозах линейно увеличивал среднюю мощность  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -НЧ-ритмов (рисунок 2); увеличение активности  $\beta$ -ВЧ-ритмов было заметно с дозы 5 мг/кг. Выявленные изменения были чуть более выражены во фронтальных областях коры.

Анализ полученных данных МГК показал, что 77,3% дисперсии могут быть описаны 4 главными компонентами (PC1 – PC4), которые использовали для дальнейшей работы. Факторные нагрузки амплитудно-спектральных характеристик ЭКоГ, характеризующие их вклад в формирование той или иной главной компоненты, приведены в виде тепловой карты на рисунке 3. Компонента PC1, описывающая 52,3% дисперсии, была образована амплитудными характеристиками сигнала (как в целом, так и отдельными ритмами), а также коррелирующими с ними значениями спектральной мощности ритмов. Все перечисленные параметры ЭКоГ влияли на значение



**Рисунок 2.** Тепловые карты медианных ( $n = 10$  для каждой группы) значений средней мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении аминокэстера вальпроевой кислоты (AVA), вальпроата натрия (VPA) и тропикамида (TRO). Исходными данными были отношения значений средней мощности ритмов спустя  $\sim 20$  мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения ( $\sim 30$ -я минута фоновой записи). Для каждой группы было сделано по 10 записей

**Figure 2.** Heatmaps of mean ( $n = 10$  for each group) rhythm powers for the  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - and  $\beta$ -rhythms in channels FP1, FP2, C3, C4, O1, and O2 following the administration of valproic acid aminoester (AVA), sodium valproate (VPA) and tropicamide (TRO). The heatmaps reflect the ratios of mean rhythm power values at  $\sim 20$  min after drug administration to the respective values before the administration ( $\sim 30^{\text{th}}$  minute into the baseline record). 10 records per group were made



**Рисунок 3.** Факторные нагрузки, характеризующие степень вовлечения каждого из 132 анализируемых параметров в формирование компонент PC, PC2, PC3 и PC4, используемых для дальнейших вычислений с использованием НБК.

Amp – амплитуда (мкВ); RMS – среднееквадратичное отклонение (мкВ); Lempel – Ziv – степень сжатия по Лемпелю – Зиву (%), ind – индекс ритма (%), mp – средняя мощность ритма (мкВ<sup>2</sup>)

**Figure 3.** Factor loadings reflecting the degree of involvement of each of the 132 parameters analyzed into the formation of the PC, PC2, PC3, and PC4 principal components, used for the subsequent analysis using the NBC.

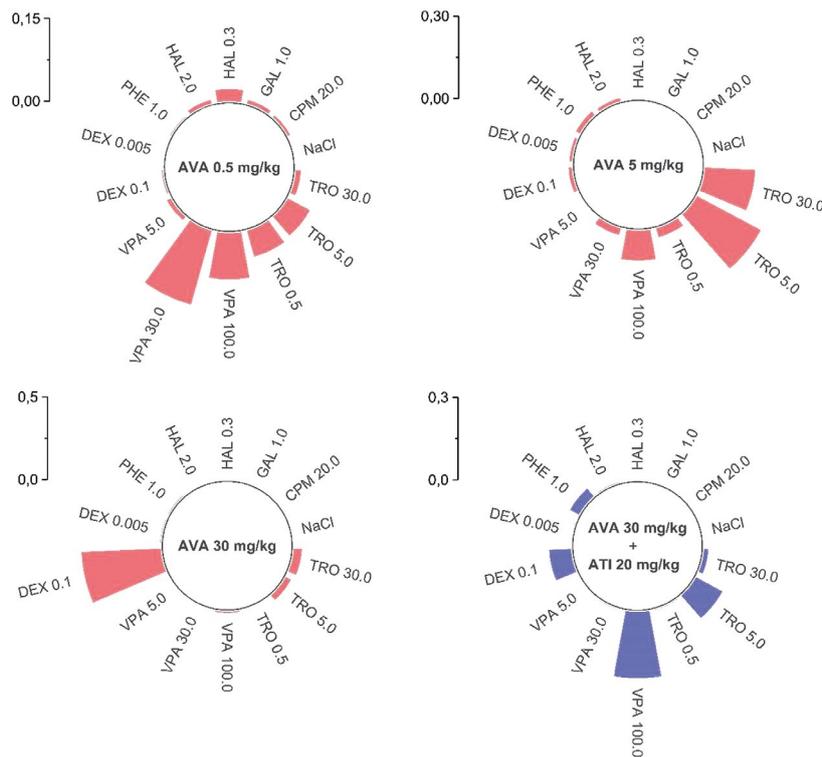
Amp – amplitude (μV); RMS – root mean square (μV); Lempel – Ziv, Lempel – Ziv compression ratio (%); ind – rhythm index (%); mp – mean rhythm power (μV<sup>2</sup>)

PC1 вне зависимости от расположения регистрирующих электродов. На значение компоненты PC2 (12,2%) в большей степени оказывала воздействие активность δ- и β-ритмов во всех отведениях. Величину PC3 (7,4%) практически полностью определяли индексы δ- и θ-ритмов. Компонента PC4 (5,3%) была образована преимущественно величиной средней амплитуды и мощности θ-ритма в теменных и затылочных областях коры. В целом первые четыре главные компоненты образовывали те же самые показатели, что и в ранее опубликованной работе [5].

Далее для всех записей из обучающей выборки, а также 3 доз АВК были рассчитаны значения по 4 новым параметрам (главным компонентам PC1 – PC4). В таблице 2 приведены примеры значений главных компонент 10 записей изучаемого соединения в дозе 0,5 мг/кг. После этого на основании рассчитанных данных осуществляли прогнозирование фармакологической активности АВК в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг с использованием НБК. Для каждой записи

были получены вероятности совпадения эффектов на ЭЖГ с таковыми у препаратов обучающей выборки (вальпроата натрия, тропикамида, галоперидола, хлоропирамина, галантамина, дексмететомидина и феназепам). Для всех тестируемых групп рассчитывали медианное значение вероятности сходства с той или иной референтной группой, на основании чего можно было сделать выводы о характере действия той или иной дозы АВК (рисунок 4).

АВК в дозе 0,5 мг/кг продемонстрировал наибольшее сходство эффектов с вальпроатом натрия в дозах 30 и 100 мг/кг (медианные значения вероятности сходства 0,139 и 0,084 соответственно). Для этой дозы также было выявлено некоторое холинолитическое действие, о чем свидетельствует определение изучаемого вещества как «тропикамида» в дозах 0,5 и 5 мг/кг (0,049 и 0,045 соответственно). Увеличение дозы АВК до 5 мг/кг приводило к преобладанию М-холиноблокирующего эффекта (сходство с тропи-



**Рисунок 4.** Радиальные диаграммы медианных значений вероятности сходства фармакологической активности аминоэфира вальпроевой кислоты (АВК, AVA) в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг, а также АВК с антагонистом  $\alpha_2$ -адренорецепторов атипамезолом (АТИ) с препаратами обучающей выборки, полученных с использованием НБК.

СРМ – хлоропирамин; GAL – галантамин; HAL – галоперидол; PHE – феназепам; DEX – дексмететомидин; VPA – вальпроат натрия; TRO – тропикамид

**Figure 4.** Radar bar plots for the median identity probability values for the valproic acid aminoester (AVA) pharmacological activity at the doses of 0,5, 5 and 30 mg/kg, and AVA with the  $\alpha_2$ -adrenergic blocker atipamezole (ATI) with the training set drugs, obtained using the naïve Bayes classifier.

СРМ – chloropyramine; GAL – galantamine; HAL – haloperidol; PHE – phenazepam; DEX – dexmedetomidine; VPA – sodium valproate; TRO – tropicamide

камидом 5 и 30 мг/кг составило 0,261 и 0,182 соответственно). У дозы 5 мг/кг НБК определял также некоторое вальпроатоподобное действие (сходство с вальпроатом натрия 100 мг/кг составило 0,108). Наибольшая из изучаемых доз АВК (30 мг/кг) была классифицирована как  $\alpha_2$ -адреномиметическая (дексмететомидиноподобная, медианное значение вероятности сходства 0,477). Блокада  $\alpha_2$ -адренорецепторов введением антагониста атипамезола возвращала действие изучаемого препарата в дозе 30 мг/кг к вальпроатоподобному и холинолитическому (сходство с вальпроатом натрия в дозе 100 мг/кг 0,241 и тропикамидом в дозе 5 мг/кг 0,108). При этом после введения  $\alpha_2$ -адреноблокатора некоторое дексмететомидиноподобное действие все же сохранялось (0,079).

### Ареколиновый тест

Введение АВК в дозе 88 мг/кг устраняло центральные эффекты М-холиномиметика ареколина (возникновение тремора), таким образом проявляя центральную М-холинолитическую активность (таблица 3).

**Таблица 2.** Пример рассчитанных значений главных компонент PC1 – PC4 для 10 записей, полученных после введения АВК в дозе 0,5 мг/кг

**Table 2.** An example of calculated principal component PC1 – PC4 values for 10 records obtained after valproic acid aminoester administration at the dose of 0,5 mg/kg

Запись Entry	Главные компоненты Principal components			
	PC1 (52,3 %)	PC2 (12,3 %)	PC3 (7,4 %)	PC4 (5,35 %)
1	-5,099	-1,149	0,895	-0,578
2	-0,516	-3,436	3,412	-1,768
3	-4,596	2,971	-0,342	0,090
4	4,268	4,501	-4,858	1,281
5	-3,333	3,553	0,596	-0,176
6	-2,113	1,652	0,193	0,547
7	-6,485	-1,063	1,688	-1,345
8	-6,900	3,526	-1,432	-0,378
9	-3,750	0,696	-0,472	1,212
10	-4,189	1,137	1,733	-1,624

**Примечание.** В скобках указан процент дисперсии данных, описываемый соответствующей главной компонентой.

**Note.** The percentage of data variance described by the corresponding principal component is indicated in parentheses.

**Таблица 3. Результаты ареколинового теста**

**Table 3. Arecoline test results**

Показатель Parameter	Ареколин Arecoline	Ареколин + АВК Arecoline + AVA	Достоверность различий, $p <$ Statistical significance, $p <$
Латентный период тремора, мин Tremor onset latency, min	1,56 ± 0,05	тремор отсутствует no tremor	0,003*
Длительность тремора, мин Tremor duration, min	25,3 ± 2,4	тремор отсутствует no tremor	0,003*
Интенсивность тремора, баллы Tremor intensity, points	1,89 ± 0,12	тремор отсутствует no tremor	0,003*

**Примечание.** \* Достоверность различий оценивали по непараметрическому методу точной вероятности Фишера.

**Note.** \* The significance of differences was assessed using the nonparametric Fisher exact probability method.

### Молекулярный докинг

Для валидации полученного сходства эффектов АВК в дозе 30 мг/кг с дексмедетомидином была проведена оценка связывания молекулы (а также ее вероятных метаболитов – вальпроевой кислоты и N-метилпиперидин-4-ола) с 3 подтипами  $\alpha_2$ -адренорецепторов (A2A, A2B и A2C) методом молекулярного докинга. Было выбрано 10 лучших моделей комплексов «белок – лиганд» каждой из вариаций для оценки места связывания [27]. Значения энергий ( $G_{dock}$ ,  $G_{bind}$  и  $G_{comp}$ ), указанные в таблицах на рисунках 5–7, являются средними арифметическими этих десяти результатов. Более отрицательные энергии указывают на большую аффинность данного соединения по отношению к данному рецептору. В качестве референтного внутреннего лиганда был выбран норадреналин.

По результатам MM/GBSA было установлено, что АВК имеет примерно одинаковое сродство к рецепторам всех трех подтипов: энергии взаимодействия АВК-ADRA2A, АВК-ADRA2B и АВК-ADRA2C, полученные методом MM/GBSA, составили –54,289, –49,195 и –50,738 ккал/моль соответственно (для сравнения: энергии взаимодействия норадреналина с теми же рецепторами составили –54,810, –54,699 и –50,303 ккал/моль соответственно). Вальпроевая кислота и N-метилпиперидин-4-ол имели достаточно высокие значения энергий взаимодействия, входящие в диапазон –36,639 ÷ –15,219 ккал/моль, из чего можно сделать вывод об отсутствии сродства данных молекул по отношению к  $\alpha_2$ -адренорецепторам.

На сегодняшний день вальпроевая кислота является одним из наиболее часто назначаемых противосудорожных препаратов, эффективным практически при всех формах эпилепсии [28]. Дальнейшее изучение позволило рассмотреть ее в качестве средства для лечения пациентов с биполярным аф-

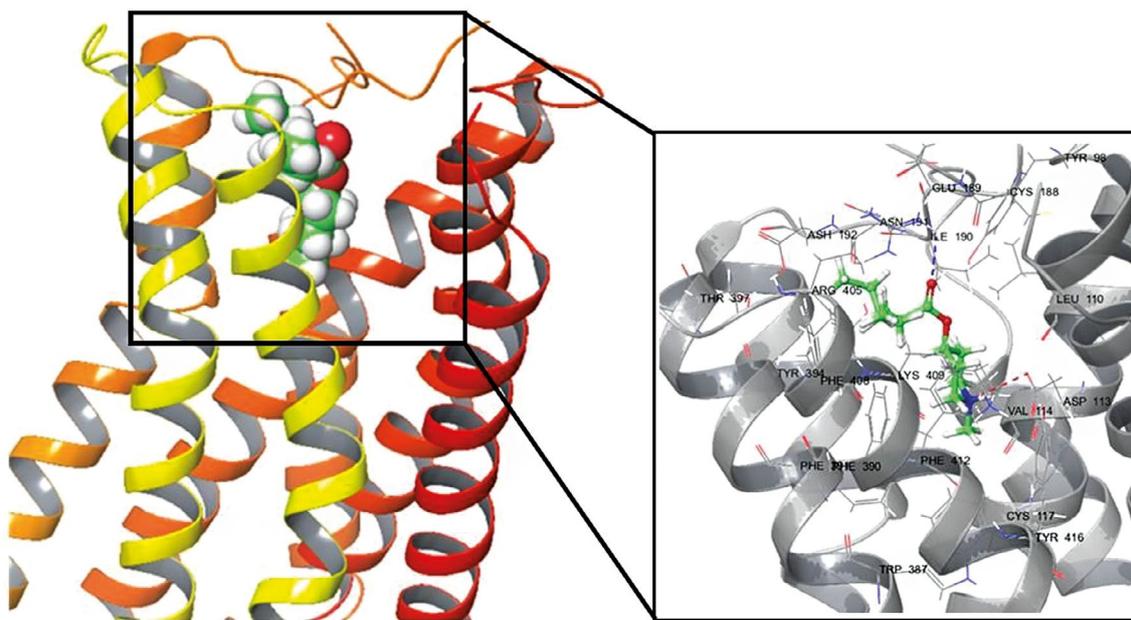
фективным расстройством [9], мигренью [8] и нейропатиями [12]. В попытках минимизации побочных эффектов (главным образом эмбрио- и гепатотоксичности) и увеличения клинической эффективности вальпроевой кислоты были синтезированы ее различные аналоги и производные. Первичные модификации молекулы включали изменение карбоксильной группы (замена амидом), изменение основной цепи (замена циклическими звеньями) и/или изменение характера ветвления путем введения ненасыщенных связей [6].

Изучаемый в данной работе АВК представляет из себя сложный эфир вальпроевой кислоты с пиперидиновым фрагментом (N-метилпиперидин-4-олом). Пиперидиновый фрагмент способен взаимодействовать с анионным центром М-холинорецепторов в ЦНС, тем самым блокируя рецепторы от перевозбуждения избытком ацетилхолина в результате токсического действия ингибиторов ацетилхолинэстеразы при отравлении ими. Другой фрагмент, отщепляясь при гидролизе сложноэфирной связи в условиях *in vivo*, образует вальпроевую кислоту, что определяет противосудорожное действие АВК. Сочетание в одной молекуле двух указанных механизмов позволяет рассматривать соединение как эффективный антидот при острых отравлениях АХЭС [15].

В проведенном исследовании был впервые осуществлен фармакологический скрининг АВК в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг с использованием фармако-ЭЭГ и методов машинного обучения (НБК). Предлагаемый метод позволил выявить у молекулы дозозависимые вальпроатоподобные и холинолитические эффекты, что согласуется с ее изначально заявленной активностью. В ареколиновом тесте соединение полностью отменяло наступление тремора у мышей, что подтверждает спрогнозированное атропиноподобное действие.

Полученное для высокой дозы АВК сходство с дексмедетомидином, отменяемое атипамезолом, вероятнее всего, свидетельствует об активации изучаемым соединением  $\alpha_2$ -адренорецепторов. Этот эффект может быть, с одной стороны, связан с активностью именно пиперидинового фрагмента, поскольку введение  $\alpha_2$ -антагониста восстанавливало в большей степени вальпроатоподобное действие, но не М-холиноблокирующее. Частичное сохранение группой AVA + AT1 сходства с дексмедетомидином и неполное восстановление холинолитического эффекта может свидетельствовать о том, что N-метилпиперидин-4-ол способен взаимодействовать не только с анионным центром М-холинорецепторов, но и  $\alpha_2$ -адренорецепторами.

На сегодняшний день среди классических агонистов  $\alpha_2$ -адренорецепторов (клонидин, дексмедетомидин, гуанфацин и др.) еще не было синтезировано производных пиперидина. Тем не менее к этой химической группе относятся в том числе и некоторые опиоидные анальгетики, например фентанил и



Protein	$V_{cav}$	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2A	583	AVA	265	-6,901	-54,289
		VPA	156	-5,313	-15,219
		MPO	126	-5,597	-31,528
		ATI	208	-7,577	-49,974
		NE	156	-8,080	-54,810

**Рисунок 5.** Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2A (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

В таблице: Protein – сокращённое наименование рецептора;  $V_{cav}$  – объем активного сайта рецептора,  $\text{\AA}^3$ ; Ligand – сокращённое наименование лиганда (AVA – аминоэфир вальпроевой кислоты, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метил-4-пиперидиола, ATI – атипамезол, NE – норадреналин);  $V_{vdW_{lig}}$  – объем молекулы,  $\text{\AA}^3$ ;  $G_{Docking}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль;  $G_{MM/GBSA}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

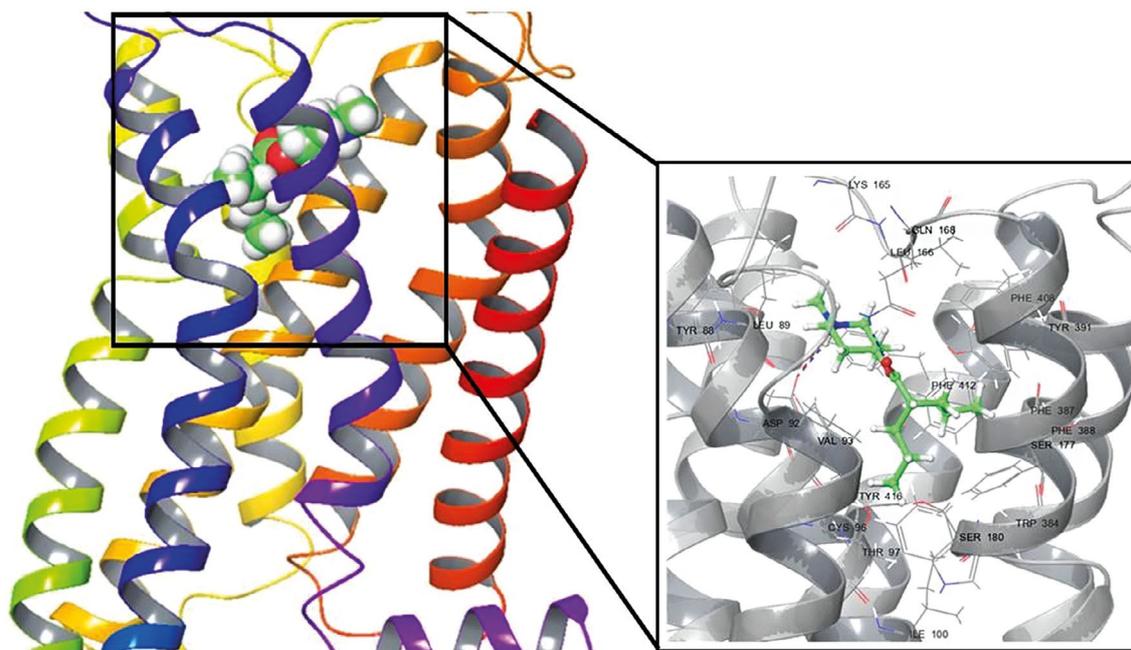
**Figure 5.** General AVA-ADRA2A complex design (on the left) and a close-up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

In the table: Protein – receptor short title;  $V_{cav}$  – receptor active site volume ( $\text{\AA}^3$ ); Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline);  $V_{vdW_{lig}}$  – molecule volume ( $\text{\AA}^3$ );  $G_{Docking}$  – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kcal/mol);  $G_{MM/GBSA}$  – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kcal/mol)

тримеперидин. Опиоиды, такие как меперидин, проявляют мощные противодрожательные свойства у грызунов подобно агонистам  $\alpha_2$ -адренорецепторов, которые не могут быть полностью устранены предварительным введением антагониста опиоидных рецепторов налоксона [29]. В исследовании Höcker и др. было показано, что меперидин и ремифентанил взаимодействуют с  $\alpha_2$ -адренорецепторами в мозге мышей, проявляя различное сродство к  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  и  $\alpha_{2C}$ -адренорецепторам [30].

Одним из классических эффектов  $\alpha_2$ -адреномиметиков является седация [31], которую можно было наблюдать при введении дексмететомидина в

любой из тестируемых доз. Введение АВК в дозе 30 мг/кг визуальнo не только не вызывало седации у испытуемых животных, но и позволяло наблюдать ажитацию, характерную для высоких доз холинолитических препаратов [32]. Несмотря на то, что спрогнозированная активность высокой дозы аминоэфира не соответствовала визуальному состоянию тестируемых крыс, справедливым объяснением может быть то, что высокоамплитудные  $\delta$ -ритмы, характерные для действия  $\alpha_2$ -адреномиметиков, перекрывали ЭЭГ-эффекты М-холиноблокирующего действия. При этом нельзя исключать вариант, что оба фармакологических эффекта могли реализоваться одновремен-



Protein	$V_{cav}$	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2B	341	AVA	265	-7,252	-49,195
		VPA	156	-5,297	-20,471
		MPO	126	-5,833	-36,639
		ATI	208	-8,277	-61,881
		NE	156	-8,858	-54,699

**Рисунок 6.** Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2B (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

В таблице: Protein – сокращенное наименование рецептора;  $V_{cav}$  – объем активного сайта рецептора,  $\text{\AA}^3$ ; Ligand – сокращенное наименование лиганда (AVA – аминоэфир вальпроевой кислоты, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метилпиперидин-4-ола, ATI – атипамезол, NE – норадреналин);  $V_{vdW_{lig}}$  – объем молекулы,  $\text{\AA}^3$ ;  $G_{Docking}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль;  $G_{MM/GBSA}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

**Figure 6.** General AVA-ADRA2B complex design (on the left) and a close up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

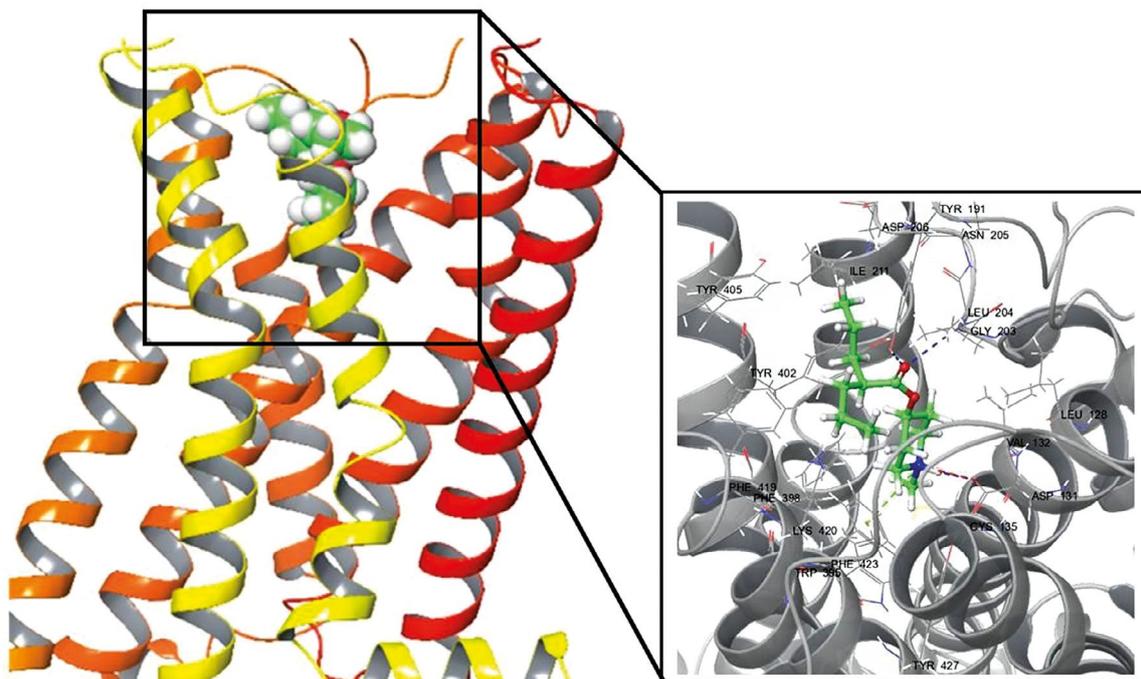
In the table: Protein – receptor short title;  $V_{cav}$  – receptor active site volume ( $\text{\AA}^3$ ), Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline);  $V_{vdW_{lig}}$  – molecule volume ( $\text{\AA}^3$ );  $G_{Docking}$  – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kcal/mol);  $G_{MM/GBSA}$  – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kcal/mol)

но. Схожая особенность была отмечена в предыдущей работе, когда ни для одной из доз противоаллергического препарата прометазина не было выявлено сколько-нибудь значимого  $H_1$ -гистаминоблокирующего действия [5].

Молекулярный докинг показал, что исходная молекула АВК имеет наименьшие энергии связывания со всеми тремя подтипами  $\alpha_2$ -адренорецепторов по сравнению со своими вероятными активными метаболитами – вальпроевой кислотой и N-метилпиперидин-4-олом. Эти значения энергий связывания изу-

чаемой молекулы были несколько меньше таковых норадреналина, взятого в качестве контроля. Данные результаты могут объяснить, почему именно в высоких дозах было обнаружено дексмететомидиноподобное действие АВК.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности НБК как инструмента скрининга фармакологической активности соединений по их влиянию на амплитудно-спектральные характеристики ЭКoГ у крыс. Для повышения эффективности предложенного метода требуется пополнение ис-



Protein	$V_{cav}$	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2C	658	AVA	265	-6,012	-50,738
		VPA	156	-4,867	-24,795
		MPO	126	-5,249	-32,989
		ATI	208	-8,020	-50,848
		NE	156	-8,146	-50,303

**Рисунок 7.** Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2C (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

В таблице: Protein – сокращенное наименование рецептора;  $V_{cav}$  – объем активного сайта рецептора,  $\text{\AA}^3$ ; Ligand – сокращенное наименование лиганда (AVA – АВК, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метилпиперидин-4-ола, ATI – атипамезол, NE – нордреналин);  $V_{vdW_{lig}}$  – объем молекулы,  $\text{\AA}^3$ ;  $G_{Docking}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль;  $G_{MM/GBSA}$  – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

**Figure 7.** General AVA-ADRA2C complex design (on the left) and a close up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

In the table: Protein – receptor short title;  $V_{cav}$  – receptor active site volume ( $\text{\AA}^3$ ); Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline),  $V_{vdW_{lig}}$  – molecule volume ( $\text{\AA}^3$ );  $G_{Docking}$  – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kcal/mol);  $G_{MM/GBSA}$  – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kcal/mol)

пользуемой библиотеки записей большим числом эталонных психотропных препаратов, а также выбор оптимальных настроек используемых алгоритмов классификации. Также в дальнейших работах необходимо ответить на некоторые важные вопросы. В первую очередь, какие характеристики ЭКОГ являются наиболее информативными с точки зрения эффектов психоактивных препаратов? Мы используем амплитудно-спектральные характеристики сигнала, однако значительный объем информации также содержат данные кросскорреляционного и когерентно-

го анализа. Однако, по нашим наблюдениям (данные не опубликованы), кросскорреляции и когерентности в том виде, в котором их вычисляет «Нейрон-Спектр.NETomega», не дают логической картины при классификации с использованием МГК и НБК, поэтому пока не используются нами в работе.

Другим вопросом является выбор оптимального количества записей в каждой группе. НБК – это вероятностная модель, для которой нет формального требования к числу входных примеров для каждого класса. Для ее корректной работы важна незави-

симось признаков для каждого примера, которая в нашем случае гарантируется использованием главных компонент, являющихся ортогональными по построению (т. е. независимыми). Достаточность сильно зависит от структуры данных и от дисперсии признаков внутри одного класса. Для того чтобы судить о ней, в машинном обучении для решения задач классификации обычно смотрят на качество классификации и устойчивость качества при случайном перерезбиении (кросс-валидация) [33]. В данном случае качество классификации достаточно высоко и устойчиво. Вопрос о минимальных достаточных выборках опять же довольно сложен и в отличие от стандартных статистических критериев не имеет аналитического решения, которое можно получить с помощью того или иного инструмента для расчета мощности критерия. Для ответа на этот вопрос в случае использования моделей машинного обучения нужно изучать поведение кривых обучения для разных размеров выборки, оценивать стабильность и анализировать изменение с ростом количества примеров в выборке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было установлено, что АВК в дозе 0,5 мг/кг обладает преимущественно вальпроатоподобным действием, 5 мг/кг – холиноблокирующим, а 30 мг/кг –  $\alpha_2$ -адреномиметическим. Ареколиновый тест у мышей подтверждает центральное М-холиноблокирующее действие изучаемого соединения. Результаты молекулярного докинга говорят как о возможности связывания АВК с  $\alpha_2$ -адренорецепторами, так и о том, что дексмететомидиноподобное действие определяется активностью именно исходной молекулы, а не ее вероятными метаболитами – вальпроевой кислотой и N-метилпиперидин-4-олом.

## ЛИТЕРАТУРА

- Dimpfel W., Hoffmann J. A. Electropharmacograms of rasagiline, its metabolite aminoindan and selegiline in the freely moving rat. *Neuropsychobiology*. 2010;62(4):213–220. DOI: 10.1159/000319947.
- Dimpfel W., Roeska K., Seilheimer B. Effect of Neurexan on the pattern of EEG frequencies in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12:126. DOI: 10.1186/1472-6882-12-126.
- Drinkenburg W. H. I. M., Ahnaou A., Ruigt G. S. F. Pharmacology-EEG Studies in Animals: A History-Based Introduction to Contemporary Translational Applications. *Neuropsychobiology*. 2016;72(3–4):139–150. DOI: 10.1159/000443175.
- Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Kotelnikova A. A., Okovityi S. V. Use of Naïve Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(4):1130–1141. DOI: 10.1134/S0022093022040160.
- Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Knyazeva I. S., Korelov M. S., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Pharmacoecephalographic assessment of antipsychotic agents' effect dose-dependency in rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:2153–2167. DOI: 10.1134/S0022093023060200.
- Mishra M. K., Kukul S., Paul P. R., Bora S., Singh A., Kukreti S., Saso L., Muthusamy K., Hasija Y., Kukreti R. Insights into Structural Modifications of Valproic Acid and Their Pharmacological Profile. *Molecules*. 2021;27(1):104. DOI: 10.3390/molecules27010104.
- Tursunov A. N., Vasilyev D. S., Nalivaeva N. N. Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:1740–1755. DOI: 10.1134/S0022093023050228.
- Calabresi P., Galletti F., Rossi C., Sarchielli P., Cupini L. M. Antiepileptic drugs in Migraine: From Clinical Aspects to Cellular Mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007;28(4):188–195. DOI: 10.1016/j.tips.2007.02.005.
- Scarselli M. Lithium and Valproic Acid in Bipolar Disorders and Beyond. *Current Neuropharmacology*. 2023;21(4):890. DOI: 10.2174/1570159X2104230307123319.
- Zhang X.-Z., Li X.-J., Zhang H.-Y. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. 2010;81(1):3–6. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.003.
- Carriere C. H., Kang N. H., Niles L. P. Neuroprotection by valproic acid in an intrastriatal rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2014;267:114–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.028.
- Gill D., Derry S., Wiffen P. J., Moore R. A. Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;(10):CD009183. DOI: 10.1002/14651858.CD009183.pub2.
- Беспалов А. Я., Прокопенко Л. И., Горчакова Т. Л., Петров А. Н., Зайцева М. А., Мелехова А. С., Бельская А. В., Мельникова М. В., Иванов М. Б. Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4ил)-2-пропилпентаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью. Патент РФ № RU 2714135 С1. 12.02.2020. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2714135C1/ru>. Ссылка активна на 15.04.2024.
- Мелехова А. С., Петров А. Н., Беспалов А. Я., Бельская А. В., Мельникова М. В., Зацепин Э. П., Шестова Г. В., Ганеев А. А. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом. *Medline.ru*. 2019;20:294–306.
- Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Верведа А. Б., Бондаренко А. А., Мельникова М. В., Пономарева А. Е. Многокритериальная оценка фармакологической активности оригинальных соединений вальпроевой кислоты для купирования первично-генерализованных судорог, вызванных камфорой. *Medline.ru*. 2023;24:107–120.
- Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Chernyakov R. T., Karev V. E., Okovityi S. V. A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(1):292–301. DOI: 10.1134/S0022093022010252.
- Hansen I. H., Agerskov C., Arvastson L., Bastlund J. F., Sørensen H. B. D., Herrik K. F. Pharmacoelectroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *European Journal of Neuroscience*. 2019;50(2):1948–1971. DOI: 10.1111/ejn.14373.
- Kaboutari J., Zendehele M., Habibian S., Azimi M., Shaker M., Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(2):155–161. DOI: 10.1007/s13105-011-0127-x.
- Bryant S. M., Rhee J. W., Thompson T. M., Lu J. J., Aks S. E. Parenteral ophthalmic tropicamide or cyclopentolate protects rats from lethal organophosphate poisoning. *American Journal of Therapeutics*. 2009;16(3):231–234. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318182254b.
- Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2–3):117–154. DOI: 10.1007/s002130100811.

21. Waku I., Magalhães M. S., Alves C. O., de Oliveira A. R. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *European Journal of Neuroscience*. 2021;53(11):3743–3767. DOI: 10.1111/ejn.15222.
22. Geerts H., Guillaumat P.-O., Grantham C., Bode W., Anciaux K., Sachak S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research*. 2005;1033(2):186–193. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.042.
23. Hunter J. C., Fontana D. J., Hedley L. R., Jasper J. R., Lewis R., Link R. E., Secchi R., Sutton J., Eglen R. M. Assessment of the role of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology*. 1997;122(7):1339–1344. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701520.
24. Voronina T. A., Nerobkova L. N. [Effect of phenazepam on sleep cycles in rats]. *Farmakol Toksikol*. 1981;44(1):18–20.
25. Abásolo D., Simons S., Morgado da Silva R., Tononi G., Vyazovskiy V. V. Lempel-Ziv complexity of cortical activity during sleep and waking in rats. *Journal of Neurophysiology*. 2015;113(7):2742–2752. DOI: 10.1152/jn.00575.2014.
26. Дергачев В. Д., Яковлев Е. Е., Брусина М. А., Бычков Е. Р., Питровский Л. Б., Шабанов П. Д. Противопаркинсоническая активность новых лигандов N-метил-D-аспартат-рецепторов в тесте ареколинового гиперкинеза. *Медицинский Совет*. 2021;12:406–412. DOI: 10/21518/2079-701X-2021-12-406-412.
27. Ballesteros J. A., Weinstein H. Integrated methods for the construction of the three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*. 1995;25:366–428. DOI: 10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
28. Manford M. Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology*. 2017;264(8):1811–1824. DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2.
29. Kurz M., Belani K. G., Sessler D. I., Kurz A., Larson M. D., Schroeder M., Blanchard D. Naloxone, meperidine, and shivering. *Anesthesiology*. 1993;79(6):1193–1201. DOI: 10.1097/0000542-199312000-00009.
30. Höcker J., Weber B., Tonner P. H., Scholz J., Brand P.-A., Ohnesorge H., Bein B. Meperidine, remifentanyl and tramadol but not sufentanyl interact with  $\alpha_2$ -adrenoceptors in  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor knock out mice brain. *European Journal of Pharmacology*. 2008;582(1–3):70–77. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.12.022.
31. Kable J. W., Murrin L. C., Bylund D. B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293(1):1–7.
32. Watanabe H., Shimizu H. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1989;51(1):75–82. DOI: 10.1254/jjp.51.75.
33. Bishop C. M. Pattern Recognition and Machine Learning. New York: Springer; 2006. 778 p.
5. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Knyazeva I. S., Korelov M. S., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Pharmacoencephalographic assessment of antipsychotic agents' effect dose-dependency in rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:2153–2167. DOI: 10.1134/S0022093023060200.
6. Mishra M. K., Kukal S., Paul P. R., Bora S., Singh A., Kukreti S., Saso L., Muthusamy K., Hasija Y., Kukreti R. Insights into Structural Modifications of Valproic Acid and Their Pharmacological Profile. *Molecules*. 2021;27(1):104. DOI: 10.3390/molecules27010104.
7. Tursunov A. N., Vasilyev D. S., Nalivaeva N. N. Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:1740–1755. DOI: 10.1134/S0022093023050228.
8. Calabresi P., Galletti F., Rossi C., Sarchielli P., Cupini L. M. Antiepileptic drugs in Migraine: From Clinical Aspects to Cellular Mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007;28(4):188–195. DOI: 10.1016/j.tips.2007.02.005.
9. Scarselli M. Lithium and Valproic Acid in Bipolar Disorders and Beyond. *Current Neuropharmacology*. 2023;21(4):890. DOI: 10.2174/1570159X2104230307123319.
10. Zhang X.-Z., Li X.-J., Zhang H.-Y. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. 2010;81(1):3–6. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.003.
11. Carriere C. H., Kang N. H., Niles L. P. Neuroprotection by valproic acid in an intrastriatal rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2014;267:114–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.028.
12. Gill D., Derry S., Wiffen P. J., Moore R. A. Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;(10):CD009183. DOI: 10.1002/14651858.CD009183.pub2.
13. Bespalov A. Ya., Prokopenko L. I., Gorchakova T. L., Petrov A. N., Zaytseva M. A., Melekhova A. S., Belskaya A. V., Melnikova M. V., Ivanov M. B. (1-methylpiperidin-4-yl)-2-propylpentanoate hydrochloride, having cholinolytic and anticonvulsant activity. Patent RU 2714135 C1. 12.02.2020. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2714135C1/ru>. Accessed: 15.04.2024. (In Russ.)
14. Melekhova A. S., Petrov A. N., Bespalov A. Y., Belskaya A. V., Melnikova M. V., Zatselin E. P., Shestova G. V., Ganeev A. A. Experimental pharmacotherapy of convulsive syndrome in the simulation of severe carbamate poisoning. *Medline.ru*. 2019;20:294–306. (In Russ.)
15. Melekhova A. S., Bespalov A. Y., Verveda A. B., Bondarenko A. A., Mel'nikova M. V., Ponomareva A. E. Multicriteria assessment of pharmacological activity of original valproic acid compounds for the relief of primary generalized seizures, caused by camphor. *Medline.ru*. 2023;24:107–120. (In Russ.)
16. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Chernyakov R. T., Karev V. E., Okovityi S. V. A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(1):292–301. DOI: 10.1134/S0022093022010252.
17. Hansen I. H., Agerskov C., Arvastson L., Bastlund J. F., Sørensen H. B. D., Herrik K. F. Pharmaco-electroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *European Journal of Neuroscience*. 2019;50(2):1948–1971. DOI: 10.1111/ejn.14373.
18. Kaboutari J., Zendehelel M., Habibian S., Azimi M., Shaker M., Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(2):155–161. DOI: 10.1007/s13105-011-0127-x.
19. Bryant S. M., Rhee J. W., Thompson T. M., Lu J. J., Aks S. E. Parenteral ophthalmic tropicamide or cyclopentolate protects rats from

## REFERENCES

1. Dimpfel W., Hoffmann J. A. Electropharmacograms of rasagiline, its metabolite aminoindan and selegiline in the freely moving rat. *Neuropsychobiology*. 2010;62(4):213–220. DOI: 10.1159/000319947.
2. Dimpfel W., Roeska K., Seilheimer B. Effect of Neurexan on the pattern of EEG frequencies in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12:126. DOI: 10.1186/1472-6882-12-126.
3. Drinkenburg W. H. I. M., Ahnaou A., Ruigt G. S. F. Pharmaco-EEG Studies in Animals: A History-Based Introduction to Contemporary Translational Applications. *Neuropsychobiology*. 2016;72(3–4):139–150. DOI: 10.1159/000443175.
4. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Kotelnikova A. A., Okovityi S. V. Use of Naive Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(4):1130–1141. DOI: 10.1134/S0022093022040160.

- lethal organophosphate poisoning. *American Journal of Therapeutics*. 2009;16(3):231–234. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318182254b.
20. Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2–3):117–154. DOI: 10.1007/s002130100811.
  21. Waku I., Magalhães M. S., Alves C. O., de Oliveira A. R. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *European Journal of Neuroscience*. 2021;53(11):3743–3767. DOI: 10.1111/ejn.15222.
  22. Geerts H., Guillaumat P.-O., Grantham C., Bode W., Anciaux K., Sachak S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research*. 2005;1033(2):186–193. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.042.
  23. Hunter J. C., Fontana D. J., Hedley L. R., Jasper J. R., Lewis R., Link R. E., Secchi R., Sutton J., Eglen R. M. Assessment of the role of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology*. 1997;122(7):1339–1344. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701520.
  24. Voronina T. A., Nerobkova L. N. [Effect of phenazepam on sleep cycles in rats]. *Farmakol Toksikol*. 1981;44(1):18–20.
  25. Abásolo D., Simons S., Morgado da Silva R., Tononi G., Vyazovskiy V. V. Lempel-Ziv complexity of cortical activity during sleep and waking in rats. *Journal of Neurophysiology*. 2015;113(7):2742–2752. DOI: 10.1152/jn.00575.2014.
  26. Dergachev V. D., Yakovleva E. E., Brusina M. A., Bychkov E. R., Piotrovskiy L. B., Shabanov P. D. Antiparkinsonian activity of new N-methyl-D-aspartate receptor ligands in the arecoline hyperkinesis test. *Medical Council*. 2021;12:406–412. (In Russ.) DOI: 10/21518/2079-701X-2021-12-406-412.
  27. Ballesteros J. A., Weinstein H. Integrated methods for the construction of the three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*. 1995;25:366–428. DOI: 10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
  28. Manford M. Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology*. 2017;264(8):1811–1824. DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2.
  29. Kurz M., Belani K. G., Sessler D. I., Kurz A., Larson M. D., Schroeder M., Blanchard D. Naloxone, meperidine, and shivering. *Anesthesiology*. 1993;79(6):1193–1201. DOI: 10.1097/00000542-199312000-00009.
  30. Höcker J., Weber B., Tonner P. H., Scholz J., Brand P.-A., Ohnesorge H., Bein B. Meperidine, remifentanyl and tramadol but not sufentanil interact with  $\alpha_2$ -adrenoceptors in  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor knock out mice brain. *European Journal of Pharmacology*. 2008;582(1–3):70–77. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.12.022.
  31. Kable J. W., Murrin L. C., Bylund D. B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293(1):1–7.
  32. Watanabe H., Shimizu H. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1989;51(1):75–82. DOI: 10.1254/jjp.51.75.
  33. Bishop C. M. Pattern Recognition and Machine Learning. New York: Springer; 2006. 778 p.