

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Маркин Павел Александрович

**Методология фармакометаболического подхода в исследовании
фармакологических эффектов физиологически активных веществ на модели
Danio rerio**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент
Тарасов Вадим Владимирович

Научный консультант:

кандидат химических наук
Апполонова Светлана Александровна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Исследования фармакологических эффектов лекарственных веществ: классические модели и тесты.....	14
1.2. Метаболомика как научное направление: определение, аналитические подходы, применение метаболомного анализа	15
1.2.1. Метаболомика в системной биологии	15
1.2.2. Аналитические методы, используемые в метаболомике	16
1.2.3. Применение метаболомики в различных областях системной биологии	18
1.2.4. Метаболомный анализ биологических объектов с целью изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ и перспективы применения фармакометаболомики.....	22
1.3. <i>Danio rerio</i> – новая биологическая модель для изучения фармакологических эффектов химических веществ	27
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Реактивы и оборудование.....	33
2.1.1. Фармакологические вещества.....	33
2.1.2. Стандартные образцы	34
2.1.3. Реактивы.....	34
2.1.4. Оборудование	42
2.2. Экспериментальные животные.....	43
2.3. Приготовление растворов и буферов	44
2.3.1. Приготовление растворов исследуемых веществ	44
2.3.2. Приготовление рабочего раствора для содержания эмбрионов (ЕЗ)	44
2.4. Методы установления концентрационных диапазонов для диазепама и 5F-АПИНАК	45

2.5. Нецелевое метаболомное профилирование.....	47
2.6. Целевое фармакометаболомное профилирование.....	51
2.7. Поведенческий анализ	56
2.8. Методы статистической обработки данных.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
3.1. Нецелевое метаболомное профилирование мальков рыб вида <i>Danio rerio</i> после воздействия диазепама.....	60
3.2. Разработка и валидация методики количественного определения нейромедиаторов и веществ, связанных с нейротрансмиссией	66
3.2.1. Параметры МС/МС переходов исследуемых веществ и селективность	66
3.2.2. Линейность калибровочных кривых и нижний предел количественного обнаружения	73
3.2.3. Эффект переноса	87
3.2.4. Правильность и прецизионность	88
3.2.5. Эффект матрицы.....	89
3.2.6. Коэффициент экстракции.....	89
3.2.7. Стабильность	98
3.3. Исследование воздействия диазепама на метаболомный профиль рыб вида <i>Danio rerio</i>	101
3.3.1. Морфологические характеристики.....	102
3.3.2. ГАМКергическая система и система аспартата.....	103
3.3.3. Серотонинергическая система и кинурениновый путь метаболизма триптофана.....	106
3.3.4. Дофаминергическая система.....	110
3.3.5. Холинергическая система	113
3.3.6. Прочие метаболиты, связанные с нейротрансмиссией	114
3.4. Определение полулетальной концентрации 5F-АПИНАК.....	115

3.5. Исследование воздействия 5F-АПИНАК на метаболомный профиль рыб вида <i>Danio rerio</i>	117
3.5.1. Морфологические характеристики.....	118
3.5.2. ГАМКергическая система	119
3.5.3. Серотонинергическая система и кинурениновый путь метаболизма триптофана.....	121
3.5.4. Дофаминергическая система.....	125
3.5.5. Холинергическая система	126
3.5.6. Прочие метаболиты, связанные с нейротрансмиссией	127
3.6. Исследование воздействия 5F-АПИНАК на поведенческие реакции рыб вида <i>Danio rerio</i>	129
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	137
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	140
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	157
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	159
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	160
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	161
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	163
ПРИЛОЖЕНИЕ А	197

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Несмотря на наличие большого количества информации в области доклинических исследований лекарственных средств (ЛС), поиск высокоэффективных методов изучения фармакологических эффектов химических субстанций продолжает оставаться актуальным. Основными направлениями оптимизации исследований являются уменьшение использования животных, поиск альтернативных экспериментальных моделей и внедрение в исследовательскую практику новых экспериментальных процедур, в том числе метаболомных (фармакометаболомных) подходов [138]. Использование метаболомного анализа обеспечивает трансляцию научных знаний в области действия химических субстанций на эндогенные вещества в рутинное использование при исследовании фармакологических эффектов физиологически активных веществ (ФАВ), что позволяет оценивать комплексное воздействие субстанций на организм или системы органов, а также дает дополнительную информацию для дальнейшего применения в персонализированной медицине [68].

Модернизация исследований фармакологических эффектов ФАВ включает также расширение спектра используемых биологических моделей. Одним из перспективных модельных организмов является *Danio rerio* – вид пресноводных лучеперых рыб семейства карповые (лат. *Cyprinidae*). Рыбы вида *Danio rerio* как модельный организм ранее использовали при изучении биологии развития различных систем органов. Прозрачность эмбрионов позволила более глубоко исследовать процессы, происходящие при гаструляции [204], развитии периферической и центральной нервной системы (ЦНС) [157]. С помощью методов генетики и селекции были выведены штаммы (линии) рыб вида *Danio rerio*, моделирующие нейродегенеративные заболевания [224], болезнь Паркинсона [214] или тревожный синдром. Изучение поведенческой активности мальков *Danio rerio* используется для исследования действия химических веществ на ЦНС [73, 155]. Рыбы вида *Danio rerio* обладают полностью функциональным

гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) [67, 141], поэтому поведенческие тесты с их использованием могут применяться для изучения воздействия веществ нейротропного действия. Например, регистрация количества спонтанных движений рыб *Danio rerio* (скорость, продолжительность и протяженность плавания) и изменение в поведенческой активности как ответ на внешние стимулы (тест светло-темного аквариума и светового стимула, тест звукового стимула) используется для исследования влияния фармацевтических субстанций [166] и нейротоксикантов [149] на ЦНС.

В настоящее время с использованием данной биологической модели проводится изучение токсичности химических веществ с помощью определения полулетальной концентрации ($ЛК_{50}$) визуальными методами [113, 163, 183, 226], однако метаболомные исследования могут дополнить знания о механизмах токсического и фармакологического действия ФАВ. Использование эмбрионов рыб вида *Danio rerio* также позволяет уменьшить использование животных в тестах на летальность и потенциально может заменить исследования на стандартных моделях.

Разработка методических и методологических основ фармакометаболомного подхода для исследования воздействия химических субстанций на рыб вида *Danio rerio* является важной стадией для начала широкого использования данной биологической модели для быстрого и высокоэффективного скрининга фармакологических эффектов веществ различной химической структуры.

Степень разработанности темы исследования

Рыбы вида *Danio rerio* как экспериментальные животные изначально использовались в тестах на токсичность химических веществ (определение выживаемости эмбрионов), а также при изучении поведенческих изменений при введении ксенобиотиков, однако в настоящее время большую популярность в мировой научной практике приобретают фармакометаболомные исследования, целью которых является выявление изменения концентраций эндогенных метаболитов после воздействия ФАВ [43, 46, 47, 75, 187]. Данные исследования носят ситуационный характер, они не систематизированы, не существует единой

методологии фармакометаболических исследований влияния химических субстанций на организм рыб вида *Danio rerio*. Также в научной литературе представлено очень малое количество экспериментальных данных по изучению фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия с использованием рыб *Danio rerio* как модельного организма.

Необходимость разработки методических и методологических основ фармакометаболического подхода для исследования фармакологических эффектов физиологически активных веществ с использованием рыб вида *Danio rerio* в качестве биологической модели определило цель и задачи данного исследования.

Цель работы: разработка методологии фармакометаболического подхода для оценки фармакологических эффектов физиологически активных веществ с использованием рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных на примере веществ нейротропного действия.

Задачи исследования

1. Выявить метаболические пути, необходимые для оценки фармакодинамических эффектов веществ нейротропного действия, на основании проведения нецелевого метаболического анализа образцов рыб вида *Danio rerio*.

2. Разработать и валидировать аналитические методики количественного определения эндогенных метаболитов специфических путей метаболизма нейромедиаторов (целевая метаболическая панель).

3. Определить специфические количественные характеристики метаболического профиля после воздействия фармакологического вещества нейротропного действия с известным механизмом действия (диазепам) у рыб вида *Danio rerio* с помощью целевого метаболического анализа.

4. Определить специфические количественные характеристики метаболического профиля после воздействия новых психоактивных веществ с малоизученным механизмом действия на примере синтетического каннабиноида 5F-АПИНАК у рыб вида *Danio rerio* с помощью целевого метаболического анализа.

5. Оценить взаимосвязь поведенческих эффектов с результатами целевого метаболического профилирования.

Научная новизна исследования

В результате проведенных исследований автором впервые:

– доказана возможность использования мальков рыб вида *Danio rerio* для изучения фармакологических эффектов химических веществ, оказывающих влияние на ЦНС, фармакометаболическими методами с помощью нецелевого метаболического анализа;

– разработана оригинальная аналитическая методика одновременного определения концентраций эндогенных метаболитов, участвующих в нескольких метаболических путях синтеза нейромедиаторов;

– показано, что воздействие диазепама на мальков рыб вида *Danio rerio* приводило к изменению концентраций метаболитов серотонинергической, дофаминергической систем, системы аспартата, кинуренинового пути метаболизма триптофана;

– получены результаты, свидетельствующие, что введение синтетического каннабиноида 5F-АПИНАК приводит к изменению концентраций нейромедиаторов различных систем, включая эндогенные метаболиты, относящиеся к ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической, холинергической системам, а также к кинурениновому пути метаболизма триптофана у рыб вида *Danio rerio*;

– показано, что введение 5F-АПИНАК в среду обитания мальков рыб вида *Danio rerio* дозозависимо уменьшало поведенческую активность.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Результаты работы вносят вклад в развитие методов исследования фармакологической активности химических веществ. Предложенные методические и методологические подходы фармакометаболического анализа могут быть использованы для изучения фармакологических эффектов других нейротропных веществ в доклинической практике, а также как основа для разработки целевых метаболических панелей для исследования влияния химических веществ на другие органы и системы. Также, использование мальков рыб вида

Danio rerio как биологической модели позволяет увеличить производительность скрининга фармакологических эффектов химических веществ, а также уменьшить стоимость проведения доклинических исследований в сравнении с млекопитающими.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Влияние диазепама на концентрации эндогенных метаболитов нейромедиаторных систем подтверждается нецелевым метаболомным анализом.

2. Валидационные показатели разработанной методики количественного хромато-масс-спектрометрического определения эндогенных метаболитов нейромедиаторных систем соответствуют нормативам руководств FDA и EMA.

3. Воздействие диазепама на мальков рыб вида *Danio rerio* приводило к изменениям в концентрациях нейромедиаторов, связанных с серотонинергической, дофаминергической, холинергической системами и системой аспартата.

4. Синтетический каннабиноид 5F-АПИНАК оказывает комплексное влияние на ЦНС мальков рыб *Danio rerio* через изменение концентраций эндогенных метаболитов ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической и холинергической систем.

5. 5F-АПИНАК оказывал дозозависимое влияние на поведенческую активность мальков рыб *Danio rerio*, при этом концентрации важнейших нейромедиаторов показали статистически значимую корреляцию с эффектами 5F-АПИНАК на поведенческую активность.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на анализе литературных данных, оценке степени изученности проблемы и актуальности темы исследования. Теоретическую и практическую основу диссертационного исследования составили научные работы отечественных и зарубежных ученых в области метаболомного и фармакометаболомного анализа (Кукес В.Г., Сычѐв Д.А., Раменская Г.В., Дедов И.И., Арчаков А.И., Смирнов В.В., Wishart D., Kaddurah-Daouk R., Beger R. и др.), изучения механизма действия различных

фармакологических веществ на ЦНС (Воронина Т.А., Середенин С.Б., Незнамов Г.Г., Canazza I., Soderpalm B. и др.), а также в области использования зебрафиш как экспериментальных животных с целью описания действия химических веществ на морфологические характеристики, поведенческие реакции и профиль эндогенных метаболитов (Шабанов П.Д., Качанов Д.А., Калуев А.В., Kimmel C., Akhtar T., Ortiz-Villanueva E., Stewart A. и др.).

Определение концентраций эндогенных метаболитов проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций, MRM) согласно разработанной и валидированной биоаналитической методике. Основными нормативными документами, регламентирующими процесс разработки и валидации биоаналитической методики, являлись регуляторные документы НЦ ЭСМП Минздрава России, FDA, EMA.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась с помощью программ SIMCA 13.0, XCMS, Metaboanalyst 4.0, IBM SPSS Statistics 23.0, StatSoft Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2019.

Степень достоверности

Достоверность представленных в работе результатов подтверждается достаточным количеством повторных измерений, выполненных на сертифицированном оборудовании, а также количеством повторов экспериментов, необходимых для получения статистически значимых результатов; применением лабораторных животных, полученных из сертифицированных питомников; выполнением всех экспериментов на животных в соответствии с утвержденным на заседании ЛЭК ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) протоколом исследований; использованием описанных в ведущих зарубежных изданиях методов исследований; применением корректных методик статистической обработки данных. Проанализирован достаточный объем литературных источников.

Апробация результатов исследования.

Апробация диссертационной работы проведена на межкафедральной научно-методической конференции кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина, лаборатории фармакокинетики и метаболомного анализа Института трансляционной медицины и биотехнологии, кафедры промышленной фармации Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических исследований ФГБУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России, протокол № 9 от 10.06.2021г.

Результаты диссертационного проекта докладывались на IV Всероссийской конференции с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Ольгинка, 2020), VIII Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2019), 7th International Conference on Novel Psychoactive Substances (NPS) (Рим, 2020), 3rd Annual Congress of IPharmS (Тегеран, 2021).

Личный вклад автора.

Автор лично сформулировал идею и гипотезу настоящего диссертационного исследования, разработал его детализированный план. Автор лично проводил эксперименты на животных, анализ методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическую обработку и интерпретацию результатов. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования, включая постановку задач, их экспериментальную реализацию, обсуждение результатов в научных публикациях, докладах и внедрении в практическое использование.

Главы диссертации и автореферат написаны автором лично.

Связь диссертации с основными научными темами, внедрение результатов.

Диссертация подготовлена при частичной финансовой поддержке внутреннего гранта ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) в рамках реализации Федеральной программы «5-100».

Важнейшие положения диссертационной работы используются в учебной деятельности кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), внедрены в производственный процесс ООО «Институт аналитической токсикологии» (Красногорский район Московской области). На основе разработанной методологии и комплекса методик фармакометаболического подхода было выполнено государственное задание № АААА-А18-118091090038-2 на тему: «Разработка тест-системы быстрого установления наркотичности новых потенциальноопасных психоактивных веществ и метаболомная диагностика биомаркеров токсического стресса на «Зебрафиш моделях», лаборатория фармакокинетики и метаболомного анализа ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации и результаты проведенных исследований соответствуют паспорту научной специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, в частности области исследования пункты 3, 4, 5.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе:

- Научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 10 статей, из них:
 - в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки – 1 статья;
 - в журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science – 3 статьи;
 - в иных изданиях – 6 статей.

Объем и структура диссертации.

Работа изложена на 207 страницах печатного текста, содержит 36 рисунков, 14 таблиц, приложение А. Диссертационное исследование включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, а также результатов исследований, содержит обсуждение и заключение, выводы.

Библиографический список состоит из выходных данных 266 литературных источников, из которых 224 – иностранные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Исследования фармакологических эффектов лекарственных веществ: классические модели и тесты

В области разработки и поиска ЛС, а также при исследовании действия различных веществ на организм, в настоящее время используются классические методы фармакологических исследований, которые в основном связаны со скринингом фенотипического ответа на введение химических веществ с целью получения определенного (или предсказываемого) эффекта. Для данных целей чаще всего используются широко известные животные модели и методы исследований.

Использование животных позволяет достаточно полно изучать патологические механизмы развития заболеваний с помощью различных *in vivo* тестов и визуализирующих методик [212]. Модифицирование генома экспериментальных животных, а также моделирование заболеваний, позволяет изучать потенциальные мишени ЛС. Так, например, генные модификации позволили развить у крыс диабет 1 типа с целью исследования потенциальных мишеней для лечения заболевания [201]. Трансгенные линии животных на данный момент применяются для изучения огромного количества патологий, включая новейшие исследования в области заболеваний иммунной и нервной систем, нарушений гомеостаза и злокачественных образований [207]. Исследования ФАВ на животных также включают в себя проведение фармакокинетических исследований (всасывание, распределение, метаболизм и выведение), а также изучение фармакодинамических параметров.

На данный момент животные модели в основном используются для изучения лидирующих соединений (lead compounds), а также специфической активности химических субстанций и токсических эффектов потенциальных ЛС [188, 253]. Данные исследования включают в себя биохимические (уровень глюкозы, аминокислот, жирных кислот и т.п.), физиологические и морфологические (замер

частоты сердечных сокращений, электрокардиографические исследования, магнитно-резонансная томография, эмбриотоксичность, фетотоксичность, тератогенный эффект и т.п.), поведенческие тесты (открытое поле, светло-темное место и т.п.), а также установление эффективных и летальных доз ФАВ (ЕД₅₀ и ЛД₅₀ соответственно) [27, 51].

В исследованиях фармакологических эффектов ФАВ мировые ученые придерживаются принципа «трех R»: 1) Replace – изыскание методов исследования химических веществ, заменяющих животных; 2) Reduce – уменьшение количества используемых животных, либо изыскание путей получения большего количества информации от меньшего количества животных; 3) Refine – использование методов, минимизирующих боль и стресс для животных. Для реализации этих целей ученые применяют новые методики исследования, а также ведут поиск альтернативных биологических моделей.

1.2. Метаболомика как научное направление: определение, аналитические подходы, применение метаболомного анализа

1.2.1. Метаболомика в системной биологии

Метаболомика является научным направлением, целью которого является высокопроизводительное определение концентраций малых органических молекул (<1500 Да), называемых метаболитами, в биологических образцах [255]. Совокупность эндогенных метаболитов, которые можно определить в клетке, органе, биологической жидкости или в организме, называется метаболом [254]. Метаболом включает в себя большое количество соединений из различных химических классов: липиды, аминокислоты, короткоцепочечные пептиды, нуклеиновые кислоты, сахара, спирты и органические кислоты; эти вещества непрерывно синтезируются и разрушаются в организме [258]. ДНК, РНК и протеины, предшествующие малым органическим соединениям, ответственны за синтез и превращение метаболитов в организме через каскады реакций. В это же

время, метаболиты являются «конечными продуктами» жизнедеятельности организма, и, таким образом, максимально точно и полно характеризуют его фенотип [258].

Метаболомные исследования всегда комплексные – они охватывают большой спектр метаболитов из различных метаболических путей, в отличие от классических методов анализа единственного эндогенного метаболита, либо анализа метаболита и нескольких производных в метаболическом пути [8, 82]. Состав метаболома зависит от многих факторов, включая как индивидуальные показатели организма (геном, физиологические факторы, возраст, пол, диета, состояние кишечной микрофлоры), так и окружающую его среду [145]. Таким образом, метаболом способен отразить любые изменения, происходящие в организме.

1.2.2. Аналитические методы, используемые в метаболомике

Основными аналитическими методами проведения метаболомного анализа являются хромато-масс-спектрометрия (высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС и ГХ-МС) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия, ЯМР).

Суть масс-спектрометрического (МС) детектирования принципиально отличается от такового у ЯМР. Для проведения масс-спектрометрического анализа компоненты пробы ионизируются, фрагментируются и разделяются по отношению массы к заряду (m/z). По соотнесению масс-спектрометрических характеристик (m/z родительского иона и его спектра фрагментации) с библиотечными данными известных соединений можно установить строение молекулы. Дополнительная информация о времени удерживания вещества в хроматографической системе (ВЭЖХ, ГХ) также может помочь в идентификации неизвестного вещества. Масс-спектрометрические инструменты являются крайне чувствительными – для анализа требуется всего несколько микролитров (мкл) готовой пробы [12, 61, 196]. При этом масс-спектрометрия относится к разрушающим видам анализа – после

проведения масс-спектрометрии химические вещества в пробе невозможно восстановить.

Процесс детектирования неизвестных веществ методом ЯМР включает в себя определение излишнего поглощения или излучения электромагнитной энергии веществами с ядрами с ненулевым спином. При этом воздействие сильного магнитного поля на эти вещества приводит к переориентации спинов в молекуле (в особенности – у атомов водорода), что делает их заметными на особо специфичных частотах резонирования – каждая молекула обладает уникальным ЯМР спектром из-за особенного химического строения и расположения атомов водорода. В отличие от МС, метод ЯМР не разрушает образец – его можно анализировать повторно [256]. Чувствительность ЯМР приблизительно в 10-100 раз меньше, чем у МС [257]. Современные ЯМР и МС системы способны к разделению, детектированию и определению сотен и тысяч химических веществ за один аналитический цикл [96, 248]. После завершения анализа пики веществ идентифицируют и получают информацию о составе образца, которую потом используют в последующей статистической обработке.

Все множество метаболомных исследований можно подразделить на четыре типа: 1) нецелевое или широкоформатное метаболомное профилирование; 2) целевой анализ; 3) флюксомика; 4) метаболомный имиджинг.

Широкоформатное метаболомное профилирование направлено на определение и описание как можно большего количества метаболитов образца за один анализ (обычно около 10000 соединений). Считается, что нецелевой метаболомный анализ непригоден для точного определения концентрации метаболитов, однако, его можно с успехом использовать для поиска новых биомаркеров и генерирования гипотез [28, 259].

Целевой метаболомный анализ направлен на изучение концентраций сравнительно малого количества веществ внутри определенной группы (от 10 до 500 веществ за анализ). Целевой метаболомный анализ идеально подходит для проверки гипотез и валидации биомаркеров и наиболее часто используется в медицинской практике [217].

Флюксомный анализ, или флюксомика, является видом целевого метаболомного анализа, в ходе которого измеряется изменение концентраций метаболитов в реальном времени методами ВЭЖХ-МС и ЯМР [148]. Флюксомика используется для изучения динамики метаболических процессов в клетках и тканях организма с целью улучшения понимания биохимических реакций [44].

Метаболомный имиджинг – это направление метаболомики, которое включает в себя *in vivo* и *in vitro* определение и визуализацию эндогенных метаболитов в тканях с помощью методов ЯМР, позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) [104]. Метаболомный имиджинг используется для изучения клеточно-, ткане- и органоспецифического метаболизма, а также в области хирургических операций с целью дифференциации тканей пациента в реальном времени [114, 243].

1.2.3. Применение метаболомики в различных областях системной биологии

Характерным свойством метаболомного профиля является его чувствительность как к внешним воздействиям со стороны окружающей среды, так и к внутренним особенностям организма (физиологическое состояние, текущие особенности межклеточного взаимодействия) [258]. В то время как генотип (или «геном») предсказывает то, что может случиться с данным биологическим объектом, метаболом характеризует его фенотип, объясняя, что в действительности происходит с ним в данный момент времени [254]. Метаболомика дает возможность использовать аналитические методы для исследования текущего состояния изучаемого организма, она широко применяется в различных научных областях, включая исследования физиологических и патофизиологических процессов, нутрицевтику, исследования микроорганизмов, растений, а также используется в процессе разработки и изучения ЛС [30, 121, 146, 247, 255].

Изначально метаболомика использовалась для диагностики заболеваний и определения иных патологических состояний различных органов [64, 108] и ее рассматривали как расширение химического анализа в клинической практике

[258]. По мере роста возможностей аналитических методов повышалось количество соединений, которые можно одновременно охарактеризовать. В то время как биохимические исследования направлены на единовременное изучение малого количества соединений, метаболомное профилирование позволяет изучить от десятков до сотен молекул за один анализ. Исследование различных заболеваний с помощью метаболомных методов помогает не только устанавливать возможные диагностические и прогностические биологические маркеры, но и более глубоко изучить ассоциированные с ними биохимические процессы.

С помощью метаболомных методов были изучены механизмы развития и последствия хронической почечной недостаточности. Хроническую почечную недостаточность связывают с развитием большого количества сопутствующих хронических заболеваний, таких как атеросклероз, заболевания сердечно-сосудистой системы, гипертензия, инсульт, инфаркт, кахексия, диабет, различные формы рака, деменция, подагра и анемия [161]. Причиной развития сопутствующих заболеваний являются мочевые токсины – вещества, накапливающиеся в крови и тканях организма при длительном заболевании почек [102, 161]. Авторами научных работ относят такие эндогенные вещества, как акролеин, асимметричный диметиларгинин, креатинин, гуанидинянтарная кислота, гомоцистеин, индоксил сульфат, мочевая кислота, мочевины к веществам, способным вызывать сердечно-сосудистые заболевания [102, 234], заболевания костей [102], подагру [242], кахексию [215], атеросклероз [128, 231], инсульт и инфаркт [50], деменцию [50], диабет [150], гипертензию [171] и анемию [78].

Применение метаболомики в изучении нормальных физиологических процессов чаще всего связано с исследованием эндогенных соединений, обладающих регуляторными функциями или физиологической активностью. Такими являются эндогенные вещества непептидной структуры, к которым можно отнести аминокислоты, биогенные амины, эйкозаноиды, органические кислоты, стероиды и сахара [258].

С начала 80-х годов прошлого века ведутся исследования, посвященные изучению роли аминокислот в регуляции физиологических процессов. Было

доказано, что аминокислоты, в особенности аминокислоты с разветвленной боковой цепью, играют существенную роль в секреции инсулина [126, 159]; глутамин является индуктором секреции глюкагоноподобного пептида-1 [241]; аргинин влияет на секрецию инсулина и гормона роста [85, 97]. Производные аминокислот также играют огромную роль в организме. Например, тироксин и трийодтиронин являются тиреоидными гормонами, ответственными за метаболизм углеводов, липидов и белков [80]. Вовлеченность аминокислот в столь большое число физиологических процессов привело к увеличению исследований для установления их роли в инсулинорезистентности, метаболизме углеводов, липидов и белков [119, 154]

Эйкозаноиды включают в себя простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, липоксины и резолвины. Они являются продуктом метаболизма полиненасыщенных жирных кислот и выполняют роли индукторов или блокаторов воспаления, регулируют рост клеток, контролируют кровяное давление, ответственны за приток крови к тканям [221]. Постоянно совершенствующиеся методы метаболомного анализа приводят к открытию новых эйкозаноидов и оксипинонов, для некоторых из которых характерно проявление неизвестных ранее функций [103, 173].

Особое внимание в настоящее время уделяется органическим кислотам. Известно, что 2-кетокaproевая и ретиноевая кислоты являются молекулами, обладающими регуляторными функциями, которые влияют на выделение инсулина и регулируют рост и развитие клеток [103, 208]. На данный момент также активно исследуются функции других представителей этого класса. Например, установлено, что молочная кислота поддерживает рост клеток опухоли и вызывает снижение клеточного иммунного ответа [79]; янтарная кислота способна увеличивать выброс интерлейкина- 1β и фактора некроза опухоли- α через действие на рецептор SUCNR1, который в большом количестве экспрессируется в макрофагах, тем самым регулируя активность иммунного ответа [164, 176]; лимонная кислота необходима для процесса формирования структуры костей, в котором участвуют остеобласты [88].

Методы метаболомики также нашли свое применение в исследовании биохимических процессов, связанных с кишечной микрофлорой человека. С 2006 года, совокупность микробного состава кишечника принято называть «микробиом» [107]. В связи с тем, что микробиом человека состоит из огромного количества видов микроорганизмов, которые продуцируют большое количество различных химических веществ, внимание ученых переместилось на исследование метаболома кишечной микрофлоры. На данный момент насчитывается более 100 метаболомных исследований микробиома, в ходе которых было найдено около 6700 уникальных метаболитов из множества химических классов веществ [144].

Метаболиты микробиоты кишечника (индолы, производные триптофана) играют большую роль в качестве сигнальных молекул, отвечающих за модуляцию или регуляцию физиологических процессов в организме человека. Функциональное значение метаболитов микробиоты кишечника оказалось настолько велико, что для описания их взаимодействия с различными органами было введено такое понятие, как «оси взаимодействия». На данный момент выделяют четыре «оси взаимодействия»: кишечник–мозг, кишечник–печень, кишечник–легкие и кишечник–почки [144]. Было обнаружено, что концентрации метаболитов, отвечающих за обмен информацией между органами в данных осях, изменяются при аутизме [105], шизофрении [219], болезни Паркинсона [74], астме [240]. Было установлено, что метаболиты микрофлоры кишечника выполняют функции регуляции деятельности печени [118] и почек [156].

Таким образом, развитие метаболомики привело к тому, что методы метаболомного анализа начали использовать для поиска ЛС и изучения их фармакологических эффектов.

1.2.4. Метаболомный анализ биологических объектов с целью изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ и перспективы применения фармакометабономики

Метаболомные исследования на данный момент все чаще применяются для изучения влияния различных веществ на организм, при этом увеличивается применение метабономики при поиске ЛС и изучении их побочных эффектов. Применение метабономики в областях исследований ЛС привело к появлению такого научного направления, как фармакометабономика.

Фармакометабономика в научном понимании является дисциплиной, изучающей молекулярные механизмы действия ЛС или иных ксенобиотиков, с целью предсказания ответов на их введение в зависимости от фенотипа реципиента, опираясь на метаболомные профили до и после воздействия [138]. В частности, с помощью измерения уровней эндогенных метаболитов организма после введения ксенобиотиков можно получить информацию о воздействии веществ на конкретные метаболические пути, что может дополнить информацию, получаемую классическими методами исследований фармакодинамических параметров и улучшить понимание как основных фармакологических, так и побочных эффектов ЛС [138, 140].

Фармакометаболомный подход может применяться на всех этапах разработки и исследования потенциальных ЛС. Большое количество наиболее распространенных на сегодняшний день нозологий (заболевания сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет, ожирение, депрессия) имеют четко описанные причины, связанные с нарушениями метаболических реакций [177, 199].

Открытие новых метаболических путей расширяет возможности изучения новых мишеней для воздействия ЛС. Так, недавнее обнаружение реакций образования триметиламина из холина и карнитина кишечной микрофлорой [250] в совокупности с тем, что триметиламин является прекурсором триметиламинооксида – метаболита, способного вызывать атеросклеротические

поражения – привело к открытию двух потенциальных мишеней для лечения и предотвращения атеросклероза – флавиновой монооксигеназы 3 и бактериальной холин-триметиламинлиазы, которые ответственны за синтез триметиламинооксида [66]. После открытия данных мишеней ЛС для лечения атеросклероза, в течение двух месяцев Hazen и соавт. предложили потенциальный ингибитор найденных ферментов – 3,3-диметилбутанол, который является натуральным компонентом оливкового масла [250]. Затем были проведены доклинические исследования и обнаружены ингибиторы ферментов, которые начали использовать в медицинских целях [192].

Ярким примером применения фармакометабономики для понимания механизмов развития заболеваний с последующим установлением важнейших мишеней может послужить недавнее изобретение двух новых ЛС для лечения рецидивирующей формы острого миелоидного лейкоза – ивосидениба и энаседениба. В научных трудах Dang и соавт. [89] и Ward и соавт. [251] описано применение метаболомных методов с целью изучения рецидивирующего миелоидного лейкоза. Результаты исследований показали, что у пациентов с данным заболеванием присутствуют формы мутантных ферментов изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 типов, которые превращают α -кетоглутарат в α -гидроксиглутаровую кислоту, концентрации которой были повышены у пациентов с лейкозом [205]. После данного открытия было доказано, что ингибиторы изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 типа в *in vitro* и *in vivo* исследованиях уменьшали скорость превращения α -кетоглутарата в α -гидроксиглутаровую кислоту и замедляли рост и развитие опухолей [261]. После проведения подтверждающих исследований *in vitro* и *in vivo* [225], в Соединенных Штатах Америки в 2017 году было разработано и зарегистрировано ЛС энаседениб, являющееся ингибитором изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 типов [184].

На стадии клинических исследований фармакометабономика может использоваться в исследовании метаболизма ЛС [9, 27], измерении силы терапевтического ответа [10, 31], определении рационального дозирования [34, 35, 194] и оптимального ответа на терапию [123]. Применение фармакометаболомных

методов является наиболее перспективной областью исследований для формирования нового подхода к лечению пациентов – персонализированной медицины, целью которой является использование новейших технологий и подходов с целью определения индивидуальной терапии для каждого пациента. Наиболее ярким примером использования фармакометаболического подхода в лечении заболеваний является индивидуализация терапии при лечении наследственных болезней обмена веществ (НБОВ). Скрининг метаболитов, связанных с НБОВ, используется не только для диагностики заболеваний, но и для подбора персонализированной фармакотерапии, а также для мониторинга оказываемого терапией эффекта [110]. Существуют также научные подходы и инициативы, которые направлены на длительное проспективное исследование больших когорт пациентов (сотни тысяч человек) с целью установления состояния здоровья каждого пациента и мониторинга изменений метаболома с целью диагностики заболеваний и назначения лечения [101].

Еще одним применением фармакометабомики в персонализированной медицине является мониторинг терапевтического ответа на лечение. Терапевтический ответ часто варьирует и зависит от возможности экспрессировать различные гены цитохромов P450 [1, 7, 26, 32, 244]. В то время, как фармакогеномика давно используется в персонализированной фармакотерапии [33, 36], все более увеличивающееся применение фармакометабомики дополняет информацию, получаемую с помощью геномного анализа [17, 18, 139]. Научные исследования, направленные на изучение метаболизма ЛС, наглядно демонстрируют, что метаболизм лекарственных веществ зависит не только от генетических факторов, но и от этнического происхождения, возраста, пола, веса, диеты и прочего, при этом влияние данных факторов невозможно предсказать с помощью генетических данных [37, 139]. Так, фармакометаболический подход впервые был применен Clayton и соавт. с целью предсказания скорости метаболизма ЛС у индивидуальных реципиентов, а также для коррекции дозировки лекарственных препаратов [81].

Дальнейшие работы по применению фармакометаболического подхода показали возможность предсказания индивидуального терапевтического ответа на лечение. Например, были обнаружены существенные корреляции между уровнем эндогенных метаболитов и терапевтическим ответом на лечение симвастатином [136, 137]. Применение фармакометаболического подхода уже зарекомендовало себя при подборе фармакотерапии при трансплантации органов [210], терапии болезни Альцгеймера [195], подборе индивидуальных доз статинов [152], антидепрессантов [266] и других препаратов [98, 260]. Например, в работе Kaddurah-Daouk и соавт. были обнаружены изменения концентраций фосфатидилэтаноламина и большого спектра липидов в плазме крови после трехнедельной терапии пациентов с шизофренией препаратами оланзапин и рисперидон [135]. В работе Krause и соавт. было установлено изменение концентраций метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана у пациентов с большим депрессивным расстройством как ответ на лечение целекоксибом [151].

Метаболический анализ также нашел свое применение при оценке эффективности проводимой терапии с целью изучения воздействия нейротропных веществ на концентрации эндогенных метаболитов. Kaddurah-Daouk и соавт. в исследовании терапии депрессивного состояния с помощью циталопрама обнаружили уменьшение концентраций серотонина и увеличение концентраций 5-гидрокситриптофана и 5-гидроксииндолуксусной кислоты в плазме крови человека [56]. Также были обнаружены изменения концентраций катехоламинов, метаболитов окислительного стресса и метаболитов кишечной микрофлоры [56]. В исследовании Rotroff и соавт. были обнаружены изменения профиля метаболитов индоловых кислот у пациентов с большим депрессивным расстройством после терапии кетамином, при этом изменение концентраций эндогенных веществ коррелировало с успешностью терапии [209].

Первые работы в области сопоставления данных, полученных традиционными методами, с данными, полученными методами «омиксных» наук, были проведены «InnoMed PredTox consortium». Они показали, что метаболомные данные очень хорошо сопоставляются с результатами традиционных методов, а

также могут дополнить уже имеющиеся знания о токсичности ЛС [170]. На данный момент также существуют клинические исследования новых химических веществ, в которых, в частности, используются фармакометаболомные подходы. Так, Burt и Nandal приводят данные систематического поиска, по результатам которого за временной промежуток с 2004 по 2015 год было проведено 99 клинических исследований лекарственных веществ, в которых использовался фармакометаболомный анализ [68].

В исследованиях на животных были установлены эффекты различных наркотических веществ на количество нейромедиаторов. Воздействие метамфетамина приводило к увеличению концентраций дофамина, триптофана и фосфатидилхолина в мозге крыс [172]. Воздействие героина и морфина вызывало нарушение синтеза серотонина, а также влияло на дофаминергическую систему [265].

На стадии доклинических исследований использование фармакометабономики применимо при разработке новых ЛС и изучения основных фармакологических и побочных эффектов. Интегрирование фармакометаболомного подхода при исследовании ремоксиприда, являющегося антагонистом дофаминовых рецепторов второго типа, выявило изменения концентраций многих эндогенных веществ – аминокислот и биогенных аминов – которые коррелировали с фармакологическими показателями ремоксиприда и позволили описать потенциальные механизмы развития токсических эффектов при его приеме [65].

Изучение безопасности также является важным этапом разработки ЛС и значимой частью постклинических исследований [249]. Изучение метаболомных путей, связанных с реализацией токсического действия ЛС, является перспективным подходом, который покрывает исследования как органоспецифической токсичности [115, 116], так и общей токсичности, оказываемой на организм [55, 59].

1.3. *Danio rerio* – новая биологическая модель для изучения фармакологических эффектов химических веществ

В настоящее время продолжается поиск новых моделей для исследования фармакологических эффектов химических веществ. Помимо смещения области доклинических исследований в сторону *in vitro* моделей, идет поиск новых животных моделей, которые будут обладать высокой информативностью, производительностью, обеспечивать уменьшение стоимости исследований [202]. Внимание ученых с недавнего времени привлекли рыбы вида *Danio rerio*.

Danio rerio (Данио рерио, зебрафиш) является видом маленьких пресноводных рыбок из семейства карповые [147]. *Danio rerio* использовали для изучения биологии развития и патофизиологии. Физиологические параметры рыб вида *Danio rerio* были впервые полностью описаны в 1995 году и с этого времени мировая научная общественность успешно использует этих животных как альтернативу другим *in vivo* моделям [13, 20, 147].

Преимуществами рыб вида *Danio rerio* по сравнению с другими моделями являются:

а) генетическое и физиологическое сходство с людьми – строение мозга, пищеварительного тракта, мускулатуры и врожденной иммунной системы [142, 143];

б) подобие генеза заболеваний – около 80% генов, ответственных за заболевания у людей, присутствуют у рыб вида *Danio rerio* [213];

в) сравнительно быстрая половозрелость (3-5 месяцев), после созревания самка способна приносить приблизительно по 200 икринок за один нерест [63, 73];

г) эмбрионы рыб вида *Danio rerio* развиваются очень быстро: фаза бластуляции и гастрюляции длится около пяти часов, к 24 часам после оплодотворения у эмбриона формируются все важнейшие системы органов, а к 72 часам эмбрион выходит из хориона и является полностью функциональным организмом [186];

д) содержание рыб вида *Danio rerio* не требует больших финансовых затрат и значительного пространства для установки оборудования для водоподготовки [158, 180].

Применение рыб вида *Danio rerio* в области биологии развития включает в себя множество исследований, в основном связанных с изучением развития нервной системы и ангиогенеза. Прозрачность эмбрионов рыб вида *Danio rerio* позволила более глубоко изучить процессы гастрюляции [204], ангиогенеза [77], потока крови в сосудах [153] и развития периферической и центральной нервной системы [157].

Большая часть как тканей, так и органов (за исключением легких, простаты и молочных желез), присутствуют у рыб вида *Danio rerio* и схожа с таковыми у человека [198]. С помощью методов генетики и селекции были выведены штаммы (линии) рыб вида *Danio rerio*, для которых характерны нейродегенеративные заболевания [2, 224], нарушения гемопозза [54], патологии сердечно-сосудистой системы [218], онкологические заболевания [162], болезнь Паркинсона [214] или тревожный синдром [11].

Множество мировых ученых исследовали сходство рыб вида *Danio rerio* и человека. Так, Howe и соавт. в 2013 году секвенировали геном рыб вида *Danio rerio* и пришли к выводу о том, что 70% генов (включая гены, ответственные за кодирование последовательности аминокислоты в белках семейства CYP P450) у рыб вида *Danio rerio* аналогичны таковым у человека, либо имеют ортологи [124]. Также работы по изучению белкового состава плазмы крови и органов рыб вида *Danio rerio* показали высокое сходство с таковым у млекопитающих, в том числе и с человеком [52, 160].

Учеными была изучена анатомия мозга рыб вида *Danio rerio* и доказано высокое сходство его строения с млекопитающими [4, 16]. Присутствующие в строении мозга рыб вида *Danio rerio* медиальная, дорсальная и латеральная мантии соответствуют миндалевидному телу, коре и гиппокампу млекопитающих [62, 181]. Было доказано наличие важнейших ферментов, ответственных за реакции синтеза и метаболизма нейромедиаторов, таких как тирозингидроксилаза [72],

моноаминоксидаза [48], катехол-О-метилтрансфераза [191], холинацетилтрансфераза [182].

Научные исследования также показали высокое сходство нейромедиаторных систем человека и рыб вида *Danio rerio*. У рыб вида *Danio rerio* присутствуют ГАМКергическая, дофаминергическая, адренергическая, серотонинергическая, холинергическая системы, а также сайты связывания глицина, глутамата и аспартата [122, 191].

При исследовании эффектов химических веществ рыбы вида *Danio rerio* чаще всего используются для изучения токсических эффектов фармацевтических субстанций, косметических средств, наночастиц и пестицидов [14, 239]. Растущее количество токсикологических исследований с использованием рыб вида *Danio rerio* обусловлено минимальным количеством вещества, необходимым для эксперимента [21, 185], высокой скоростью размножения и возможностью экстраполяции данных на млекопитающих [117]. Наиболее часто используемым тестом химических веществ на рыбах вида *Danio rerio* является определение полулетальной концентрации (ЛК₅₀) для определения острой токсичности. Проведение экспериментов по изучению острой токсичности на рыбах вида *Danio rerio* регламентируется ГОСТ 33774-2016 «Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Острая токсичность для эмбрионов рыбы». Летальность, вызываемая химическим веществом, оценивается в течение 96 часов каждые 24 часа. Летальность оценивается визуальным методом на наличие коагулированных эмбрионов, отсутствие формирования сомитов, открепления хвоста или сердцебиения [222]. Исследование острой токсичности для эмбрионов рыбы является альтернативой тестам на взрослых рыбах и на других животных, так как эмбрионы рыб вида *Danio rerio* возрастом до шести дней после оплодотворения не попадают под регуляторные акты об экспериментах на животных [230]. Использование эмбрионов рыб вида *Danio rerio* уменьшает количество животных в исследованиях на летальность и потенциально может заменить тестирование на стандартных моделях.

Рыбы вида *Danio rerio* также представляют интерес для изучения морфологических изменений при воздействии химических веществ. Морфологические изменения включают в себя нарушения развития сердца и плавательного пузыря, строения тела (сомитов, хвоста и плавников), развития нервной системы (мозга, ното хорды, глаз). Эти эффекты можно определить визуально, либо с помощью обычного светового микроскопа [193]. Морфологические изменения, особенно в сравнении с группой контроля, легко заметны. Данные исследования постепенно заменяют классические тесты на моделях млекопитающих [190, 252].

Изучение спонтанной и индуцированной локомоторной активности мальков рыб вида *Danio rerio* используется для выявления действия химических веществ на ЦНС [19, 38, 155]. У рыб вида *Danio rerio* присутствует полностью функциональный гематоэнцефалический барьер [67, 141], поэтому поведенческие тесты с использованием рыб вида *Danio rerio* могут использоваться для изучения химических веществ, потенциально обладающих нейротоксичностью. Например, количество спонтанных движений рыб вида *Danio rerio* (скорость, продолжительность и протяженность плавания) существенно снижалось при воздействии пестицидов [134] и промышленных химических веществ [246]. Изменение в поведенческой активности рыб вида *Danio rerio* как ответ на визуальные стимулы (тест светло-темного аквариума и светового стимула) используется для исследования влияния фармацевтических субстанций [166] и нейротоксикантов на ЦНС [149].

Успех традиционных методов исследования влияния различных химических веществ на рыб вида *Danio rerio* привел к развитию метаболомных и фармакометаболомных подходов к изучению химических субстанций на данной животной модели. Примером применения метаболомного подхода является изучение влияния полистиреновых микропластиков на рыб вида *Danio rerio*. Данные соединения вызывали изменения в концентрации аминокислот (пролина, лейцина, лизина и треонина) и липидов (линоленовая и пальмитиновая кислоты), что говорит о нарушениях функций печени [197].

Фармакометаболические исследования с использованием рыб вида *Danio rerio* приобретают особое значение при изучении пестицидов и инсектицидов как загрязнителей окружающей среды и потенциально опасных для здоровья человека веществ. Исследования воздействия бисфенола А [187], хлоропиррофоса [125], фипронила [260], флутоланила [236, 255] и изокарбофоса [133] показали, что данные вещества существенно влияют на метаболический профиль зебрафиш, доказывая токсичность для сердца, печени, мозга и скелетных мышц.

Исследования фармакометаболических изменений при воздействии фармацевтических субстанций на рыб вида *Danio rerio* только начинают набирать популярность. С помощью фармакометаболических методов было установлено, что фунгициды диниконазол и дифениконазол вызывают серьезные нарушения метаболизма липидов, аминокислот, сахаров и нуклеотидов [255, 249]. Воздействие противомикробного средства триклозана приводит к изменению уровней мочевины, лимонной кислоты, галактозы, глюкозы, стеариновой кислоты, пролина, фенилаланина и глутамина [101]. Воздействие циталопрама, флуоксетина, amitриптилина изменяло концентрации глутамата, триптофана, ацетилхолина и серотонина в мозге рыб вида *Danio rerio* [90].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что применение фармакометаболического подхода для изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ представляет огромный научный интерес. Использование рыб вида *Danio rerio* как альтернативы другим моделям животных является очень перспективным направлением развития доклинических исследований ФАВ.

В научной литературе представлены работы, посвященные изучению влияния различных химических веществ на метаболиты рыб вида *Danio rerio* с целью установления как целевых фармакологических, так и побочных эффектов. Однако исследований, посвященных целевому фармакометаболическому анализу для изучения фармакологических эффектов химических веществ на рыбах вида *Danio rerio*, немного. Вместе с тем, не разработана методология фармакометаболического подхода в исследовании фармакологических эффектов физиологически активных веществ на рыбах вида *Danio rerio* как модельного животного с целью стандартизации подхода и формирования направлений дальнейшего его использования в научной практике.

В связи с этим актуальной задачей является разработка методических и методологических основ фармакометаболического подхода для исследования фармакологических эффектов воздействия физиологически активных веществ с использованием рыб вида *Danio rerio* в качестве биологической модели, а также экспериментальное подтверждение обоснованности предложенных подходов для решения поставленной задачи и формирования направлений дальнейшего использования этого метода в научной практике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы и оборудование

2.1.1. Фармакологические вещества

Диазепам (7-хлоро-1-метил-5-фенил-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазе-пин-2-он) был получено из Sigma-Aldrich (Дармштадт, Германия). Диазепам является фармакологическим веществом с четко описанными свойствами и механизмом действия на ЦНС; воздействие диазепама вызывает аллостерическую модификацию рецепторов ГАМК, тем самым увеличивая их сродство к нейромедиатору и снижая возбудимость нейронов [5]. Он используется в качестве эталонного препарата при экспериментальном изучении и поиске новых лекарственных веществ с анксиолитическим действием [41, 42]. Для диазепама описано влияние на различные системы нейрональной передачи, включая ГАМКергическую [69], серотонинергическую [195], дофаминергическую/адренергическую [222, 228] и холинергическую [87] системы. В связи с этим, диазепам был выбран как препарат изучения комплексного воздействия на нейромедиаторные системы мальков рыб вида *Danio rerio*.

Фармакологически активное вещество 5F-АПИНАК ((3s,5s,7s)-адамантан-1-ил-1-(5-фторпентил)-1Н-индазол-3-карбоксилат) (Cauman Chemicals, Мичиган, США) было предоставлено отделением судебной медицины департамента диагностики и общественного здравоохранения Университета Вероны. По своей химической структуре и механизму действия 5F-АПИНАК относится к классу синтетических каннабиноидов – агонистов каннабиноидных рецепторов [49].

Синтетические каннабиноиды реализуют нейротропные эффекты в основном за счет взаимодействия с каннабиноидными рецепторами первого типа (CB1) в ЦНС [128]. Механизм действия каннабимиметиков заключается в наведенном деполяризацией подавлении ингибирования и возбуждения, которое реализуется за счет снижения выброса нейромедиаторов из пресинаптических нейронов [76]. Несмотря на то, что на данный момент существуют исследования, посвященные

изучению действия каннабимиметиков на различные системы нейрональной передачи [57, 91, 93], комплексных исследований изменения концентраций нейромедиаторов при воздействии каннабимиметиков проведено не было. В связи с вышеизложенным, для изучения действия синтетических каннабимиметиков на ЦНС мальков рыб вида *Danio rerio* был выбран 5F-АПИНАК.

2.1.2. Стандартные образцы

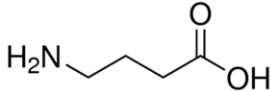
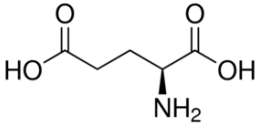
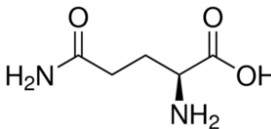
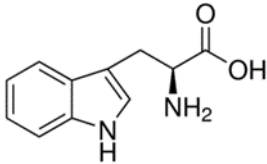
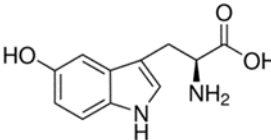
Стандартные образцы метаболитов ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической/адренергической, холинергической систем, системы аспартата, кинуренинового, индольного путей метаболизма триптофана (микробиомный путь) и прочих метаболитов, относящихся к нейротрансмиссии, были получены из Sigma-Aldrich (Дармштадт, Германия) и Honeywell Fluka (Лестершир, Великобритания). Изотопно-меченые стандарты были предоставлены Sigma-Aldrich и Toronto Research Chemicals (Торонто, Канада). Чистота всех стандартных образцов была выше 99,0%.

Перечень стандартных образцов представлен в Таблице 1.

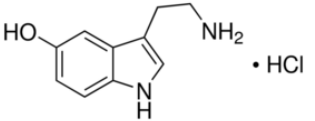
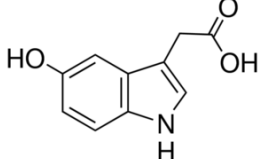
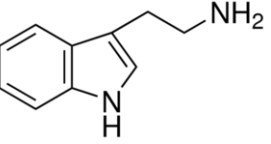
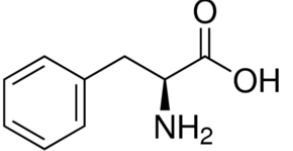
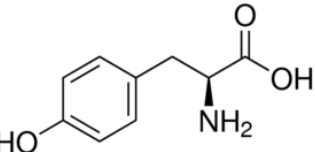
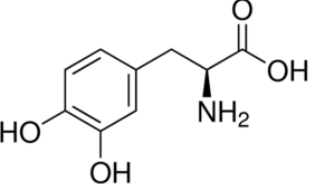
2.1.3. Реактивы

В исследованиях использовались следующие реактивы: диметилсульфоксид (ДМСО) (ACS reagent, $\geq 99.9\%$, Merck, Германия), натрий хлористый («хч», Prime Chemicals Group, Россия), калий хлористый («хч», Prime Chemicals Group, Россия), кальций хлористый 2-водный («ч», Prime Chemicals Group, Россия), магний сернокислый 7-водный («хч», Prime Chemicals Group, Россия), метиленовый синий ($\geq 97\%$, Prime Chemicals Group, Россия), спирт этиловый (puriss, Merck, Германия), натрия метабисульфит

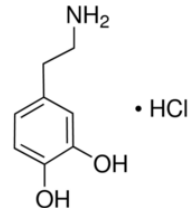
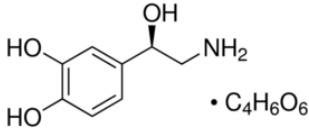
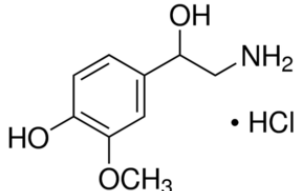
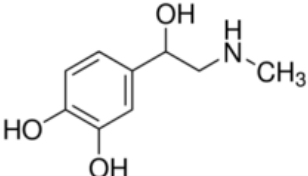
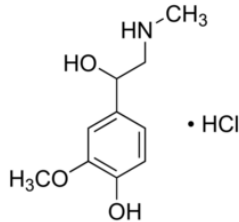
Таблица 1 – Стандартные образцы

Нейромедиаторная система или метаболический путь	Метаболит	Тип метаболита	Формула	Мол. масса, г/моль	Cas№
ГАМКергическая система	Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)	Нейромедиатор		103,12	56-12-2
	Глутаминовая кислота	Нейромедиатор, прекурсор ГАМК		147,13	56-86-0
	Глутамин	Прекурсор ГАМК		146,12	56-85-9
Серотонинергическая система	Триптофан	Прекурсор 5-гидрокситриптофана		204,23	73-22-3
	5-гидрокситриптофан	Прекурсор серотонина		220,22	4350-09-8

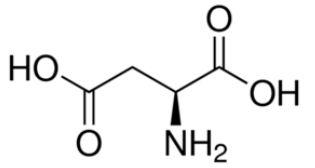
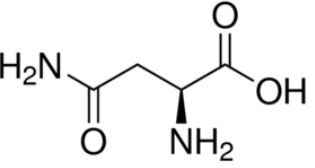
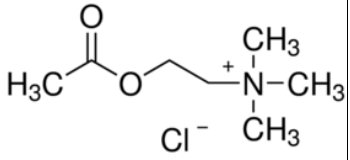
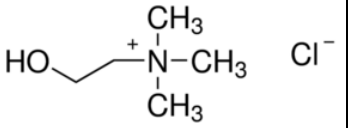
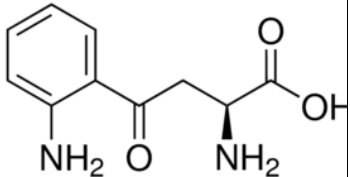
Продолжение Таблицы 1.

	Серотонин	Нейромедиатор		212,68 (в виде гидрохлорида)	153-98-0
	5-гидроксииндолуксусная кислота	Метаболит серотонина		191,18	54-16-0
	Триптамин	Метаболит альтернативного пути катаболизма триптофана		160,22	61-54-1
Дофаминергическая/ адренергическая система	Фенилаланин	Прекурсор тирозина		165,19	63-91-2
	Тирозин	Прекурсор L-ДОФА		181,19	60-18-4
	L-ДОФА	Прекурсор дофамина		197,19	59-92-7

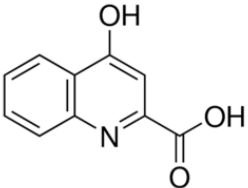
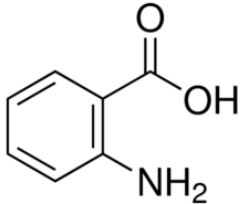
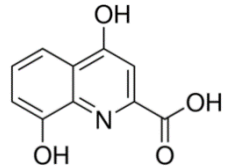
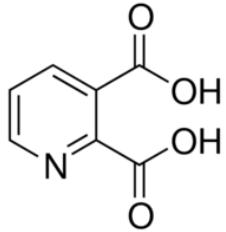
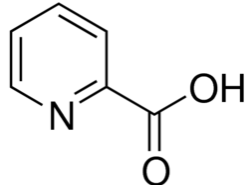
Продолжение Таблицы 1.

	Дофамин	Нейромедиатор, прекурсор норадреналина	 <chem>NCCc1ccc(O)c(O)c1.[Cl-]</chem>	189,64 (в виде гидрохлорида)	62-31-7
	Норадреналин	Нейромедиатор, прекурсор адреналина	 <chem>N[C@@H](O)Cc1ccc(O)c(O)c1.[C4H6O6]</chem>	319,26 (в виде тартрата)	3414-63-9
	Норметанефрин	Метаболит норадреналина	 <chem>N[C@@H](O)Cc1ccc(OC)c(O)c1.[Cl-]</chem>	219,67 (в виде гидрохлорида)	1011-74-1
	Адреналин	Нейромедиатор	 <chem>CN[C@@H](O)Cc1ccc(O)c(O)c1.[Cl-]</chem>	219,67 (в виде гидрохлорида)	329-63-5
	Метанефрин	Метаболит адреналина	 <chem>CN[C@@H](O)Cc1ccc(OC)c(O)c1.[Cl-]</chem>	233,69 (в виде гидрохлорида)	881-95-8

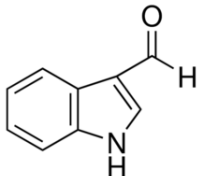
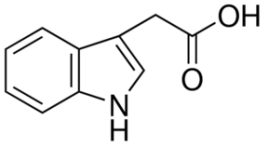
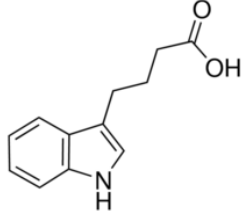
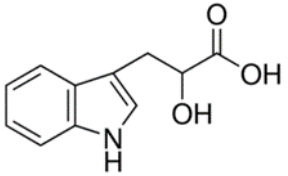
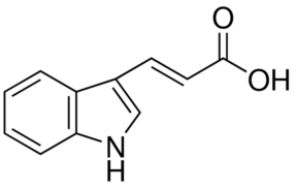
Продолжение Таблицы 1.

Система аспартата	Аспарагиновая кислота	Нейромедиатор		133,10	56-84-8
	Аспарагин	Прекурсор аспарагиновой кислоты		132,12	70-47-3
Холинергическая система	Ацетилхолин	Нейромедиатор		181,66 (в виде хлорида)	60-31-1
	Холин	Прекурсор и метаболит ацетилхолина		139,62 (в виде хлорида)	67-48-1
Кинурениновый путь	Кинуренин	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		208,21	2922-83-0

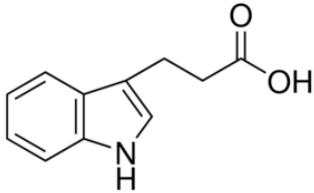
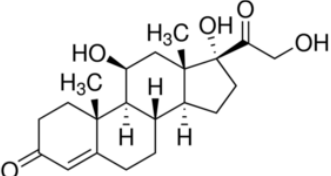
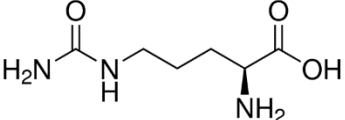
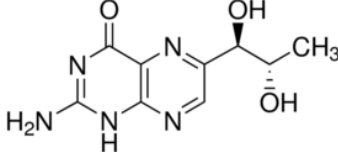
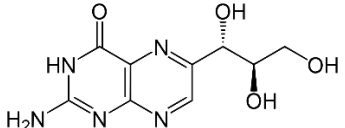
Продолжение Таблицы 1.

	Кинуреновая кислота	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		189,17	492-27-3
	Антралиловая кислота	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		137,14	118-92-3
	Ксантуреновая кислота	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		205,17	59-00-7
	Хинолиновая кислота	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		167,12	89-00-9
	Пиколиновая кислота	Метаболит кинуренинового пути катаболизма триптофана		123,11	98-98-6

Продолжение Таблицы 1.

Индольный путь метаболизма триптофана (микробиомный путь)	Индол-3- карбоксальдегид	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		145,16	487-89-8
	Индол-3-уксусная кислота	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		175,18	87-51-4
	Индол-3-масляная кислота	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		203,24	133-32-4
	Индол-3-молочная кислота	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		205,21	832-97-3
	Индол-3-акриловая кислота	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		187,19	1204-06-4

Продолжение Таблицы 1.

	Индол-3-пропионовая кислота	Метаболит индольного пути катаболизма триптофана		189,21	830-96-6
Прочие метаболиты, относящиеся к нейротрансмиссии	Кортизол	Биомаркер стресса		362,46	50-23-7
	Цитруллин	Метаболит глутамина		175,19	372-75-8
	Биоптерин	Кофактор ферментов, участвующих в синтезе моноаминов		237,22	22150-76-1
	Неоптерин	Метаболит биоптерина		253,21	2009-64-5

(puriss, Merck, Германия), спирт метиловый («хч», Химмед, Россия), кислота аскорбиновая (99%, Merck, Германия), ацетонитрил (HPLC, Fisher Chemical, США), кислота муравьиная (99,0+%, Optima LC-MS grade, Fisher Scientific, США), вода деионизированная, электрическое сопротивление 18,2 МОм*см⁻¹ (Millipore Direct Q3-UV, Merck-Millipore, США), метоксиамина гидрохлорид (98%, Sigma-Aldrich, Германия), пиридин безводный (99,8%, Sigma-Aldrich, Германия), N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (Sigma-Aldrich, Германия), толуол безводный (99,8%, Sigma-Aldrich, Германия).

2.1.4. Оборудование

В исследованиях использовалось следующее оборудование: жидкостной хроматограф Agilent 1290 II Infinity, оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, и сопряженный с тройным квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 6470 (Agilent Technologies, США); колонка Discovery HS F5-3 PFP (150 мм, 2.1 мм, 3 мкм), Supelco, Германия; газовый хроматограф 7820A (Agilent Technologies, США), соединенный с масс-спектрометрическим детектором MSD 5977 (Agilent Technologies, США); колонка Agilent HP-5MS (30 м, 0,25 мм, 0,25 мм) (Agilent Technologies, США); весы аналитические Adventurer AR 1530 (Ohaus Corporation, Швейцария); центрифуга настольная с максимальным ускорением 16873^xg и охлаждением до 4°C 5418R (Eppendorf AG, Германия); вихревой встряхиватель Genius 3 (BioSan, Латвия); центрифужный вакуумный концентратор MiVac Quattro Concentrator (Fisher Scientific, США); ультразвуковая баня DT 255 H (Bandelin, Германия); дозаторы переменного объема 0,1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 500-5000 мкл (Eppendorf AG, Германия); система водоподготовки Millipore Direct Q3-UV (Merck-Millipore, США); световой микроскоп Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия); высокопроизводительная система видеотрекинга (DanioVision, Noldus, Нидерланды); 6- и 12-луночные культуральные планшеты (Corning, США).

2.2. Экспериментальные животные

Рыб вида *Danio rerio* содержали согласно ГОСТ 33219-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями и рептилиями» и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» СЕД №123 [23].

Самцы и самки родительского стада рыб вида *Danio rerio* дикой линии АВ для Университета Вероны были приобретены в Европейском Центре Зебрафиш (European Zebrafish Resource Center, Германия). Самцы и самки родительского стада рыб вида *Danio rerio* дикой линии АВ для Сеченовского Университета были приобретены в локальном зоомагазине (АкваЛого, Москва). Самцы и самки содержались в разных аквариумах для предотвращения произвольного размножения с постоянным обменом воды (4-6 объемов в час) [23]. Максимальная плотность содержания рыб вида *Danio rerio* – 1 особь на 2 литра воды. Продолжительность светового дня – 14 часов. Температура воды и воздуха поддерживалась на постоянном уровне ($26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и 25°C соответственно) [23]. Рыб кормили дважды в день сухим кормом (TetraMin, Tetra GmbH, Германия) и трижды в неделю живым кормом (науплии *Artemia salina*, Аква Меню, Россия).

Для получения оплодотворенной икры для проведения экспериментов применялась следующая схема размножения в косяке: самцов и самок в соотношении 2:1 пересаживали в нерестовый аквариум за один час до конца светового дня; на дно аквариума клали рамку (разделитель) с сеткой из полимерного материала; аквариум заполняли водой с таким расчетом, чтобы уровень воды был выше рамки с сеткой на 4-5 сантиметров (размещение рамки на дне аквариума, а также низкий уровень воды, позволяет избежать поедания икры родителями). Температура воды в аквариуме поддерживалась на уровне $28,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (на 2 градуса выше установленной при содержании родительского косяка) для инициирования созревания икры у самок. Нерест рыб вида *Danio*

rerio происходит ранним утром, сразу после начала светового дня, и длится приблизительно 30 минут. После того, как процесс нереста завершен, родительское стадо перемещали в аквариумы, подключенные к системе фильтрации; из нерестового аквариума вытаскивали разделитель, воду вместе с оплодотворенными икринками сливали через сито для отделения икринок; далее икру промывали, отделяли неоплодотворенные икринки; оплодотворенную икру содержали при температуре $28,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и выдерживали 1 день; далее отделяли неоплодотворенную и погибшую икру, которую определяли с помощью светового микроскопа Leica DM2000 (Leica, Германия); оставшиеся икринки использовали для проведения экспериментов.

2.3. Приготовление растворов и буферов

2.3.1. Приготовление растворов исследуемых веществ

Концентрированные растворы диазепама и 5F-АПИНАК готовили путем растворения точной навески стандартного образца в этиловом спирте (этанол) или ДМСО для хроматографии. Рабочие растворы готовили разведением концентрированных растворов до получения необходимой концентрации. В качестве растворителя использовали среду для содержания эмбрионов/мальков рыб вида *Danio rerio* E3. При дальнейшем разведении необходимо поддерживать концентрацию органических растворителей на уровне 0,1%. Приготовленные концентрированные и рабочие растворы маркировали и хранили при температуре от +4 до +8°C не более суток.

2.3.2. Приготовление рабочего раствора для содержания эмбрионов (E3)

Для поддержания нормальной жизнедеятельности эмбрионов их необходимо содержать в солевом растворе с известной концентрацией ионов [3]. Для этой цели подготавливается серия растворов содержания эмбрионов (E3): 50-ти кратный (50x) исходный раствор, состоящий из 14,6 г NaCl, 0,63 г

KCl, 2,43 г CaCl₂·2H₂O, 4,07 г MgSO₄·7H₂O на 1 литр воды деионизированной. Далее раствор доводится до рабочей концентрации последовательными разбавлениями. После достижения рабочей концентрации к раствору прибавляется 100 мкл 1% раствора метиленового синего. Полученный рабочий раствор E3 (1x) используется для содержания эмбрионов. Также рабочий раствор E3 используется для растворения исследуемых веществ вместо деионизированной воды. Приготовленные концентрированные и рабочие растворы маркировали и хранили при температуре от +4 до +8°C не более суток.

2.4. Методы установления концентрационных диапазонов для диазепама и 5F-АПИНАК

Дизайн эксперимента

Все эксперименты проводились в соответствии с ГОСТ 33774-2016 «Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Острая токсичность для эмбрионов рыбы» и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» СЕД №123 [27].

Проведение всех экспериментов на рыбах вида *Danio rerio* было одобрено на заседании Локального этического Комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет) (протокол № 31-20 очередного заседания Локального этического Комитета), а также этической комиссией Университета Вероны.

Установление рабочих концентрационных диапазонов для диазепама

Выбор концентрационного диапазона диазепама был основан на литературных данных. Согласно исследованиям различных авторов, концентрация диазепама, равная 0,8 мкг/л, считается наивысшей определяемой концентрацией в окружающей среде, в то время как воздействие диазепама в концентрации 160 мкг/л в среде обитания рыб вида *Danio rerio*

вызывает изменения поведенческой активности у 100% мальков рыб вида *Danio rerio* [238].

Установление рабочих концентрационных диапазонов для 5F-АПИНАК (Определение ЛК₅₀ 5F-АПИНАК)¹

Для выбора диапазона доз 5F-АПИНАК проводилось исследование полулетальной концентрации (ЛК₅₀); диапазон доз основан на литературных данных с учетом исследований вещества АПИНАК, предшественника 5F-АПИНАК [23, 39, 178].

Проводили эксперимент по определению ЛК₅₀ 5F-АПИНАК для мальков рыб вида *Danio rerio*. Испытание проводили сразу после получения икры и продолжали в течение 96 часов. В эксперименте по 40 икринок рыб вида *Danio rerio* (возраст – 0 дней после оплодотворения) переносили в лунки 12-луночного планшета. Использование вдвое большего, чем в эксперименте числа икринок обусловлено невозможностью определения оплодотворенности икры вплоть до шести часов после оплодотворения. Неоплодотворенную икру отделяли спустя 6 часов от начала эксперимента. Эксперимент включал в себя следующие группы: 5 опытных групп, которые подвергались воздействию растворов 5F-АПИНАК с концентрациями 10, 20, 40, 80 и 100 мкМ в 1% растворе ДМСО в среде Е3; группу контроля растворителя – 20 икринок рыб вида *Danio rerio* в 1% растворе ДМСО в среде Е3; положительный контроль – раствор 3,4-дихлоранилина в концентрации 4 мг/л в 1% растворе ДМСО в среде Е3; группа отрицательного контроля – 20 икринок рыб вида *Danio rerio* в среде Е3. Наблюдения жизнеспособности включали фиксацию следующих показателей: коагуляция, отсутствие формирования сомитов, сердцебиения и не отделение хвоста. При наличии одного из вышеуказанных показателей, эмбрион рыб вида *Danio rerio* считали погибшим. Наблюдения регистрировали каждые 24 часа до окончания испытания. Определение ЛК₅₀ проводили методом пробит-регрессии.

¹ Исследование выполнено на базе отделения судебной медицины департамента диагностики и общественного здравоохранения Университета Вероны, Италия

2.5. Нецелевое метаболомное профилирование

Дизайн эксперимента

В эксперименте использовались мальки рыб вида *Danio rerio* в возрасте шести дней после оплодотворения (6 дпо), произвольно, но равно разделённые на контрольную и опытную группы. Эксперимент проводился в шести параллелях. В каждом эксперименте по 20 мальков рыб вида *Danio rerio* переносили в лунки 6-луночного планшета, каждая из лунок содержала по 5 мл раствора ЕЗ. Воздействие раствора диазепама с концентрацией 160 мг/л на мальков рыб вида *Danio rerio* возрастом 6 дпо проводили в течение 2,5 часов.

Графическая схема дизайна эксперимента по воздействию диазепама на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения нецелевого метаболомного исследования представлена на Рисунке 1.

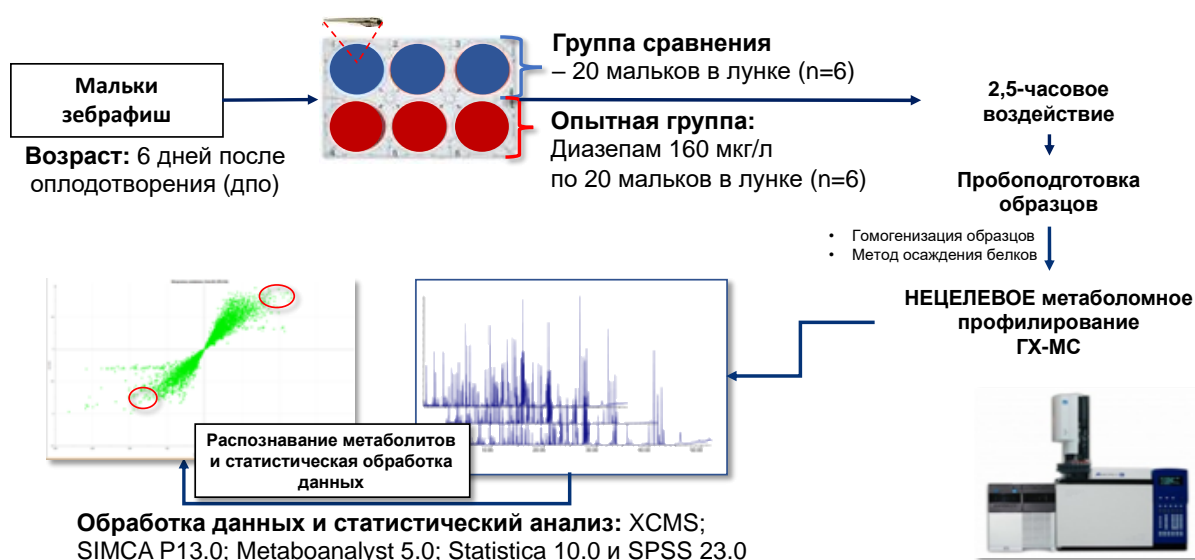


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента по воздействию диазепама на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения нецелевого метаболомного исследования

Подготовка биологических проб

Пробоподготовка мальков рыб вида *Danio rerio* проводилась по следующей методике: в микропробирки объемом 1,5 мл мальков рыб вида *Danio rerio* переносили пипеткой Пастера. Далее водную фазу отделяли и немедленно добавляли 10 мкл 13 мМ холодного раствора метабисульфита натрия с целью предотвращения окисления метаболитов и эвтаназии мальков. Далее добавляли 10 мкл смеси внутренних стандартов, перемешивали на вортексе. Затем добавляли 450 мкл холодного метанола с целью осаждения белков и предотвращения окисления метаболитов, встряхивали на вортексе в течение 20 секунд и помещали в ультразвуковую баню, наполненную льдом, на 15 минут с целью экстракции метаболитов и дополнительного осаждения белков. Полученную взвесь встряхивали на вихревом встряхивателе и центрифугировали в охлаждаемой до 4°C центрифуге при 16,900 об/мин в течение 5 минут. Далее, по 200 мкл супернатанта переносили в две микропробирки и упаривали досуха при нагревании и пониженном давлении.

Для проведения ГХ-МС анализа к полученному сухому остатку прибавляли 20 мкл раствора метоксиами́на гидрохлори́да в пиридине (40 мг/мл) и помещали на 60 минут в термошейкер при $t=60^{\circ}\text{C}$ с целью дериватизации кетогрупп. Далее добавляли 50 мкл толуола и 50 мкл дериватирующего реагента (N-метил-N-(триметилсилил) трифторацетамид) и выдерживали 50 минут в термошейкере при $t=70^{\circ}\text{C}$ с целью замещения водорода в гидроксигруппах на триметилсилильный остаток. После остывания до комнатной температуры, пробу переносили в вialу для ГХ, выдерживали не менее 1 часа перед введением, и затем 1 мкл пробы вводили в анализатор.

Инструментальный анализ

Инструментальный анализ проводили с применением газового хроматографа 7820A (Agilent Technologies, США), соединенного с масс-спектрометрическим детектором MSD 5977 (Agilent Technologies, США) (ГХ-МС). Хроматографическое разделение проводилось с применением капиллярной хроматографической колонки Agilent HP-5MS (Agilent

Technologies, США); параметры колонки: длина – 30 м, диаметр сечения – 250 мкм, размер частиц неподвижной фазы – 0,25 мкм; параметры хроматографии: введение пробы с делением потока 5:1, газ-носитель – гелий, режим подачи газа – постоянный поток, скорость потока – 1 мл/мин, температура узла ввода – 290°C; были установлены следующие параметры термостата: начальная температура – 70°C, время выдержки – 2 мин, далее – подъем температуры до 320°C со скоростью 5°C/мин, время выдержки – 6 мин. Детектирование веществ осуществлялось с помощью одноквадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent MSD 5977; температура линии переноса – 280°C; ионизация веществ производилась с помощью электронного удара; заряд электронов – 70 эВ; диапазон сканирования масс – 50-750 Да. Одновременно, идентификация метаболитов проводилась с использованием баз данных Human Metabolome Database (HMDB; <http://www.hmdb.ca/>) и METLIN Metabolite (<https://metlin.scripps.edu/>) базы данных масс-спектров NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, Data Version: NIST v20, Software Version: 2.4).

Контроль качества

Образцы контроля качества применялись для подтверждения правильности выполнения пробоподготовки и инструментального анализа. Приготовление образцов качества проводилось при смешивании аликвот одинакового объема каждой пробы рыб вида *Danio rerio*. Подготовка проб контроля качества была идентична порядку подготовки опытных образцов. Помимо этого, для исключения эффектов переноса проб, а также группового эффекта, образцы рыб вида *Danio rerio* опытной группы и группы сравнения анализировались в произвольном порядке, а образцы контроля качества анализировались ежедневно до, в середине и после анализируемых образцов рыб вида *Danio rerio* опытной группы и группы сравнения.

Предобработка данных и создание матрицы признаков

Для проведения предварительной обработки данных, полученных при проведении нецелевого метаболомного профилирования методом ГХ-МС,

использовали программу Proteowizard software (ProteoWizard Software Foundation, CA, США). Полученные с помощью ГХ-МС хроматограммы обрабатывали с помощью программы XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>, США) с целью получения базы данных, содержащей массы фрагментов соединений, времена удерживания и интенсивности пиков. Данные были проверены на наличие пустых ячеек и признаки, в которых отсутствовало более 20% данных, были исключены из анализа. Деконволюцию и сглаживание хроматографических пиков проводили в соответствии со следующими параметрами: наклон – 2000 1/мин; порог интенсивности (20000); допустимая ошибка m/z ионов и времени удерживания – 50 мДа и 0,5 мин соответственно. Каждый признак в полученной матрице характеризовался значением m/z , временем удерживания и соответствующей интенсивностью сигнала в образце. Признаки с относительным стандартным отклонением в образцах контроля качества выше 30% удаляли из результирующей матрицы. Нормализацию выполняли с использованием изотопно-меченых стандартов. Результирующую матрицу далее конвертировали в электронную таблицу для последующего статистического анализа.

Хроматограммы образцов также были обработаны с помощью программы AMDIS (NIST, США), целью которой было сопоставление неизвестных фрагментов соединений с библиотеками масс-спектров для идентификации метаболитов в пробе. После идентификации фрагменты распознанных метаболитов были сопоставлены с данными, полученными после анализа программой SIMCA (Umetrics, Швеция). Таким образом, была сформирована база данных, содержащая интенсивности откликов различных метаболитов, которые потенциально могут статистически различаться между группами.

2.6. Целевое фармакометаболическое профилирование

Валидация методики

Валидационные характеристики разработанной методики определяли в соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик FDA, ICH [99, 127]. В процессе валидации была доказана применимость разработанной методики для количественного определения эндогенных метаболитов. Для каждого соединения оценивались критерии приемлемости, на основании которых делали вывод о пригодности разработанной методики. Пригодность методики оценивали по показателям селективности, линейности калибровочных кривых, нижнего предела количественного обнаружения (НПКО), эффекта переноса, внутри- и межсерийной прецизионности и правильности, степени извлечения, матричного эффекта и стабильности.

Дизайн эксперимента

При проведении целевого метаболического профилирования оценивались метаболические профили ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической/адренергической, холинергической систем, системы аспартата, холинергической системы, кинуренинового, индольного путей метаболизма триптофана (микробиомный путь) и концентрации прочих метаболитов, относящихся к нейротрансмиссии, чей концентрационный уровень изменился в опытной группе образцов рыб вида *Danio rerio* в ответ на воздействие диазепама или 5F-АПИНАК.

Краткосрочное и длительное воздействие диазепама

Проводили два независимых эксперимента по воздействию диазепама на метаболизм нейромедиаторов у рыб вида *Danio rerio* – краткосрочное (2,5 часа) и длительное воздействие (96 часов). В двух экспериментах по 20 мальков/икринок рыб вида *Danio rerio* переносили в лунки 6-луночного планшета, каждая из лунок содержала по 5 мл раствора ЕЗ. Первый эксперимент включал в себя воздействие растворов диазепама с различными концентрациями на мальков рыб вида *Danio rerio* возрастом 6 дпо в течение

2,5 часов. Данный эксперимент включал в себя четыре опытные группы, которые подвергались воздействию растворов диазепама с концентрациями 0,8, 1,6, 16 и 160 мкг/л в среде ЕЗ, соответственно, и группу сравнения, которая содержалась в 0,1% растворе этанола в ЕЗ. Дизайн второго эксперимента (длительное воздействие) был таким же, как и в случае краткосрочного воздействия, за исключением того, что воздействие диазепама начиналось на второй дпо и продолжалось до шестого дпо. Графическая схема дизайна эксперимента по воздействию диазепама на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения фармакометаболических исследований представлена на Рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн проведения фармакометаболических исследований воздействия диазепама на рыб вида *Danio rerio*

Краткосрочное и длительное воздействие 5F-АПИНАК²

Проводили два независимых эксперимента по воздействию 5F-АПИНАК на метаболизм нейромедиаторов у рыб вида *Danio rerio* – краткосрочное (4 часа) и длительное воздействие (96 часов). В двух экспериментах по 20 мальков/икринок рыб вида *Danio rerio* переносили в лунки 6-луночного планшета, каждая из лунок содержала по 5 мл раствора ЕЗ.

² Исследование выполнено на базе отделения судебной медицины департамента диагностики и общественного здравоохранения Университета Вероны, Италия

Первый эксперимент включал в себя воздействие растворов 5F-АПИНАК с различными концентрациями на мальков рыб вида *Danio rerio* возрастом 6 дпо в течение 4 часов. Данный эксперимент включал в себя пять опытных групп, которые подвергались воздействию растворов 5F-АПИНАК с концентрациями 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 и 10 мкМ в среде ЕЗ, соответственно, и группу сравнения, которая содержалась в 0,1% растворе ДМСО в ЕЗ. Дизайн второго эксперимента (длительное воздействие) был таким же, как и в случае краткосрочного воздействия, за исключением того, что воздействие 5F-АПИНАК начиналось на второй дпо и продолжалось до шестого дпо. Графическая схема дизайна эксперимента по воздействию 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения фармакометаболических исследований представлена на Рисунке 3.

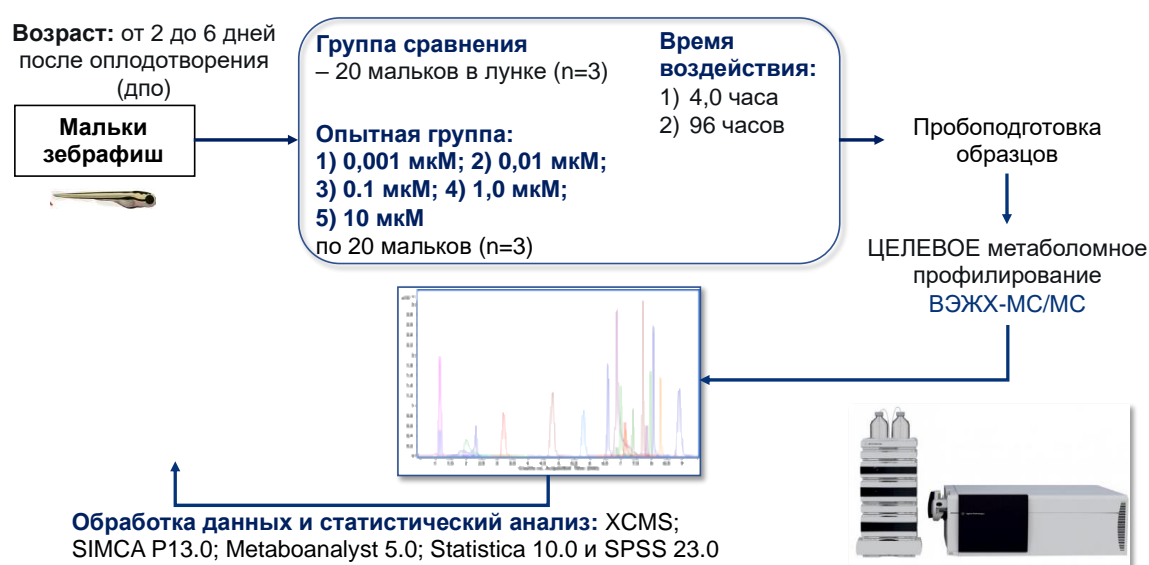


Рисунок 3 – Дизайн проведения фармакометаболических исследований воздействия 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio*

Подготовка биологических проб

При определении метаболомных профилей ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической/адренергической, холинергической системы и системы аспартата, кинуренинового, индольного путей метаболизма триптофана (микробиомный путь) и прочих метаболитов,

относящихся к нейротрансмиссии, пробоподготовка мальков рыб вида *Danio rerio* проводилась по следующей методике: в микропробирки объемом 1,5 мл мальков рыб вида *Danio rerio* переносили пипеткой Пастера. Далее водную фазу отделяли и немедленно добавляли 10 мкл 13 мМ холодного раствора натрия метабисульфита с целью предотвращения окисления метаболитов и эвтаназии мальков. Далее добавляли 10 мкл смеси внутренних стандартов, перемешивали на вортексе. Затем добавляли 450 мкл холодного метанола с целью осаждения белков и предотвращения окисления метаболитов, встряхивали на вортексе в течение 20 секунд и помещали в ультразвуковую баню, наполненную льдом, на 15 минут с целью экстракции метаболитов, и дополнительного осаждения белков. Полученную взвесь встряхивали на вихревом встряхивателе и центрифугировали в охлаждаемой до 4°C центрифуге при 16,900 об/мин в течение 5 минут. Далее по 200 мкл супернатанта переносили в две микропробирки и упаривали досуха при нагревании и пониженном давлении.

Для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа полученный сухой остаток перерастворяли в 50 мкл 50% метанола в 0,02% растворе аскорбиновой кислоты в воде с целью уменьшения окисления метаболитов, переносили в вials для ВЭЖХ и 2 мкл полученного раствора вводили в анализатор.

Инструментальный анализ

Хроматографическое разделение проводили с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1290 II Infinity, оснащенного колонкой Discovery HS F5-3 PFP длиной 150 мм, диаметр сечения – 2,1 мм, размер частиц неподвижной фазы – 3 мкм; температура термостата колонки – 45°C; поток подвижных фаз – градиентный; подвижные фазы: А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде деионизированой, В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Градиент подвижных фаз представлен в Таблице 2.

Детектирование метаболитов проводилось в режиме MRM (multiple reaction monitoring mode, мониторинг множественных реакций) с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6470

Triple Quad, оснащенного электроспрейным источником ионизации. Параметры масс-спектрометра: вольтаж капилляра – 1,5 кВ, температура источника – 150°C, осушающий газ – азот, температура осушающего газа – 300°C, поток осушающего газа – 900 л/ч.

Таблица 2 – Градиент растворителей ВЭЖХ-МС/МС анализа

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% подвижной фазы	
		А	В
0	0,4	90	10
4	0,4	90	10
9	0,4	10	90
10	0,4	10	90
10,10	0,4	90	10
12	0,4	90	10

Определяемые массы родительских и дочерних ионов, энергия соударения, напряжение на фрагментаторе и время удерживания веществ на колонке были оптимизированы для каждого вещества в отдельности. Разработанная методика была валидирована согласно руководствам по валидации биоаналитических методик Европейского агентства лекарственных средств и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

2.7. Поведенческий анализ³

Дизайн эксперимента

Мальки рыб вида *Danio rerio* подвергались воздействию широкого концентрационного диапазона доз 5F-АПИНАК (0,001–10 мкМ в среде E3). Изначально вещество растворяли в ДМСО и далее приводили к рабочим концентрациям последовательным растворением в среде для содержания эмбрионов E3 (конечная концентрация ДМСО – 0,1%).

Группа сравнения мальков рыб вида *Danio rerio* подвергалась воздействию только раствора-носителя (0,1% ДМСО в E3). Мальки рыб вида *Danio rerio* возрастом 5 дпо помещали в 96-луночный планшет (1 малек на лунку). Исследуемое вещество вносили на шестой дпо в 11 часов утра.

Двигательная активность мальков рыб вида *Danio rerio* регистрировалась в течение двух дней (48 часов). Данный тест позволил определить как острый ответ на введение вещества, так и долгосрочное влияние на двигательную активность мальков рыб вида *Danio rerio*. Двигательную активность регистрировали на видео со скоростью 25 кадров в секунду при постоянной подсветке инфракрасным светом с использованием высокопроизводительной системы видеотрекинга DanioVision (Noldus, Нидерланды). В качестве источника света использовали матрицу из белых светодиодных ламп с интенсивностью освещения 0,17 Вт/м². Активность каждой рыбы вида *Danio rerio* рассчитывали как общее расстояние, пройденное за 10 минут. Графическая схема дизайна эксперимента по воздействию 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения анализа поведенческих изменений представлена на Рисунке 4.

³ Исследование выполнено на базе отделения судебной медицины департамента диагностики и общественного здравоохранения Университета Вероны, Италия

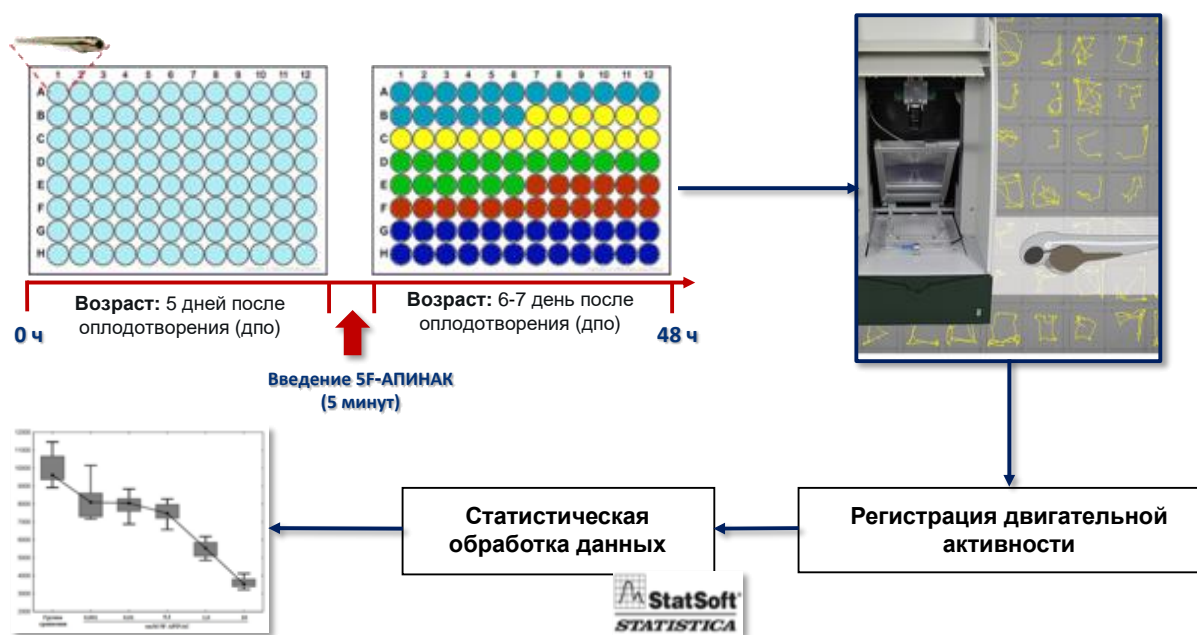


Рисунок 4 – Дизайн эксперимента по воздействию 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* с целью проведения анализа поведенческих изменений

2.8. Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка данных поведенческого анализа, поиск корреляций и определение ЛК₅₀

Статистическая обработка данных поведенческого анализа проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с постобработкой (post-hoc анализ) тестом Тьюки. Для поиска корреляций между исследуемыми метаболитами и поведенческими изменениями применяли параметрический метод Пирсона. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Statsoft, США). Показатели ЛК₅₀ рассчитывались методом пробит-регрессии с построением регрессионных моделей. Пробит-анализ проводили с помощью программного обеспечения SPSS 23.0 (SPSS Inc, США).

Нецелевое метаболомное профилирование

При выполнении нецелевого метаболомного профилирования данные логарифмировали, центрировали, применяли Парето шкалирование и загружали в программное обеспечение SIMCA-P, версия 13.0 (Umetrics,

Швеция) для дальнейшего выделения наиболее изменившихся метаболитов и их статистической обработки. Значимость переменной в проекции (variance importance in the projection score – VIP score) отражает важность переменной в дискриминантном анализе как корреляций с откликами, а также важность в проекции. Данный анализ в совокупности с S-plot анализом позволяет установить самые важные (а, следовательно – потенциально статистически значимые) метаболиты в исследовании. Признаки, имеющие VIP score больше единицы, были отобраны для дальнейшего статистического анализа.

Для оценки тренда двух рассматриваемых групп (опытной и сравнения) и исключения выбросов применяли метод главных компонент (principal component analysis, PCA). Далее для установления признаков, наиболее полно отражающих различия двух групп, применяли метод дискриминантного анализа ортогональных проекций на скрытые структуры (orthogonal projections to latent structures – discriminant analysis, OPLS-DA), на основе которого строили S-plot. Для выделенных признаков далее рассчитывали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни в зависимости от нормальности распределения данных в целях отбора тех признаков, для которых значение p -value было ниже 0,05.

Далее, с помощью онлайн-платформы Metaboanalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>, Канада) был проведен анализ обогащения метаболомной базы данных (metabolite set enrichment analysis) с целью идентификации метаболических путей, концентрации метаболитов в которых наиболее сильно отличаются среди групп. Идентификация метаболических путей, метаболиты которых наиболее сильно отличаются среди групп, позволяет сформировать панель метаболитов для целевого фармакометаболомного анализа.

Целевое фармакометаболомное профилирование

Менее 4% данных, полученных с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, представляли собой выбросы. Выбросы данных определялись как наблюдения, превышающие значение 75-го перцентиля + 3 межквартильных

размаха. Эти значения были заменены методом винсоризации, то есть заменены на значение, равное 75-му перцентилю + 1,5 межквартильного размаха. Нормальность распределения метаболитов была определена с помощью теста Шапиро-Уилка. Большая часть данных представляла собой ненормальное распределение. Для нормализации данных были использованы различные методы (лог-трансформация, извлечение кубического корня). Для определения метаболитов, статистически различающихся между группами, был использован метод дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса в случае ненормального распределения данных. Данный метод представляет информацию о метаболитах, различающихся во всем массиве исследуемых групп, но не дает представления о том, между какими группами имеются статистические различия, поэтому после метода дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса была проведена постобработка данных (post-hoc анализ) с помощью теста Данна для множественных сравнений. Для нормально распределенных данных использовался параметрический аналог дисперсионного анализа (ANOVA) с постобработкой данных методом Тьюки. Статистический анализ проводился с помощью программ Statistica 10.0 (Statsoft, США) и SPSS 23.0 (SPSS Inc, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

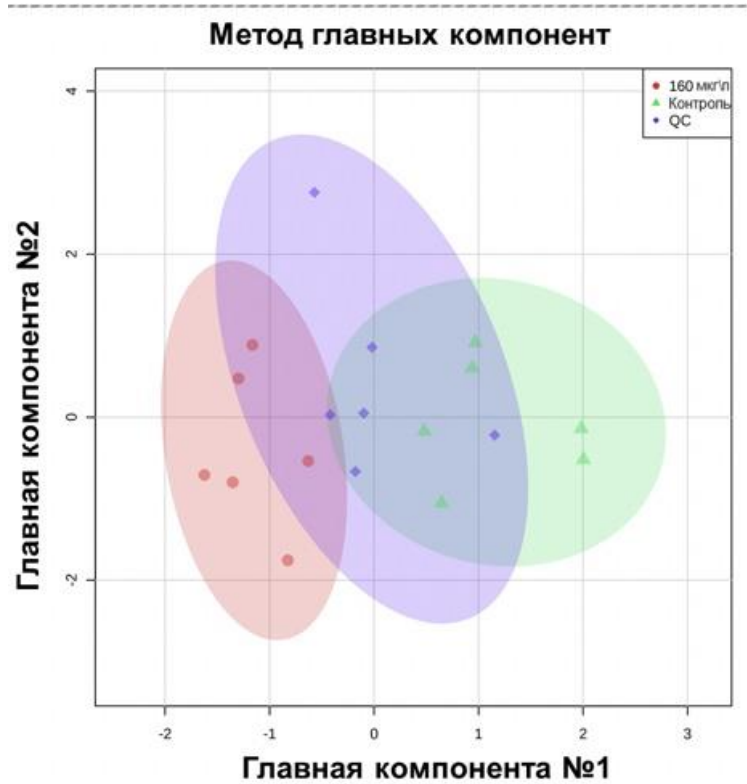
3.1. Нецелевое метаболомное профилирование мальков рыб вида *Danio rerio* после воздействия диазепама

Нецелевое метаболомное профилирование методом ГХ-МС проводилось для идентификации целевой панели эндогенных метаболитов, необходимой для изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия фармакометаболомными методами, используя рыб вида *Danio rerio* в качестве модельного организма. Для проведения нецелевого метаболомного профилирования были отобраны пробы рыб вида *Danio rerio* опытной группы, подвергавшихся воздействию раствора диазепама в концентрации 160 мкг/л, и контрольной группы. При проведении предварительных скрининговых работ по установлению состава метаболома рыб вида *Danio rerio* при нецелевом профилировании было обнаружено 1356 признаков. С целью установления значимых метаболитов был проведен анализ методом главных компонент (PCA) и дискриминантный анализ ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA).

Метод главных компонент показал наличие переменных, способных отличить опытную группу от группы сравнения (Рисунок 5А). Согласно данным OPLS-DA (Рисунок 5Б), описанная вариабельность групп в обучающей модели (R²) составила 0,91, что говорит о наличии статистически значимых компонент, позволяющих разделить группы в модели. Вариабельность групп в тест-модели (Q²) составила 0,63, что говорит о высокой предиктивной силе набора данных и обучающей модели. В целом, анализ данных показал удовлетворительное разделение опытной группы и группы сравнения, а также образцов контроля качества, что указывает на высокую воспроизводимость метода.

График S-plot указал на потенциально статистически значимые компоненты в модели OPLS-DA, которые могут быть использованы для разделения образцов опытной и контрольной группы (Рисунок 6).

(А)



(Б)

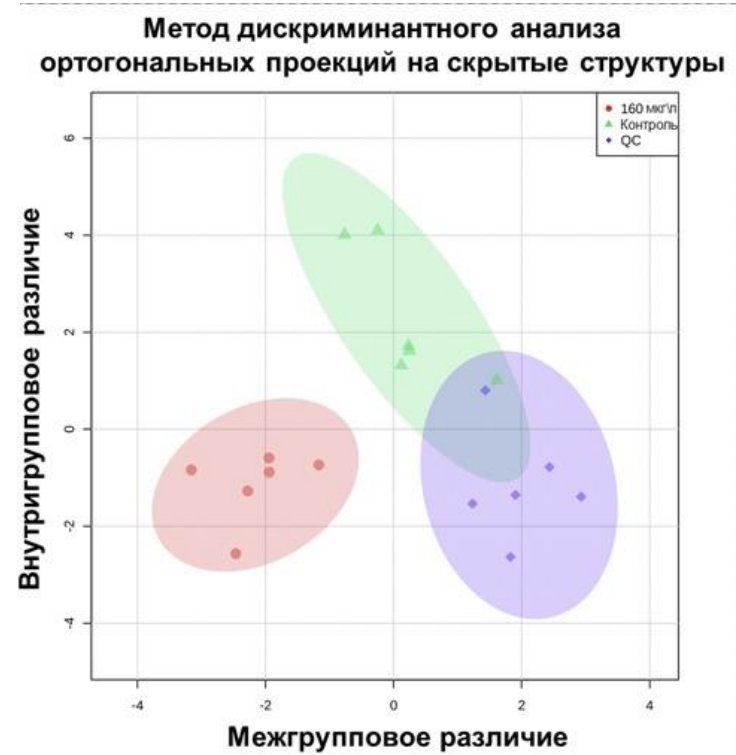


Рисунок 5 – Распределение исследуемых групп с помощью метода главных компонент (PCA) (А). Пересечение областей показывает возможность сравнения исследуемых групп для дальнейшего анализа. Диаграмма метода дискриминантного анализа ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA) (Б).

Легенда: «Контроль» – группа сравнения, «160 мкг/л» – опытная группа и «QC» – группа контроля качества.

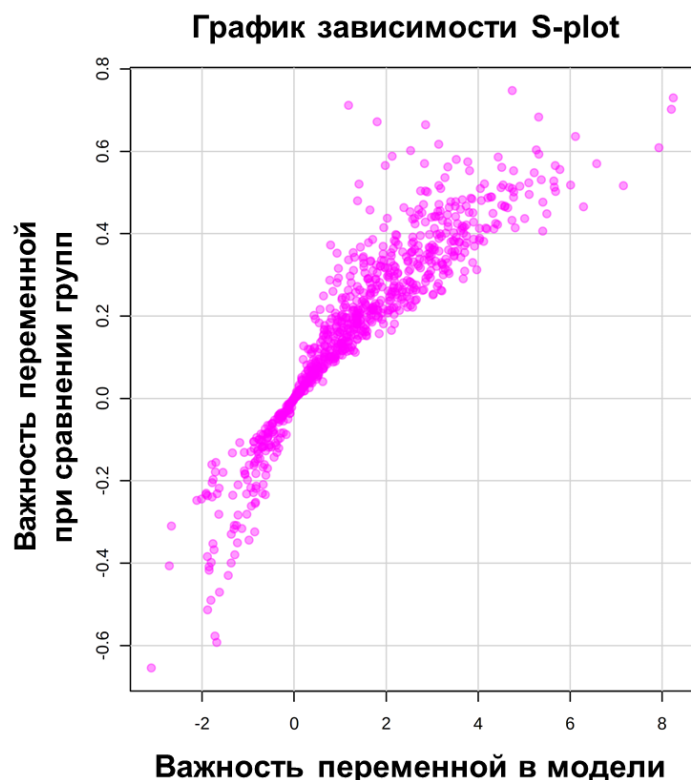
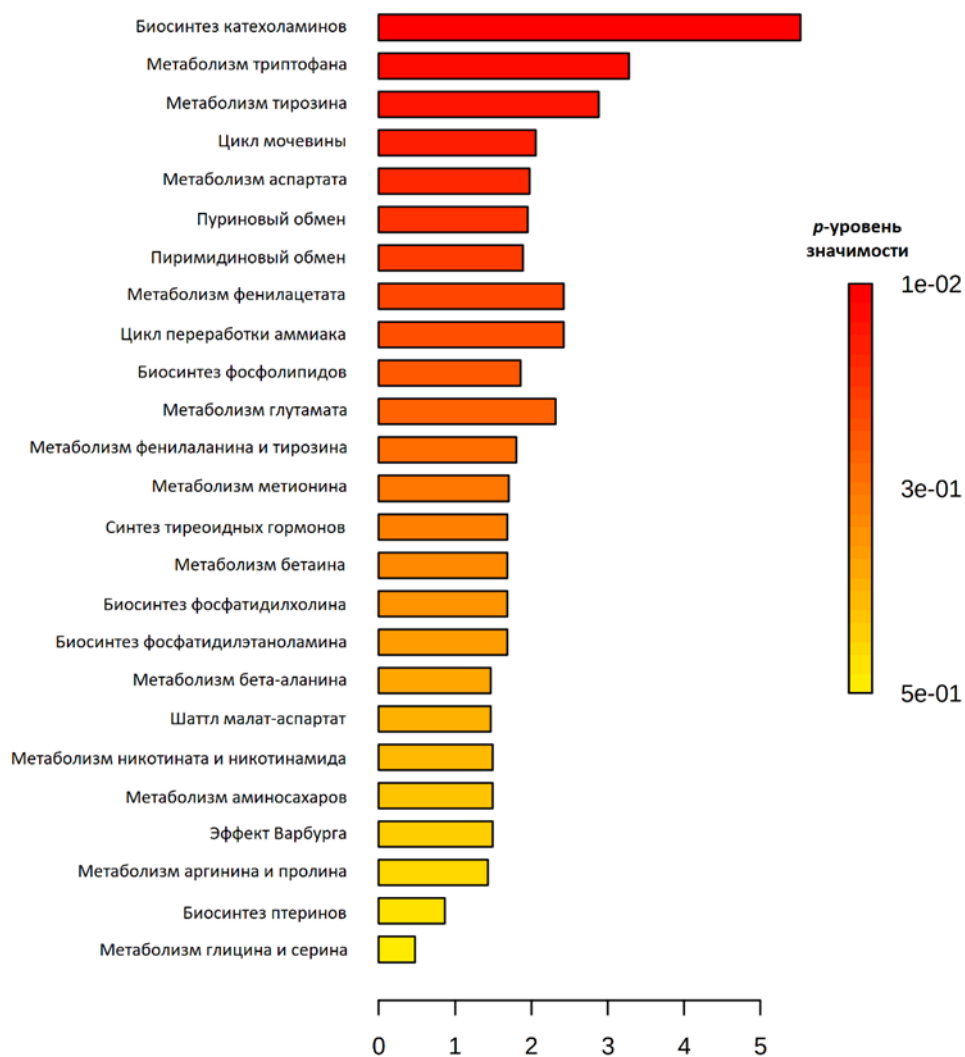


Рисунок 6 – S-plot, сформированный на основе дискриминантного анализа ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA) метаболома образцов проб рыб вида *Danio rerio* опытной и контрольной группы

На основе полученных данных были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между метаболомными профилями значимых метаболитов (признаков) опытной и контрольной группы. На основе выявленных метаболитов, значительно изменившихся в ответ на воздействие диазепама на рыб вида *Danio rerio*, были определены ассоциированные с ними двадцать пять метаболических путей (Рисунок 7).

Полученные результаты показали, что основные метаболические пути, концентрации метаболитов которых значительно изменялись после воздействия диазепама на рыб вида *Danio rerio*, включали в себя биосинтез катехоламинов, метаболизм триптофана и метаболизм тирозина (Таблица 3). Исходя из результатов, можно заключить, что введение диазепама привело к изменению концентраций эндогенных веществ, функцией которых является передача нервного импульса в ЦНС.



По оси абсцисс – соотношение силы обогащения базы данных метаболическим путем. По оси ординат – метаболические пути.

Рисунок 7 – Диаграмма анализа обогащения метаболомной базы данных

Таблица 3 – Метаболические пути, ассоциированные с воздействием диазепама на рыб вида *Danio rerio*

Метаболические пути	Знач. p -value*	Метаболиты	Изменение
Биосинтез катехоламинов	0,013	Дофамин	↓
		Норадреналин	↑
		Тирозин	↑
		L-ДОФА	↓

Продолжение Таблицы 3.

Метаболизм триптофана	0,081	Триптофан	↑
		Серотонин	↑
		Кинуренин	↓
Метаболизм тирозина	0,097	Тирозин	↑
		Гомогентизиновая кислота	
		L-Аспарагиновая к-та	
Цикл мочевины	0,202	Аргинин	↑
		Цитруллин	
Метаболизм аспартата	0,217	L-Аспарагиновая к-та	↑
		L-глутаминовая кислота	↑
Пуриновый обмен	0,235	Гуанин	↓
		Инозин	
Пиримидиновый обмен	0,246	Уридин	↓
		Цитидин	
Метаболизм фенилацетата	0,251	Фенилуксусная кислота	↓
		L-глутаминовая кислота	↑
Цикл переработки аммиака	0,269	L-Серин	↑
		L-Аспарагиновая к-та	↑
		Кетоглутаровая кислота	↑
		Глицин	↓
Биосинтез фосфолипидов	0,272	Пальмитиновая кислота	↑
Метаболизм глутамата	0,273	Гамма-аминомасляная кислота	↓
		L-цистеин	↑
		L-аспарагиновая кислота	↑
Метаболизм фенилаланина и тирозина	0,280	Тирозин	↑
		Фенилаланин	
		Кетоглутаровая кислота	
Метаболизм метионина	0,281	L-метионин	↓
Синтез тироидных гормонов	0,296	Тирозин	↑
Метаболизм бетаина	0,306	Аденозин	↑
		L-метионин	↓
Биосинтез фосфатидилхолина	0,315	Цитидин	↓
		Этаноламин	↑
Биосинтез фосфатидилэтаноламина	0,315	Цитидин	↓
		Этаноламин	↑
Метаболизм бета-аланина	0,324	Аланин	↑
Шаттл малат-аспартат	0,335	Яблочная кислота	↓
		Аспаргиновая кислота	
Метаболизм никотина и никотиамида	0,384	L-глутаминовая кислота	↑
		Никотинамид	
Метаболизм аминсахаров	0,421	D-фруктоза	↓
Эффект Варбурга	0,457	Янтарная кислота	↑

Продолжение Таблицы 3.

Метаболизм аргинина и пролина	0,469	Аргинин	↑
Биосинтез птеринов	0,478	Неоптерин	↑
Метаболизм глицина и серина	0,512	Глицин	↓

* *P-value* отражает вклад метаболитов в метаболический путь. Значение *P-value* были рассчитаны на основе числа метаболитов, входящих в соответствующий метаболический путь.

Таким образом, с целью изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия с использованием рыб вида *Danio rerio* как модельного организма, на основании нецелевого фармакометаболического анализа в целевую панель метаболитов были включены метаболиты дофаминергической/адренергической и серотонинергической систем. Также в целевую панель метаболитов были включены метаболиты основных систем нейрональной передачи, а именно: ГАМКергической, холинергической и системы аспартата [121]. Также в целевую панель были включены эндогенные вещества сопутствующих метаболических путей, которые могут оказывать воздействие на метаболизм нейромедиаторов. Такими метаболическими путями являются: кинурениновый путь метаболизма триптофана, в процессе которого триптофан метаболизируется в организме на 95% [216]; индоловый (микробиомный) путь метаболизма триптофана, метаболиты которого могут оказывать влияние на ЦНС макроорганизма [125]; биоптерин и неоптерин, являющиеся производными кофактора фермента, ответственного за синтез нейромедиаторов-моноаминов [120]; кортизол как один из главных эндогенных метаболитов-биомаркеров стресса [237].

3.2. Разработка и валидация методики количественного определения нейромедиаторов и веществ, связанных с нейротрансмиссией

В процессе валидации была доказана применимость разработанной методики для количественного определения эндогенных метаболитов. Ниже приведены результаты валидации методики количественного определения нейромедиаторов и веществ, связанных с нейротрансмиссией, методом ВЭЖХ-МС/МС.

3.2.1. Параметры МС/МС переходов исследуемых веществ и селективность

С помощью хромато-масс-спектрометрического анализа индивидуальных растворов исследуемых веществ и внутренних стандартов были установлены характеристические МС/МС параметры исследуемых веществ и внутренних стандартов, проведена оптимизация параметров ионизации исследуемых веществ и внутренних стандартов, а также установлены времена удерживания исследуемых веществ и внутренних стандартов на хроматографической колонке. Результаты установления параметров сканирования исследуемых веществ и внутренних стандартов представлены в Таблицах 4 и 5.

Селективность разработанной методики оценивали путем анализа интерференции в холостых образцах, которые сравнивали с образцами контроля качества с содержанием в них исследуемого анализа, равным нижнему пределу его количественного определения (на уровне НПКО). Для оценки селективности использовали 6 холостых образцов (5% раствор бычьего сывороточного альбумина в 0,9% растворе NaCl в воде).

Селективность разработанной методики считали приемлемой для дифференцированной оценки исследуемого анализа в присутствии компонентов холостого образца и/или других компонентов исследуемых биологических образцов, в том случае, если в исследуемых холостых образцах

отсутствовали интерферирующие пики с временем удерживания, характерным для исследуемого аналита. В холостых образцах допускалось наличие незначительной интерференции, при условии, что сигнал интерферирующего пика составлял не более 20% от нижнего предела количественного определения (уровень НПКО) для исследуемого аналита.

Таблица 4 – Параметры сканирования веществ методом ВЭЖХ-МС/МС

Соединение	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Фрагментатор (В)	Энергия соударения (В)	Время удерживания (мин)	Полярность
4-аминомасляная кислота	104	87	90	10	1,2	Положительная
		69	90	15		
5-гидрокситриптофан	221	162	90	20	3,8	Положительная
		160	90	20		
Ацетилхолин	146	87	90	15	3,8	Положительная
		60	90	10		
		43	90	30		
Анраниловая кислота	138	120,1	95	10	6,2	Положительная
		92	95	20		
Аспарагин	133	87	100	10	1,0	Положительная
		74	100	20		
Аспарагиновая кислота	134	88	100	10	1,0	Положительная
		74	100	15		
Биоптерин	238	194	90	20	1,9	Положительная
		178	90	20		
Холин	104	60	90	20	1,2	Положительная
Цитруллин	176	113,1	90	20	1,1	Положительная
		70,1	90	30		
Кортизол	363	327	120	10	7,3	Положительная
		121	120	20	7,3	
		132,1	95	30		

Продолжение Таблицы 4.

Дофамин	154	91	90	30	1,7	Положительная
		137	90	10		
	137	91	90	10		
Адреналин	184	166	90	5	1,9	Положительная
		151	90	25		
	166	151	110	20		
Глутаминовая кислота	148	84	100	15	1,0	Положительная
		56	100	30		
Глутамин	147	130	100	10	2,0	Положительная
		84	100	15		
5-гидроксииндоуксусная кислота	192	146	100	20	5,9	Положительная
Индоуксусная кислота	176	130	95	20	7,1	Положительная
Индолакриловая кислота	188	170	100	20	7,4	Положительная
		115	100	25		
Индолмасляная кислота	204	144	100	25	7,7	Положительная
		130	100	25		
Индол-3-карбоксальдегид	146	118	95	15	7,2	Положительная
		91	95	30		
Индолмолочная кислота	206	118	95	22	6,8	Положительная
Индолпропионовая кислота	190	130	95	20	7,5	Положительная
Кинуреновая кислота	190	144	95	20	7,8	Положительная
Кинуренин	209	146	95	30	3,3	Положительная
		94	95	10		

Продолжение Таблицы 4.

Метанефрин	198	180	90	5	3,5	Положительная
L-диоксифенилаланин	198	181	100	10	1,9	Положительная
		152	100	10		
Неоптерин	254	206,1	100	20	1,3	Положительная
		190,1	100	20		
Пиколиновая кислота	124	78,1	90	20	1,7	Положительная
		53,1	90	20		
Норадреналин	170	152	90	5	1,4	Положительная
	152	107	110	20		
Норметанефрин	166	134	100	15	2,3	Положительная
Фенилаланин	166	120	100	15	3,8	Положительная
Хинолиновая кислота	168	106,1	95	15	3,2	Положительная
		78,1	95	30		
Серотонин	160	132	120	20	3,5	Положительная
		105	120	30		
Триптамин	161	144,1	95	10	6,3	Положительная
		115,1	95	30		
Триптофан	205	188	100	10	5,2	Положительная
		146	100	20		
Тирозин	182	165	90	5	2,5	Положительная
		136	90	10		
Ксантуреновая кислота	206	160	95	20	7,6	Положительная

Таблица 5 – Параметры сканирования изотопно-меченых веществ методом ВЭЖХ-МС/МС

Соединение	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Фрагментатор (В)	Энергия соударения (В)	Время удерживания (мин)	Полярность	Концентрация в пробе (нг/мл)
4-аминомасляная кислота-d6	110	93	90	10	1,2	Положительная	200
		73	90	15			
Дофамин-d4	158	123	90	10	1,7	Положительная	20
		95	90	30			
5-гидроксииндолуксусная кислота-d5	197	150	100	20	5,9	Положительная	20
Индол-3-уксусная кислота-d4	180,1	133	95	20	7,1	Положительная	20
Индол-3-масляная кислота-d4	208	132	100	25	7,7	Положительная	200
Индол-3-карбоксальдегид- $^{13}C_8$	154	126	95	30	7,2	Положительная	20
		98	95	30			
Индол-3-молочная кислота-d5	211	122	95	22	6,8	Положительная	200
Индол-3-пропионовая кислота-d2	192	130	95	20	7,5	Положительная	200

Продолжение Таблицы 5.

Кинуреновая кислота-d5	195	149	95	30	7,8	Положительная	20
Кинуренин-d4	213	98	95	10	3,3	Положительная	200
Триптофан-d5	208	164	100	15	5,2	Положительная	20000
		120	100	15			
Норметанефрин-d3	187	137	100	15	2,3	Положительная	20
Хинолиновая кислота-d3	171	109	95	15	3,2	Положительная	200
		81	95	30			
Серотонин-d4	181	164	90	7	3,5	Положительная	200
		136	120	20			
Ксантуреновая кислота-d4	210	164	95	20	7,6	Положительная	20
		136	95	30			
Неоптерин- ¹³ C5	259,1	211	100	20	1,3	Положительная	20
Кортизол-d4	367	331	120	10	7,3	Положительная	20

Анализ данных, полученных в результате оценки холостых образцов, не выявил наличия существенных интерферирующих пиков с временем удерживания, соответствующим исследуемым анализам. Хроматограммы холостых образцов, образцов контроля качества и внутренних стандартов представлены в Таблице 6.

3.2.2. Линейность калибровочных кривых и нижний предел количественного обнаружения

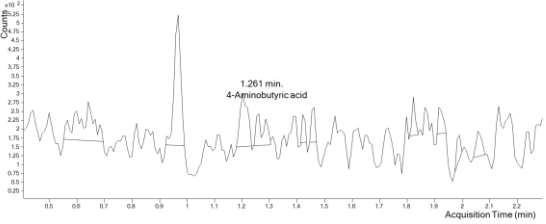
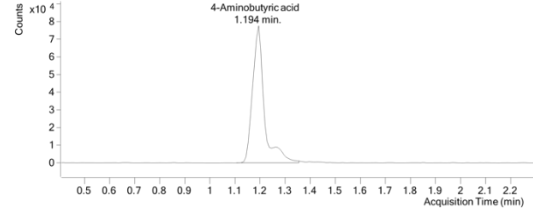
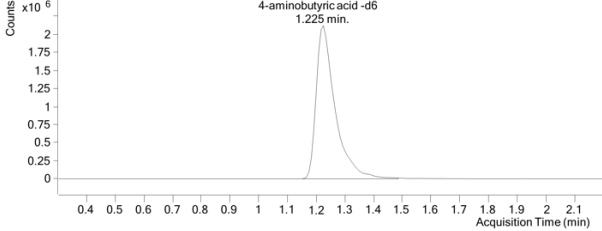
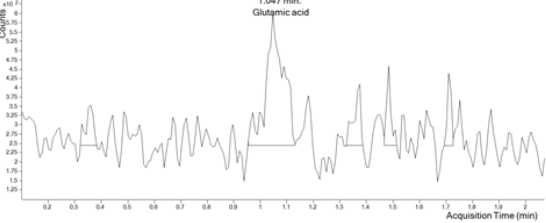
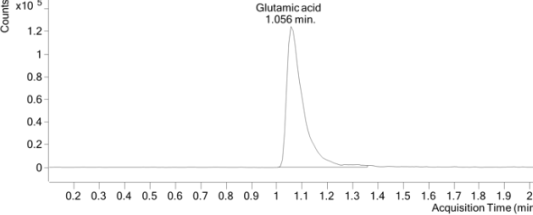
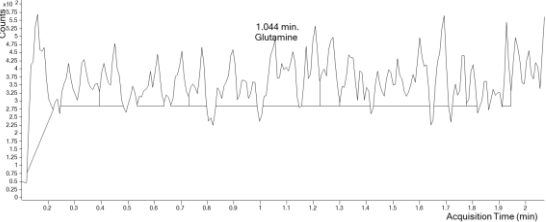
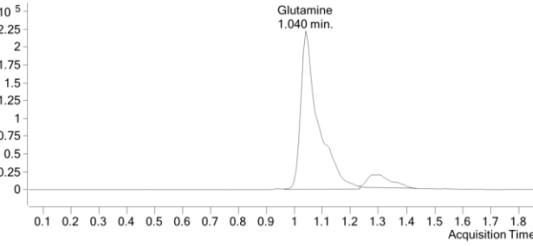
Для описания зависимости отклика хромато-масс-спектрометрической системы от концентрации исследуемого анализа в образце строили калибровочные кривые с использованием свежеприготовленных калибровочных стандартов (калибраторов). Для приготовления калибраторов использовали холостые образцы, к которым добавляли известные концентрации исследуемых анализов.

Калибровочный график строили на основе анализа 6-ти калибраторов, каждый из которых анализировали в 3-х сериях. При приготовлении калибраторов стремились к тому, чтобы они не только охватывали весь диапазон ожидаемых концентраций исследуемого анализа в исследуемых биологических образцах, но и были равномерно распределены по нему.

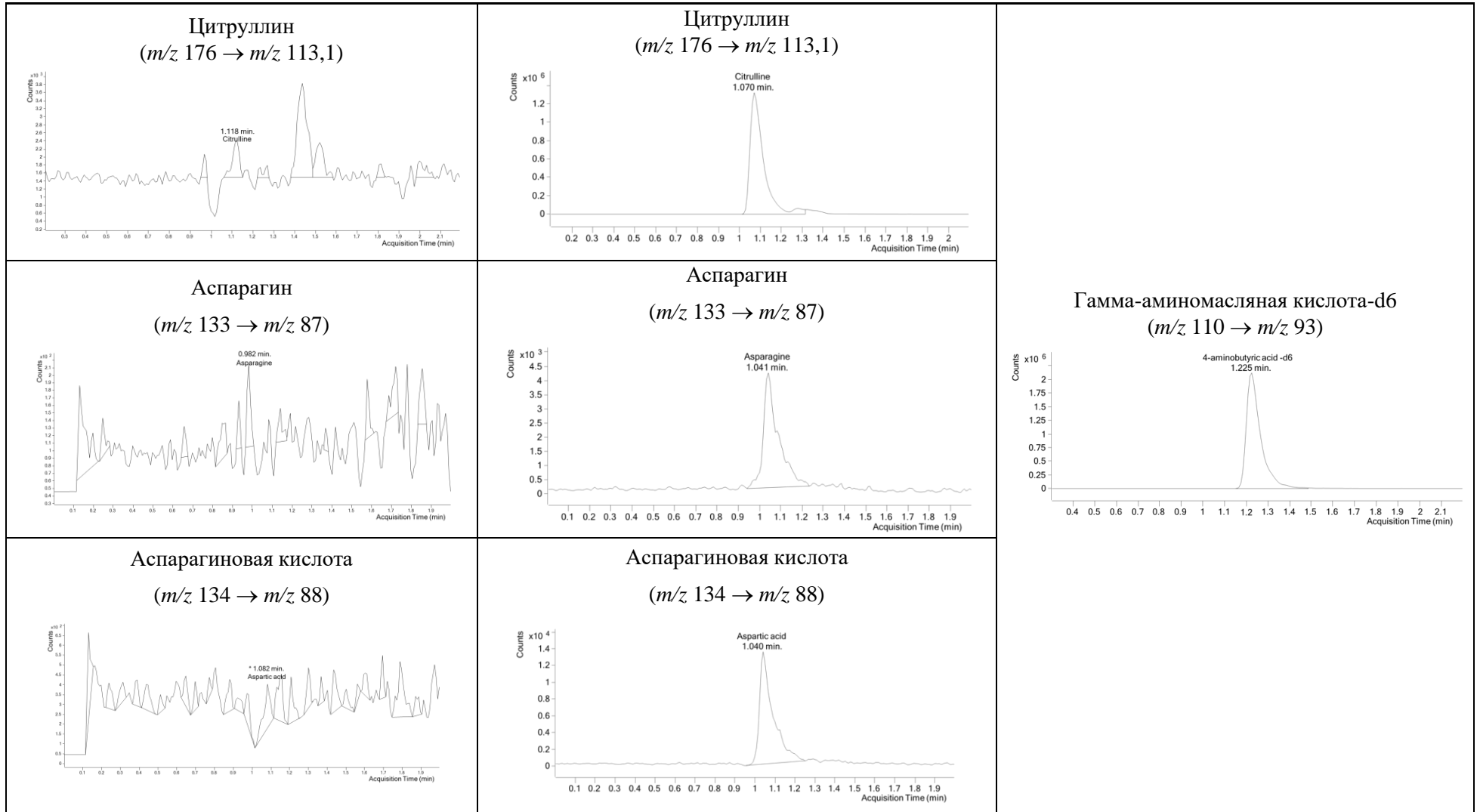
Для описания параметров калибровочных графиков применяли взвешенную линейную модель (weighted linear regression), построенную методом наименьших квадратов в координатах: Y – площадь хроматографического пика исследуемого анализа; X – концентрация исследуемого анализа в калибраторе.

Приемлемость калибровочной модели устанавливали на основе анализа калибровочных графиков, полученных в 3-х аналитических циклах. Для каждого калибровочного графика определяли угловой коэффициент (slope), свободный член (intercept) и коэффициент детерминации (R^2).

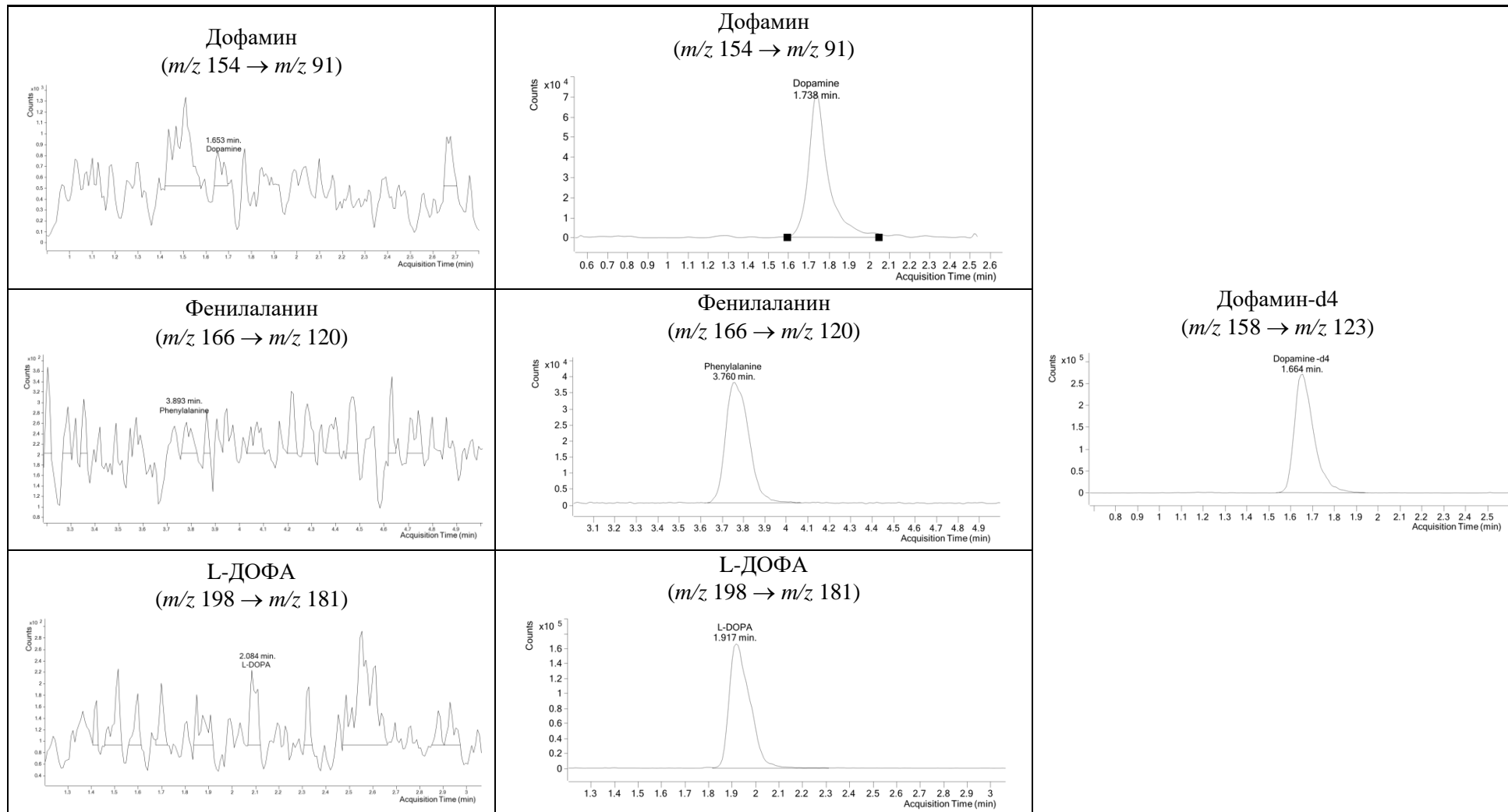
Таблица 6 – Масс-хроматограммы холостых образцов, образцов контроля качества и внутренних стандартов

Хроматограмма холостого образца	Хроматограмма образца контроля качества	Внутренний стандарт
<p style="text-align: center;">Гамма-аминомасляная кислота (m/z 104 \rightarrow m/z 87)</p> 	<p style="text-align: center;">Гамма-аминомасляная кислота (m/z 104 \rightarrow m/z 87)</p> 	<p style="text-align: center;">Гамма-аминомасляная кислота-d6 (m/z 110 \rightarrow m/z 93)</p> 
<p style="text-align: center;">Глутаминовая кислота (m/z 148 \rightarrow m/z 130)</p> 	<p style="text-align: center;">Глутаминовая кислота (m/z 148 \rightarrow m/z 130)</p> 	
<p style="text-align: center;">Глутамин (m/z 147 \rightarrow m/z 130)</p> 	<p style="text-align: center;">Глутамин (m/z 147 \rightarrow m/z 130)</p> 	

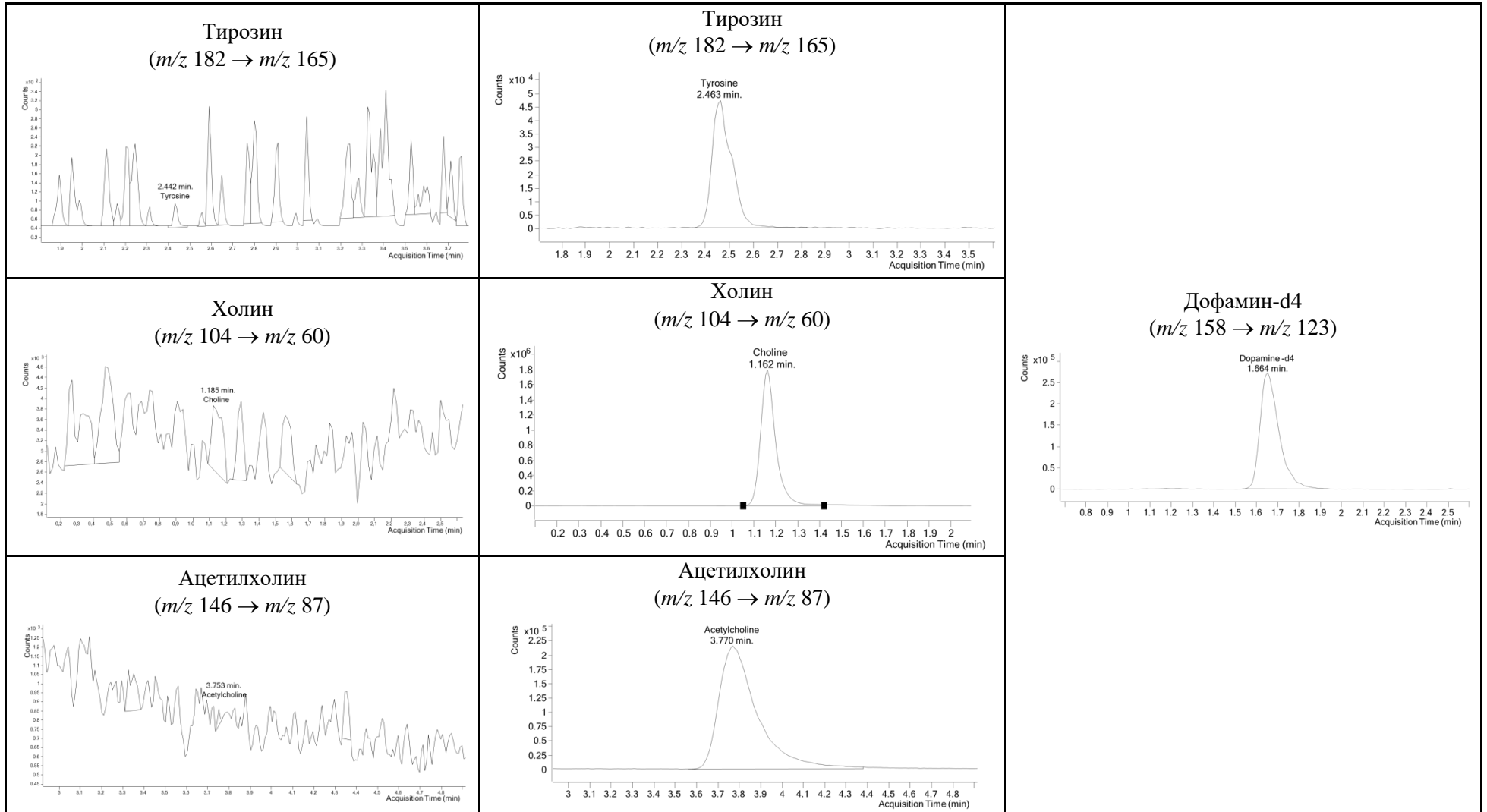
Продолжение Таблицы 6.



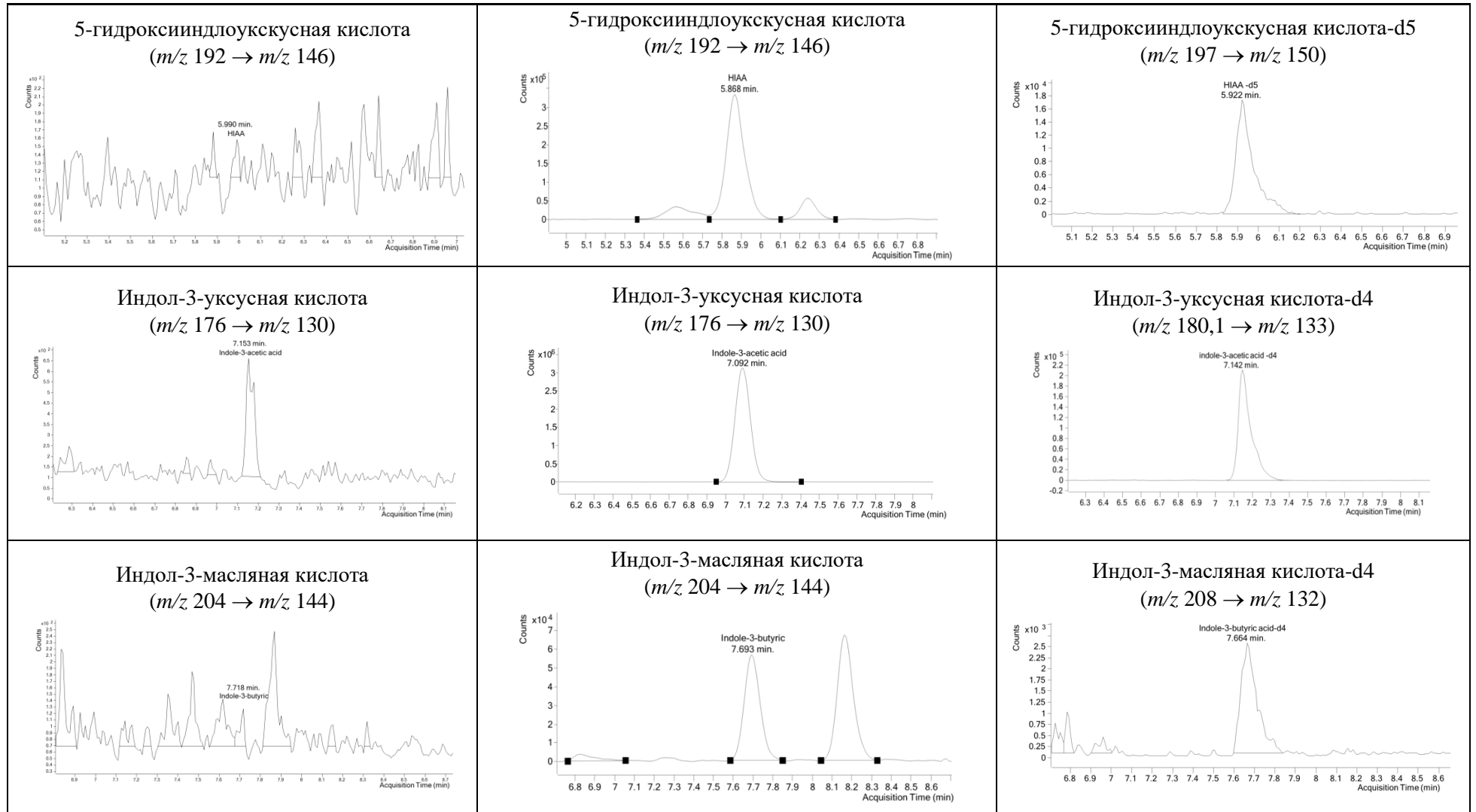
Продолжение Таблицы 6.



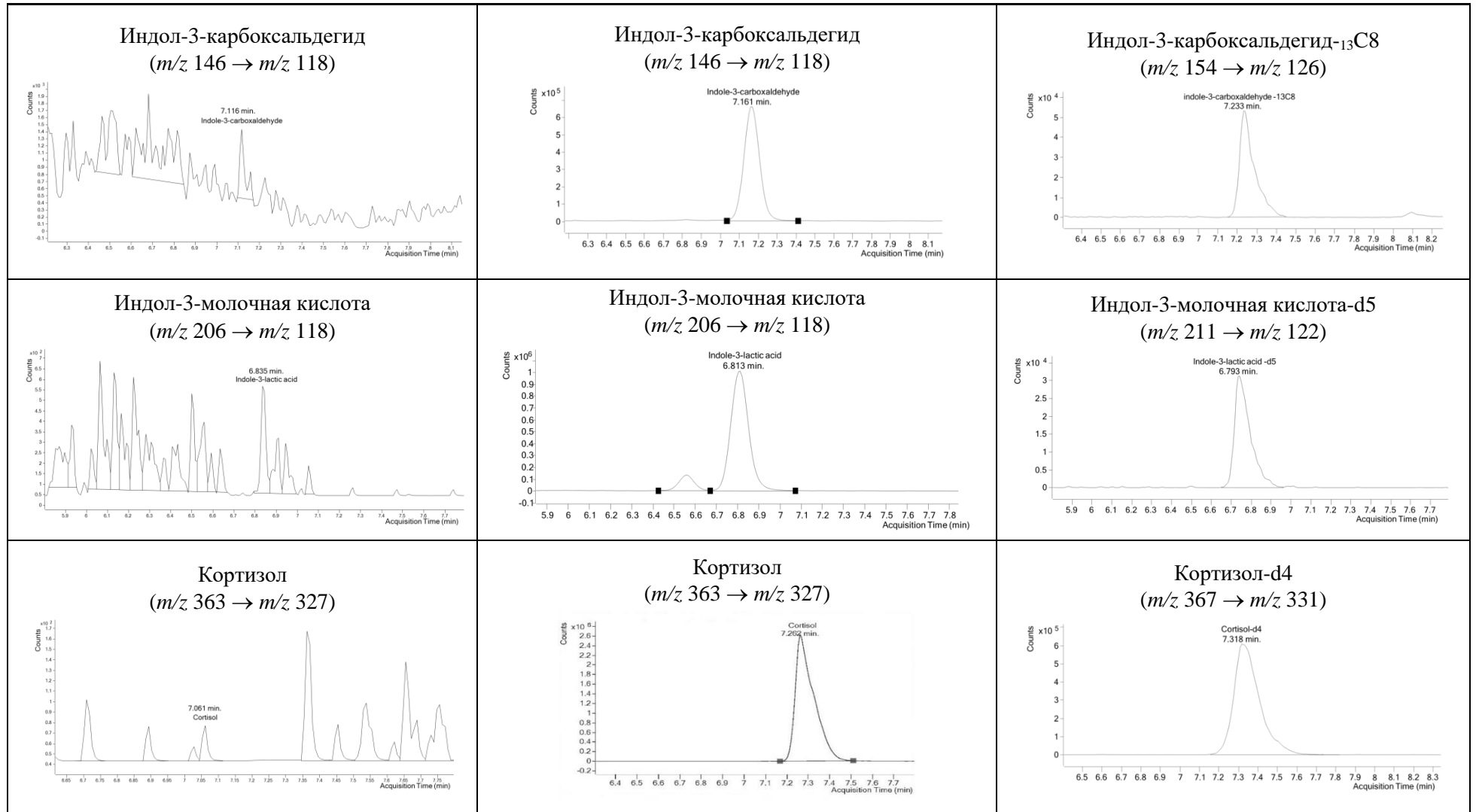
Продолжение Таблицы 6.



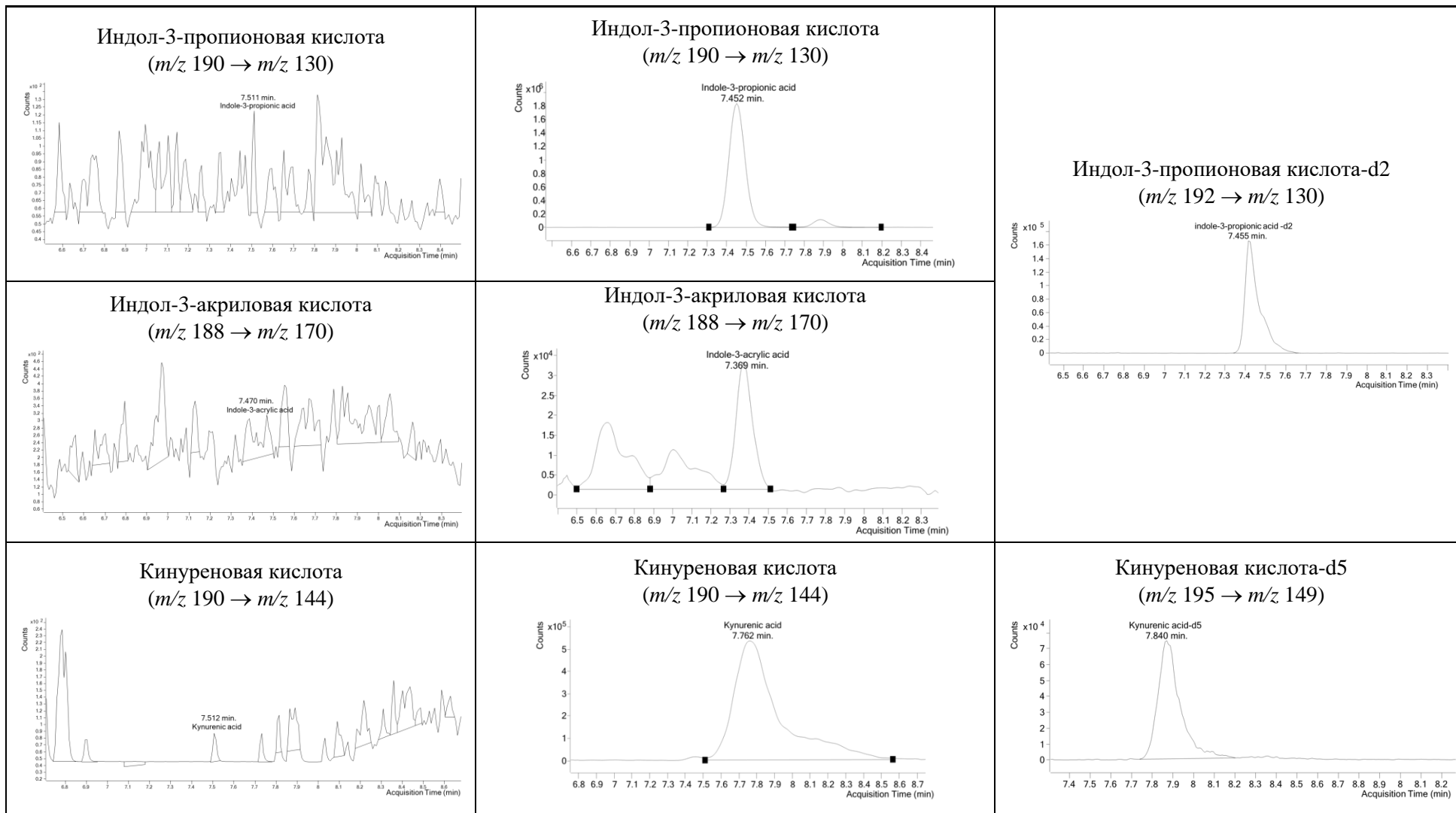
Продолжение Таблицы 6.



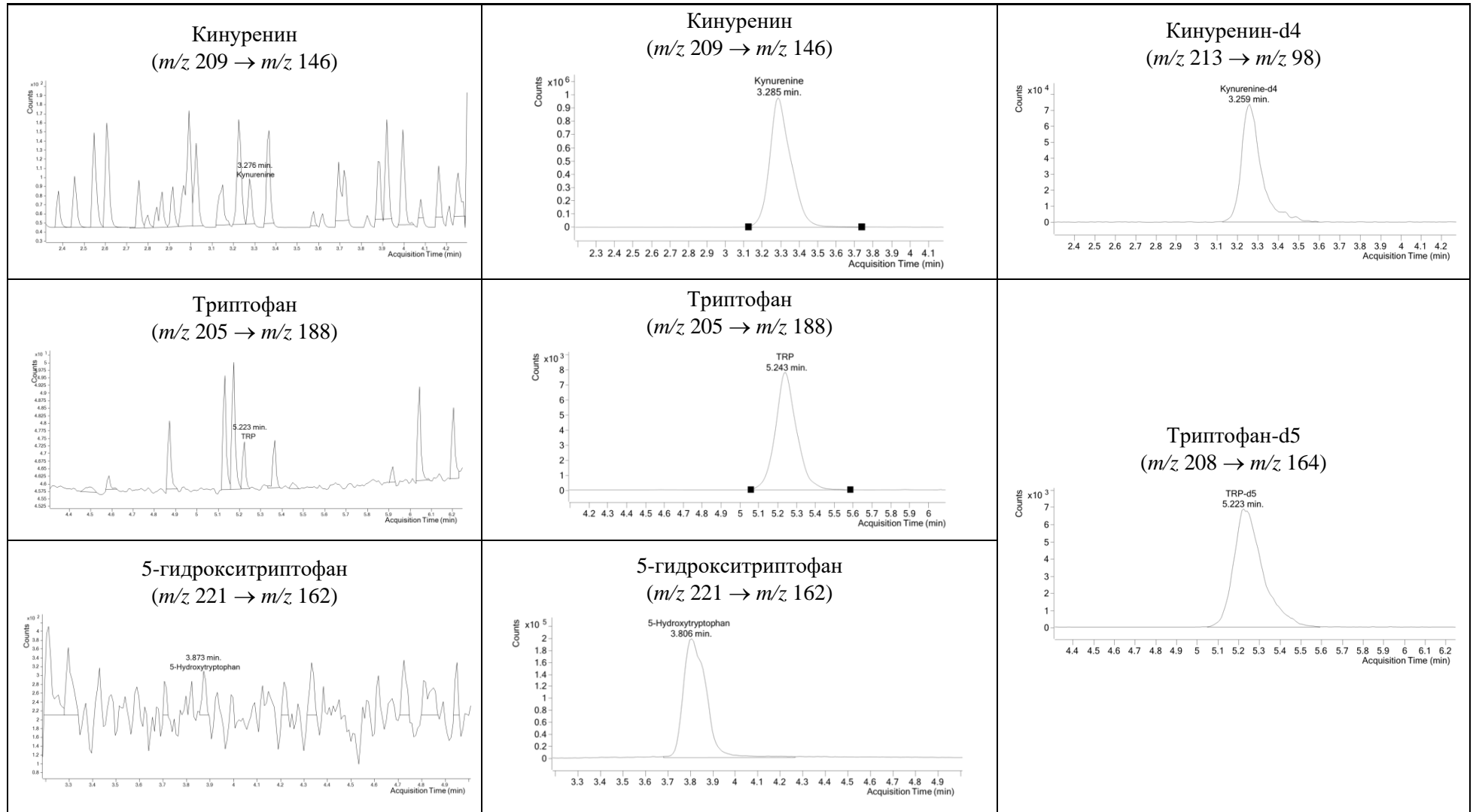
Продолжение Таблицы 6.



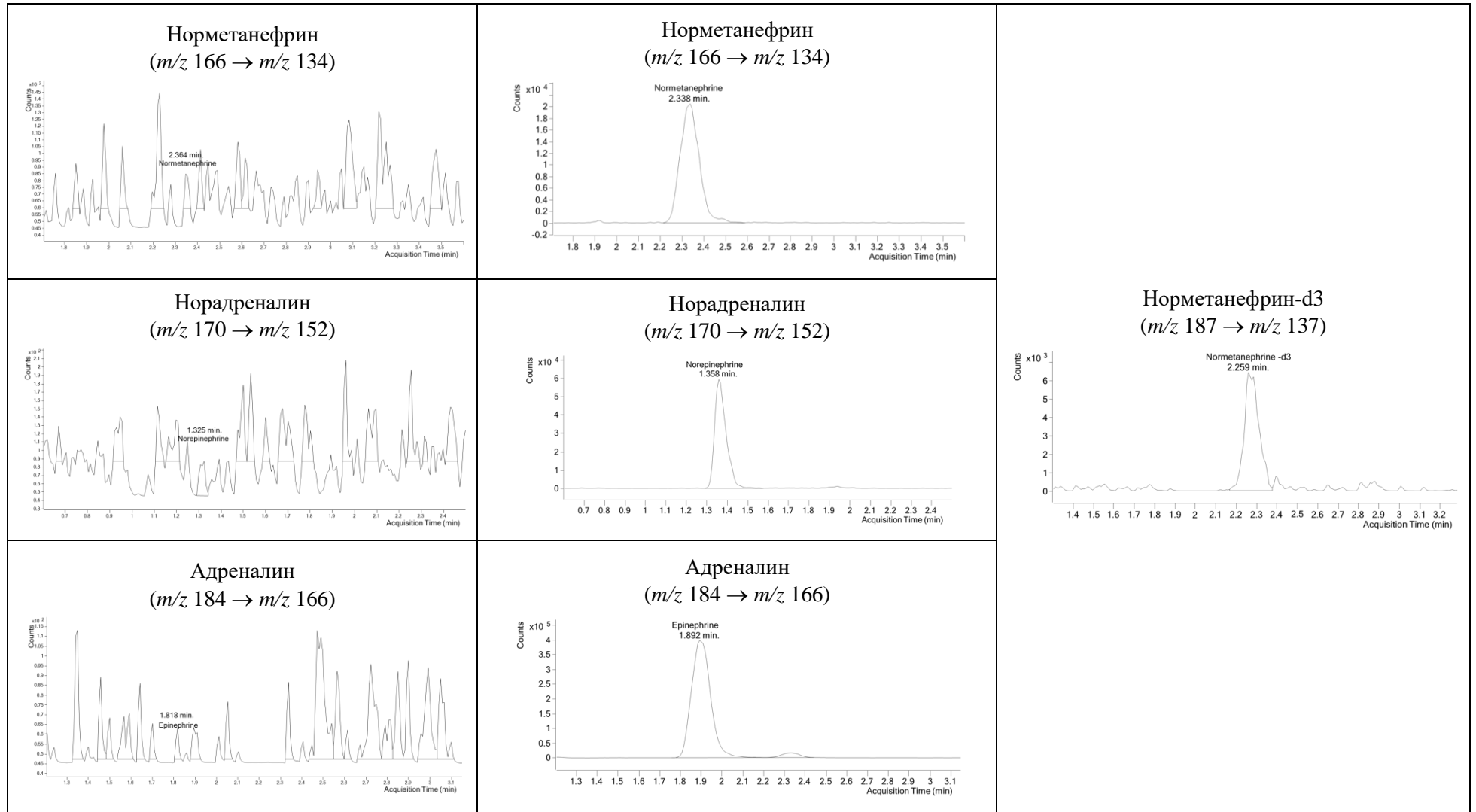
Продолжение Таблицы 6.



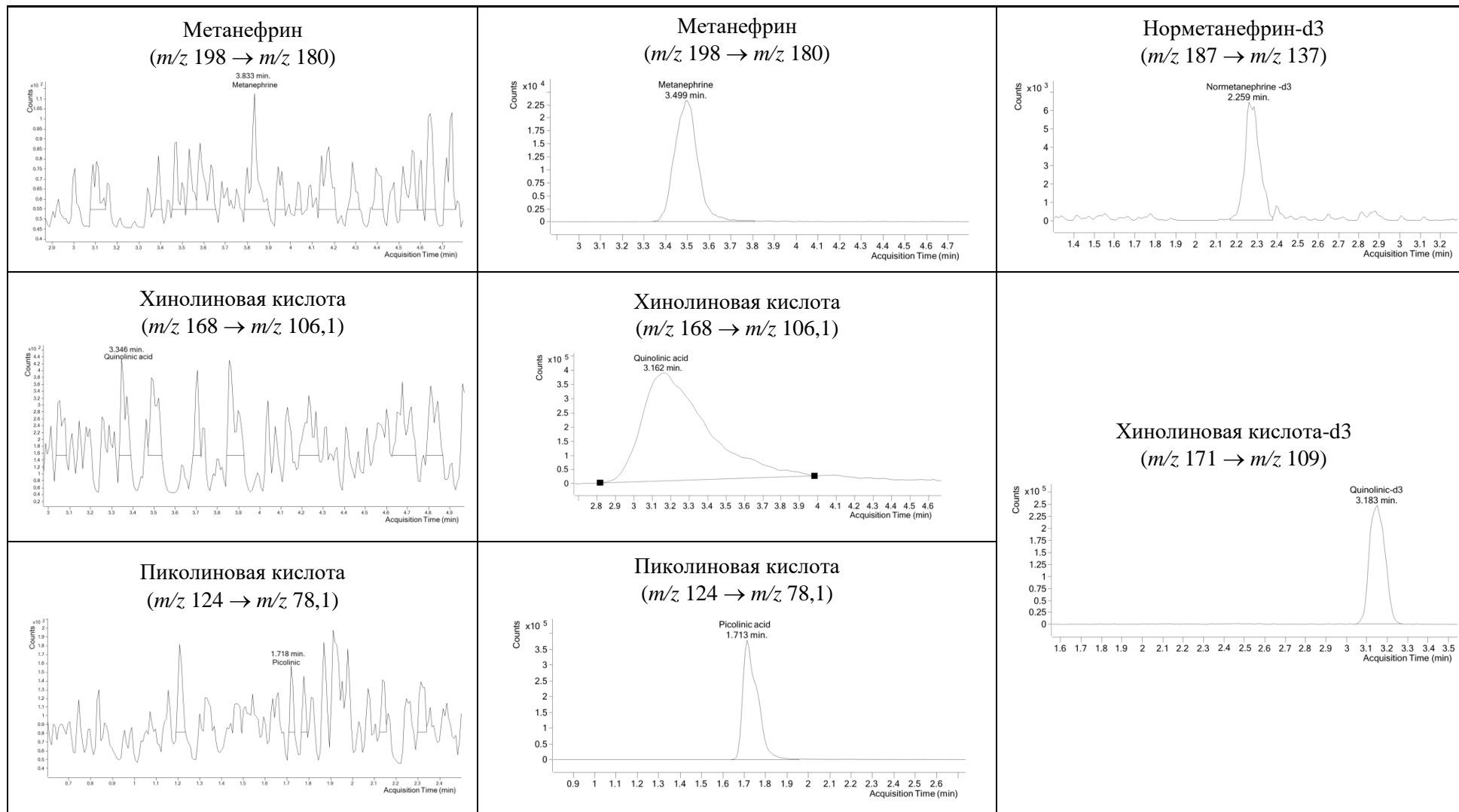
Продолжение Таблицы 6.



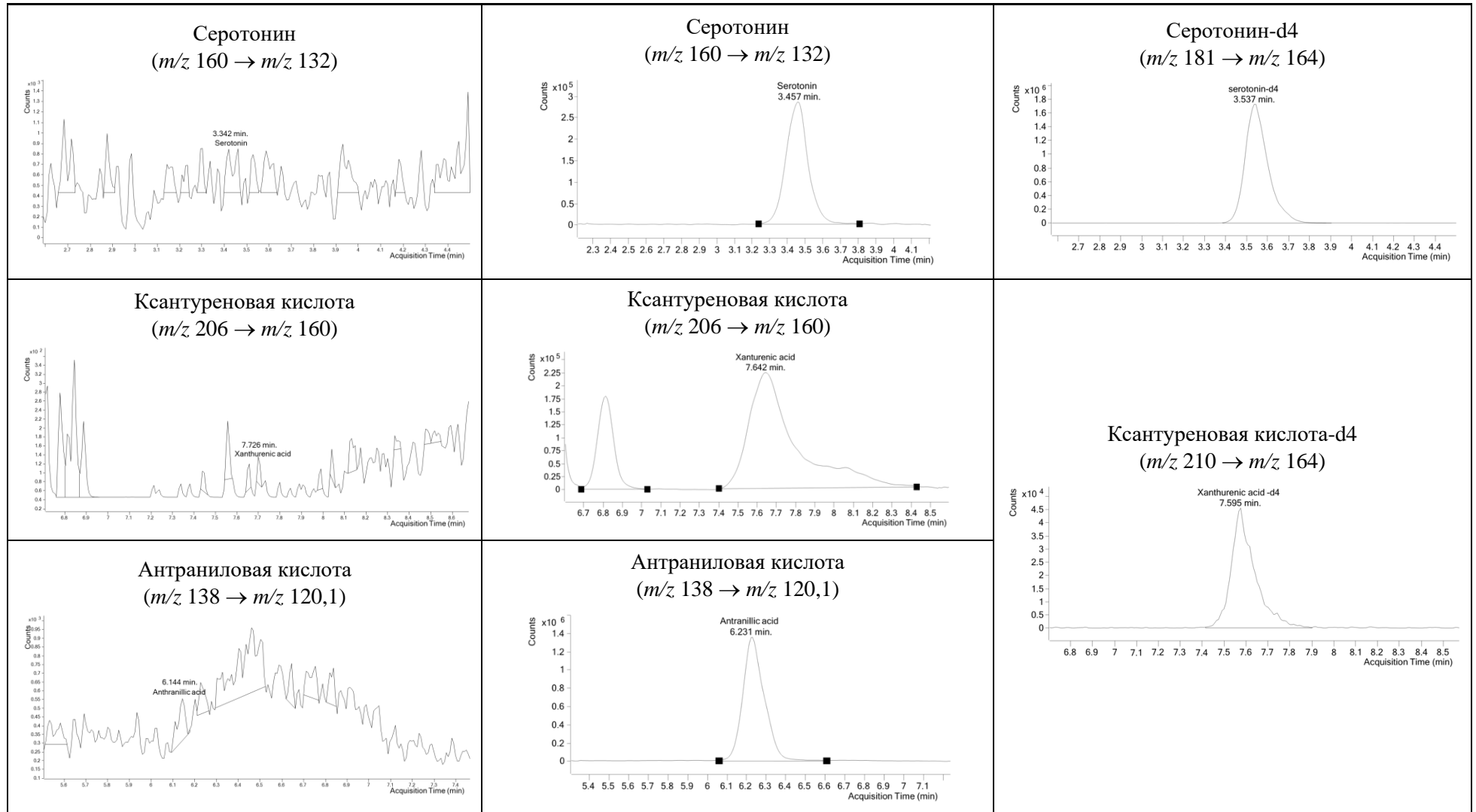
Продолжение Таблицы 6.



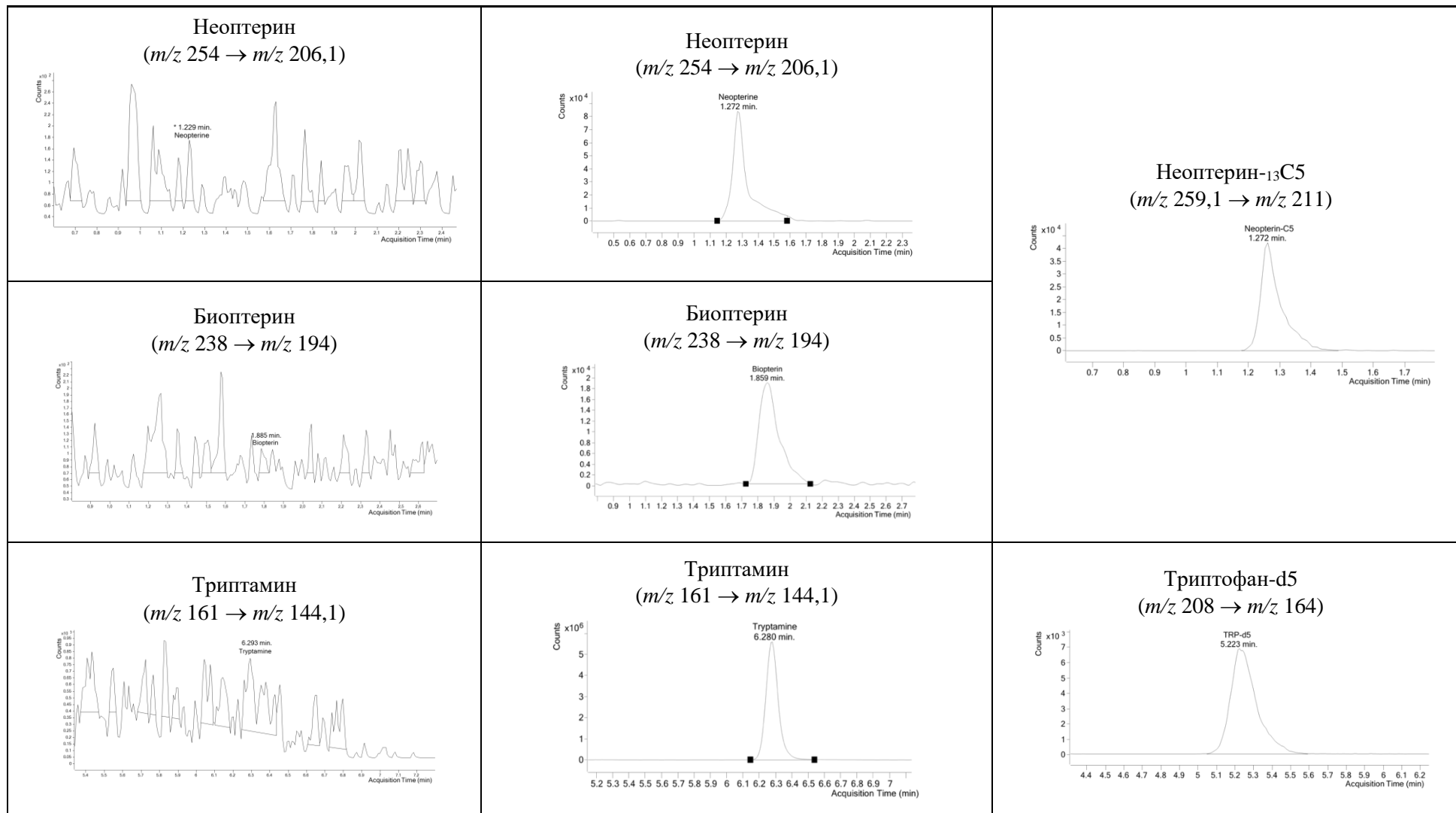
Продолжение Таблицы 6.



Продолжение Таблицы 6.



Продолжение Таблицы 6.



Калибровочную модель считали приемлемой в том случае, если для калибровочных графиков, полученных в 3-х аналитических циклах коэффициент детерминации линейной калибровочной функции составлял не менее 0,99.

Также осуществлялся поиск нижнего предела количественного определения. Под нижним пределом количественного определения (НПКО; LLOQ) понимали наименьшую концентрацию исследуемого аналита в образце, которая могла быть надежно количественно определена с приемлемой правильностью и прецизионностью.

Нижний предел количественного определения оценивали путем анализа калибровочного стандарта (калибратора) с наименьшей концентрацией исследуемого аналита, который использовали при построении калибровочных графиков, при условии, что сигнал исследуемого аналита в выбранном калибраторе не менее, чем в 5 раз превосходил величину сигнала холостого образца. Калибровочные параметры представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Калибровочные характеристики методики для определяемых соединений

Соединение	Линейный диапазон	Угловой коэффициент	Свободный член	Коэффициент детерминации (r^2)
L-Триптофан	10-1000 мкг/мл	0,8531	-2,3589	0,9961
Кинуренин	10-50000 нг/мл	0,4001	-0,1024	0,9998
Холин	1-100 мкг/мл	0,5206	0,1729	0,9936
Серотонин	1-25000 нг/мл	0,0990	-0,0052	0,9998
Хинолиновая кислота	1-1000 нг/мл	0,054	-0,0033	0,9999
Индол-3-пропионовая кислота	1-1000 нг/мл	0,068	-0,0020	0,9996
Индол-3-молочная кислота	10-10000 нг/мл	0,2631	-0,027	0,9954
Индол-3-уксусная кислота	10-1000 нг/мл	0,1058	0,0039	0,9991
Ксантуреновая кислота	0,2-2000 нг/мл	10,415	-0,1453	0,9995
Триптамин	0,02-200 нг/мл	2,118	0,0105	0,9980
Биоптерин	0,2-200 нг/мл	0,0073	-0,0002	0,9953
Кинуреновая кислота	0,2-200 нг/мл	1,632	-0,010	0,9968
Индол-3-карбоксальдегид	0,2-200 нг/мл	1,257	0,028	0,9981

Продолжение Таблицы 7.

Индол-3-масляная кислота	0,2-200 нг/мл	1,216	0,011	0,9918
Индол-3-акриловая кислота	0,2-200 нг/мл	4,097	0,040	0,9967
5-гидроксииндол-уксусная кислота	0,2-200 нг/мл	1,077	0,045	0,9912
Дофамин	0,2-200 нг/мл	0,8632	-0,014	0,9987
Неоптерин	0,2-200 нг/мл	0,0030	0,00002	0,9918
Антраниловая кислота	0,2-200 нг/мл	2,118	0,671	0,9993
ГАМК	1-500 нг/мл	0,0543	-0,0002	0,9995
5-гидрокситриптофан	1-1000 нг/мл	1,936	-0,054	0,9970
Ацетилхолин	0,1-100 нг/мл	12,940	7,490	0,9981
Аспарагин	1-1000 нг/мл	0,070	0,029	0,9938
Аспарагиновая кислота	1-1000 нг/мл	0,097	0,139	0,9903
Цитруллин	50-5000 нг/мл	4,190	3,367	0,9970
Кортизол	0,1-1000 нг/мл	0,103	-0,0041	0,9936
Адреналин	1-500 нг/мл	13,597	3,995	0,9920
Глутаминовая кислота	10-5000 нг/мл	0,396	0,113	0,9970
Глутамин	10-5000 нг/мл	0,225	0,111	0,9923
L-ДОФА	1-1000 нг/мл	0,417	0,042	0,9996
Метанефрин	10-5000 нг/мл	7,423	1,025	0,9922
Норадреналин	1-1000 нг/мл	12,988	-0,427	0,9939
Норметанефрин	1-500 нг/мл	24,801	-0,098	0,9946
Фенилаланин	1-100 мкг/мл	1,821	0,762	0,9993
Пиколиновая кислота	1-1000 нг/мл	3,876	1,249	0,9993
Тирозин	1-100 мкг/мл	0,484	0,308	0,9992

3.2.3. Эффект переноса

Эффект переноса оценивали путем введения холостого образца сразу же после введения образца калибровочного стандарта (калибратора) с концентрацией исследуемого аналита, равной верхнему пределу количественного определения.

Величину эффекта переноса считали приемлемой, если перенос в холостом образце, который хроматографировали после образца калибратора, составлял не более 20% от нижнего предела количественного определения исследуемого аналита (НПКО).

Для всех исследуемых веществ величина откликов на масс-хроматограммах была ниже 20% от НПКО.

3.2.4. Правильность и прецизионность

Оценку правильности и прецизионности разработанной методики проводили с использованием образцов контроля качества (образцов QC). Образцы QC готовили независимо от калибраторов (калибровочных растворов) путем добавления известного количества исследуемого аналита к холостым образцам. Для приготовления образцов QC использовали отдельно приготовленные концентрированные и рабочие растворы исследуемого аналита.

Правильность и прецизионность оценивали для значений образцов QC, полученных в пределах одного цикла (внутрисерийная, within-run) и между циклами (межсерийная, between-run). Внутрисерийную правильность и прецизионность оценивали путем анализа в одном аналитическом цикле набора образцов QC на 4-х уровнях концентрации. Каждый образец QC анализировали в 6-ти параллелях. Межсерийную правильность и прецизионность оценивали путем анализа аналогичного набора образцов QC на 4-х уровнях концентрации в течение 3-х аналитических циклов. Оценку внутрисерийной и межсерийной прецизионности проводили с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Концентрацию исследуемого аналита в образцах QC устанавливали по калибровочным графикам и сравнивали с их номинальным значением. Значение правильности выражали как процент от номинальной концентрации исследуемого аналита в образце QC, а прецизионности – как коэффициент вариации (RSD).

Правильность и прецизионность разработанной методики считали приемлемыми, если:

1. Средняя концентрация исследуемого аналита в образцах контроля качества была в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных значений, за исключением образца LLOQ QC, для которого предельное значение не должно было превышать $\pm 25\%$;

2. Значения внутрисерийного и межсерийного коэффициентов вариации (RSD) не превышали $\pm 20\%$ для образцов QC, за исключением образца LLOQ QC, для которого значения коэффициентов вариации (RSD) не должны были превышать $\pm 25\%$.

Результаты определения правильности и прецизионности методики представлены в Таблице 8.

3.2.5. Эффект матрицы

Оценку эффекта матрицы проводили с использованием набора образцов QC на уровне концентрации LQC и HQC.

Величину эффекта матрицы считали приемлемой, если средний коэффициент вариации (RSD) матричного эффекта, рассчитанный для каждой концентрации, не превышал $\pm 15\%$. Результаты определения эффекта матрицы представлены в Таблице 9.

3.2.6. Коэффициент экстракции

Оценка коэффициента экстракции необходима для установления факта полноты выхода исследуемых аналитов из анализируемого образца.

Коэффициент экстракции рассчитывается как сравнение площадей хроматографических пиков исследуемого аналита, добавленного к матрице до и после осаждения белков образца. Оценку коэффициента экстракции проводили с использованием 6-ти серий холостых образцов. Оценку коэффициента экстракции проводили с использованием набора образцов QC на уровне концентрации LQC и HQC.

Коэффициент экстракции считали приемлемым, если средний коэффициент вариации (RSD) коэффициента экстракции, рассчитанный для каждой концентрации, не превышал 15% . Результаты определения коэффициента экстракции представлены в Таблице 10.

Таблица 8 – Правильность и прецизионность методики для определяемых соединений

Соединение	Процент от номинальной концентрации в образце QC, % (RSD, %)				
		LLOQ QC	LQC	MQC	HQC
L-Триптофан	1 цикл	91,9 (7,9)	100,4 (5,8)	98,8 (7,9)	102,3 (5,0)
	2 цикл	101,8 (6,3)	102,7 (5,9)	100,3 (5,1)	103,0 (5,4)
	3 цикл	105,9 (8,0)	112,8 (5,3)	92,4 (6,6)	105,3 (6,6)
	Между циклами	102,3 (9,8)	105,5 (8,7)	97,1 (9,6)	103,6 (10,9)
Кинуренин	1 цикл	80,3 (6,5)	104,3 (5,2)	95,0 (5,3)	99,6 (5,7)
	2 цикл	119,1 (6,9)	87,2 (6,2)	93,9 (6,4)	100,9 (5,5)
	3 цикл	87,5 (7,7)	106,8 (6,4)	91,6 (6,9)	100,6 (8,0)
	Между циклами	95,6 (11,5)	99,4 (8,7)	93,5 (9,7)	100,3 (9,2)
Холин	1 цикл	91,9 (7,3)	84,0 (7,2)	103,9 (5,1)	87,4 (5,7)
	2 цикл	109,5 (7,3)	98,0 (7,0)	106,8 (5,1)	86,5 (7,0)
	3 цикл	108,0 (5,2)	114,4 (5,6)	101,1 (7,6)	93,4 (5,4)
	Между циклами	103,1 (12,5)	98,8 (10,2)	104,0 (12,3)	89,1 (11,9)
Серотонин	1 цикл	112,1 (7,8)	118,4 (6,2)	100,0 (6,5)	105,1 (7,7)
	2 цикл	115,9 (5,7)	113,4 (7,7)	103,5 (6,6)	107,8 (6,1)
	3 цикл	106,3 (6,4)	111,9 (7,8)	102,6 (5,3)	103,3 (6,2)
	Между циклами	111,4 (10,9)	114,6 (11,5)	100,7 (10,5)	105,3 (8,7)
Хинолиновая кислота	1 цикл	93,8 (6,8)	106,9 (6,5)	112,1 (7,6)	111,3 (5,1)
	2 цикл	113,7 (7,8)	99,7 (5,4)	108,0 (7,6)	110,1 (6,1)
	3 цикл	97,4 (5,1)	111,4 (5,1)	111,1 (7,4)	109,8 (7,4)
	Между циклами	101,6 (11,1)	106,0 (9,8)	110,4 (12,4)	110,4 (8,9)
Индол-3-пропионовая кислота	1 цикл	96,0 (7,5)	111,6 (5,8)	99,4 (5,5)	96,7 (6,1)
	2 цикл	114,7 (5,3)	110,1 (5,6)	103,0 (5,4)	97,2 (6,0)
	3 цикл	93,1 (6,4)	109,0 (5,1)	100,6 (7,6)	96,5 (5,2)
	Между циклами	101,2 (8,3)	110,2 (9,9)	101,0 (10,4)	96,8 (11,6)
Индол-3-молочная кислота	1 цикл	99,8 (7,2)	115,9 (5,4)	100,8 (5,3)	105,2 (6,1)
	2 цикл	90,6 (7,6)	103,0 (6,6)	103,5 (6,8)	107,8 (5,0)
	3 цикл	107,9 (7,6)	107,5 (6,3)	102,6 (6,6)	103,3 (6,4)
	Между циклами	99,5 (8,3)	108,8 (9,9)	100,8 (10,4)	105,2 (11,6)

Продолжение Таблицы 8.

Индол-3-уксусная кислота	1 цикл	108,4 (7,3)	117,5 (6,3)	106,6 (8,0)	96,8 (6,1)
	2 цикл	81,7 (7,4)	113,0 (7,3)	102,0 (6,7)	100,9 (8,0)
	3 цикл	119,2 (6,8)	84,0 (6,0)	106,4 (5,9)	100,4 (7,1)
	Между циклами	103,1 (12,4)	104,9 (10,1)	105,0 (8,8)	99,3 (9,3)
Ксантуреновая кислота	1 цикл	104,6 (5,7)	105,3 (7,9)	99,6 (5,0)	96,8 (5,9)
	2 цикл	113,5 (7,3)	92,5 (5,2)	100,8 (7,0)	98,9 (7,7)
	3 цикл	86,0 (5,1)	99,9 (6,0)	100,8 (5,9)	99,0 (5,0)
	Между циклами	101,3 (8,4)	99,2 (9,8)	100,4 (10,3)	98,3 (9,8)
Триптамиин	1 цикл	97,1 (6,5)	92,0 (5,6)	106,6 (5,4)	111,3 (6,1)
	2 цикл	119,1 (7,7)	116,1 (5,1)	102,0 (7,0)	110,1 (7,3)
	3 цикл	109,5 (5,5)	106,2 (6,4)	106,4 (6,3)	109,8 (6,2)
	Между циклами	94,4 (11,2)	104,7 (8,0)	105,0 (9,1)	110,4 (9,4)
Биоптерин	1 цикл	101,6 (6,3)	91,8 (5,5)	108,9 (7,7)	96,8 (8,0)
	2 цикл	99,0 (7,2)	109,4 (7,3)	111,3 (7,6)	98,9 (7,7)
	3 цикл	116,1 (7,5)	92,0 (5,6)	109,0 (5,3)	99,0 (6,0)
	Между циклами	117,4 (9,9)	97,7 (10,5)	109,8 (9,5)	98,3 (9,7)
Кинуреновая кислота	1 цикл	116,7 (5,8)	106,0 (7,2)	100,8 (7,0)	105,2 (6,7)
	2 цикл	93,1 (6,9)	94,9 (6,6)	103,5 (7,4)	107,8 (7,6)
	3 цикл	97,1 (6,8)	100,0 (6,6)	102,6 (5,8)	103,3 (7,1)
	Между циклами	93,5 (8,3)	100,3 (9,1)	100,8 (8,1)	105,2 (8,4)
Индол-3-карбоксальдегид	1 цикл	87,7 (7,9)	101,7 (6,6)	112,1 (5,3)	110,2 (6,6)
	2 цикл	109,5 (7,4)	99,1 (6,9)	108,0 (7,2)	112,0 (6,8)
	3 цикл	87,6 (6,5)	80,7 (7,8)	111,1 (5,6)	105,6 (7,3)
	Между циклами	82,3 (8,6)	93,8 (9,5)	110,4 (12,8)	109,3 (11,2)
Индол-3-масляная кислота	1 цикл	116,2 (5,8)	106,2 (6,8)	101,0 (5,7)	101,6 (7,8)
	2 цикл	118,9 (5,5)	111,2 (7,6)	102,8 (5,3)	104,6 (5,2)
	3 цикл	84,3 (5,7)	85,5 (6,4)	100,4 (5,6)	100,9 (5,5)
	Между циклами	111,8 (11,6)	100,9 (11,5)	101,4 (9,9)	102,8 (9,0)

Продолжение Таблицы 8.

Индол-3-акриловая кислота	1 цикл	103,7 (6,8)	88,1 (6,4)	104,1 (6,4)	96,7 (6,1)
	2 цикл	110,7 (6,5)	100,4 (5,3)	104,8 (7,9)	97,2 (5,8)
	3 цикл	93,9 (5,2)	112,0 (6,4)	106,6 (6,7)	96,5 (6,8)
	Между циклами	100,3 (11,0)	100,2 (9,5)	105,1 (10,4)	96,8 (8,5)
5-гидроксииндолуксусная кислота	1 цикл	91,8 (7,2)	89,7 (7,4)	100,8 (7,5)	96,8 (7,4)
	2 цикл	118,4 (6,1)	80,7 (7,1)	103,5 (5,8)	98,9 (6,4)
	3 цикл	115,6 (7,5)	112,8 (5,9)	102,6 (5,7)	99,0 (7,6)
	Между циклами	81,9 (10,0)	94,4 (10,5)	100,8 (11,6)	98,3 (12,1)
Дофамин	1 цикл	84,7 (6,6)	106,4 (6,8)	100,6 (6,3)	106,8 (5,8)
	2 цикл	80,3 (7,6)	106,9 (6,2)	105,4 (5,4)	107,6 (6,7)
	3 цикл	99,3 (6,0)	103,9 (6,3)	103,6 (5,9)	102,1 (7,0)
	Между циклами	111,4 (12,1)	105,7 (9,3)	103,3 (10,2)	105,4 (8,6)
Неоптерин	1 цикл	114,5 (6,1)	83,2 (6,0)	106,6 (5,2)	106,8 (5,4)
	2 цикл	86,2 (5,5)	112,3 (6,1)	102,0 (7,1)	107,6 (6,1)
	3 цикл	117,7 (8,0)	114,3 (6,6)	106,4 (6,7)	102,1 (7,4)
	Между циклами	112,7 (9,4)	103,2 (10,5)	105,0 (9,3)	105,4 (10,4)
Антралиловая кислота	1 цикл	88,8 (6,3)	103,5 (5,2)	96,4 (5,4)	103,9 (5,1)
	2 цикл	88,4 (5,9)	86,6 (6,4)	98,4 (6,0)	105,8 (7,3)
	3 цикл	117,5 (6,7)	106,7 (8,0)	96,5 (5,9)	99,3 (7,2)
	Между циклами	81,4 (11,6)	98,9 (12,4)	97,3 (10,0)	103,0 (9,4)
Гамма-аминомасляная кислота	1 цикл	111,0 (5,5)	97,8 (5,3)	105,8 (6,3)	99,6 (5,1)
	2 цикл	104,4 (5,5)	98,5 (7,8)	93,4 (7,8)	101,1 (5,9)
	3 цикл	84,8 (5,8)	110,3 (6,7)	94,1 (6,1)	99,0 (6,7)
	Между циклами	100,1 (9,4)	102,2 (11,4)	97,8 (12,5)	100,0 (8,3)
5-гидрокситриптофан	1 цикл	92,2 (5,3)	98,5 (7,3)	99,7 (5,7)	98,0 (5,7)
	2 цикл	86,1 (6,7)	95,6 (7,9)	96,0 (6,8)	96,2 (7,9)
	3 цикл	109,4 (7,1)	100,2 (6,2)	98,8 (6,9)	95,6 (6,7)
	Между циклами	95,9 (9,2)	98,1 (10,1)	98,1 (8,9)	96,6 (11,5)

Продолжение Таблицы 8.

Ацетилхолин	1 цикл	81,8 (6,4)	109,3 (6,7)	96,8 (5,3)	104,9 (7,2)
	2 цикл	80,4 (5,7)	110,3 (7,1)	98,9 (6,5)	108,3 (5,5)
	3 цикл	113,0 (5,5)	100,8 (5,7)	96,9 (7,0)	108,4 (5,5)
	Между циклами	85,6 (9,4)	106,8 (8,1)	97,6 (9,6)	107,2 (12,5)
Аспарагин	1 цикл	81,6 (6,0)	105,3 (6,5)	98,8 (6,7)	105,6 (7,5)
	2 цикл	101,7 (6,3)	84,8 (5,1)	100,1 (6,0)	105,8 (6,3)
	3 цикл	94,3 (7,5)	107,5 (5,8)	100,1 (6,3)	105,8 (6,3)
	Между циклами	104,4 (9,1)	99,2 (8,2)	100,0 (8,6)	105,7 (12,2)
Аспарагиновая кислота	1 цикл	115,8 (7,9)	115,3 (7,2)	112,1 (6,6)	108,0 (6,7)
	2 цикл	109,5 (5,3)	81,7 (6,7)	108,0 (8,0)	106,2 (6,3)
	3 цикл	90,9 (6,5)	118,0 (6,0)	111,1 (5,5)	105,6 (5,2)
	Между циклами	105,4 (10,4)	105,0 (12,7)	110,4 (12,4)	106,6 (9,8)
Цитруллин	1 цикл	116,9 (5,3)	100,3 (6,4)	95,0 (5,7)	99,6 (5,5)
	2 цикл	92,1 (6,3)	91,9 (6,6)	93,9 (6,2)	100,9 (5,7)
	3 цикл	83,2 (7,0)	81,9 (6,7)	91,6 (7,8)	100,5 (7,0)
	Между циклами	97,4 (12,4)	91,4 (9,7)	93,5 (10,1)	100,3 (9,0)
Кортизол	1 цикл	92,9 (6,0)	97,8 (6,1)	104,2 (5,6)	105,5 (7,2)
	2 цикл	111,5 (5,4)	86,0 (5,3)	109,2 (7,3)	105,6 (6,4)
	3 цикл	85,2 (6,0)	111,4 (6,3)	103,0 (6,9)	105,4 (7,9)
	Между циклами	116,2 (10,0)	98,4 (12,7)	101,8 (9,5)	105,5 (10,4)
Адреналин	1 цикл	92,0 (5,9)	112,8 (6,1)	100,7 (6,6)	91,3 (5,7)
	2 цикл	106,4 (7,4)	84,6 (5,1)	92,4 (7,4)	102,3 (5,3)
	3 цикл	118,8 (6,8)	100,8 (7,7)	100,2 (6,9)	101,2 (6,1)
	Между циклами	105,8 (11,1)	99,4 (8,3)	97,8 (8,2)	98,0 (10,8)
Глутаминовая кислота	1 цикл	95,3 (5,9)	114,1 (7,2)	103,9 (5,6)	97,9 (6,7)
	2 цикл	113,4 (5,4)	87,2 (5,7)	106,9 (6,2)	95,2 (5,6)
	3 цикл	107,2 (6,1)	96,0 (6,2)	101,1 (6,0)	94,7 (5,3)
	Между циклами	105,3 (8,4)	99,1 (8,3)	104,0 (12,0)	99,3 (9,3)

Продолжение Таблицы 8.

Глутамин	1 цикл	83,2 (6,2)	86,6 (5,6)	95,0 (6,4)	99,7 (5,6)
	2 цикл	115,6 (5,4)	87,5 (5,1)	93,9 (7,2)	100,7 (7,2)
	3 цикл	87,6 (5,8)	111,6 (6,4)	91,6 (5,3)	100,4 (7,8)
	Между циклами	95,5 (10,0)	95,2 (10,5)	93,5 (12,8)	100,2 (10,9)
L-ДОФА	1 цикл	106,6 (6,1)	91,6 (6,4)	100,8 (7,6)	108,3 (7,9)
	2 цикл	102,3 (6,2)	113,7 (5,8)	103,5 (7,7)	102,5 (6,4)
	3 цикл	105,5 (5,7)	101,7 (6,5)	102,6 (6,4)	105,3 (5,7)
	Между циклами	104,8 (12,6)	102,3 (12,3)	100,8 (8,8)	108,3 (8,5)
Метанефрин	1 цикл	86,6 (6,8)	112,3 (7,1)	95,0 (5,5)	119,7 (5,6)
	2 цикл	103,1 (6,0)	116,3 (6,9)	93,9 (6,7)	100,7 (7,9)
	3 цикл	89,9 (6,2)	95,7 (7,5)	91,6 (6,7)	100,4 (7,4)
	Между циклами	93,2 (8,2)	108,1 (8,7)	93,5 (12,1)	100,2 (10,7)
Норадrenalин	1 цикл	110,6 (7,8)	109,9 (7,6)	112,1 (5,3)	108,0 (5,2)
	2 цикл	105,7 (7,6)	115,0 (7,9)	108,0 (5,1)	106,2 (7,2)
	3 цикл	104,7 (7,2)	85,6 (7,9)	111,1 (5,8)	105,6 (5,4)
	Между циклами	107,0 (9,2)	103,5 (12,3)	110,4 (12,7)	106,6 (9,8)
Норметанефрин	1 цикл	108,0 (6,9)	89,6 (7,7)	106,6 (7,6)	109,6 (7,0)
	2 цикл	100,0 (7,0)	82,4 (5,8)	102,0 (5,0)	102,8 (6,4)
	3 цикл	106,0 (5,6)	93,2 (5,5)	106,4 (6,8)	101,4 (7,5)
	Между циклами	104,7 (11,0)	88,4 (11,6)	105,0 (8,9)	117,6 (12,2)
Фенилаланин	1 цикл	105,0 (6,1)	100,0 (5,4)	98,8 (6,6)	100,9 (5,9)
	2 цикл	105,1 (6,7)	100,3 (7,3)	100,3 (7,5)	101,2 (7,5)
	3 цикл	105,3 (6,7)	112,7 (6,3)	92,4 (7,7)	102,1 (5,9)
	Между циклами	105,1 (9,0)	105,3 (10,1)	97,1 (12,8)	101,4 (12,2)
Пиколиновая кислота	1 цикл	99,1 (5,6)	111,4 (7,3)	100,8 (6,3)	108,3 (7,4)
	2 цикл	98,3 (6,5)	116,6 (6,2)	103,5 (6,7)	102,5 (7,9)
	3 цикл	113,3 (5,5)	93,7 (6,0)	102,6 (5,2)	105,3 (5,9)
	Между циклами	103,5 (11,1)	107,3 (10,2)	100,8 (10,5)	108,3 (8,3)

Продолжение Таблицы 8.

Тирозин	1 цикл	100,5 (6,7)	93,3 (5,2)	103,9 (7,4)	100,9 (6,9)
	2 цикл	102,5 (7,7)	100,6 (6,3)	106,8 (7,9)	100,8 (6,5)
	3 цикл	104,5 (6,5)	101,6 (6,6)	101,1 (7,4)	100,7 (5,4)
	Между циклами	103,8 (8,2)	102,3 (9,4)	104,0 (10,7)	101,0 (12,6)

Таблица 9 – Результаты исследования эффекта матрицы

Соединение	LQC		HQC	
	% по сравнению с истинным значением	RSD, %	% по сравнению с истинным значением	RSD, %
L-Триптофан	96,1	7,9	101,1	6,8
Кинуренин	111,4	3,4	102,1	4,5
Холин	100,1	3,2	110,2	7,9
Серотонин	92,1	6,8	103,1	4,5
Хинолиновая кислота	95,7	2,3	96,1	6,8
Индол-3-пропионовая кислота	97,1	3,4	93,3	3,4
Индол-3-молочная кислота	103,1	1,1	100,1	4,5
Индол-3-уксусная кислота	98,1	3,4	95,9	1,1
Ксантуреновая кислота	96,1	2,3	106,2	6,8
Триптамин	110,2	5,7	111,8	4,5
Биоптерин	112,7	5,9	109,2	6,7
Кинуреновая кислота	99,1	7,9	100,1	6,0
Индол-3-карбоксальдегид	101,1	1,1	93,0	6,1
Индол-3-масляная кислота	91,8	1,8	93,0	7,9
Индол-3-акриловая кислота	99,1	4,5	109,2	4,5
5-гидроксииндолуксусная кислота	100,1	6,8	111,4	1,1
Дофамин	107,2	9,1	94,3	3,4
Неоптерин	102,1	1,1	95,7	2,3
Антралиловая кислота	91,4	6,8	92,7	7,9
Гамма-аминомасляная кислота	111,2	5,7	104,1	7,9
5-гидрокситриптофан	110,2	3,4	99,1	3,4
Ацетилхолин	106,2	9,1	104,1	4,5
Аспарагин	95,5	7,9	91,0	4,5
Аспарагиновая кислота	98,1	5,7	105,2	7,9
Цитруллин	103,1	4,5	111,2	2,3
Кортизол	96,1	7,9	92,0	2,3
Адреналин	107,2	6,8	97,1	3,4
Глутаминовая кислота	104,4	6,8	107,2	5,7
Глутамин	95,0	2,3	105,2	6,8
L-ДОФА	96,1	7,9	104,1	5,7
Метанефрин	99,1	3,4	95,0	4,5
Норадреналин	109,2	5,7	102,1	7,9
Норметанефрин	94,0	7,8	106,2	3,4
Фенилаланин	107,6	7,0	100,1	4,5
Пиколиновая кислота	100,1	7,1	98,1	2,3
Тирозин	93,0	6,8	106,2	1,1

Таблица 10 – Результаты определения коэффициента экстракции

Соединение	LQC		HQC	
	% по сравнению с истинным значением	RSD, %	% по сравнению с истинным значением	RSD, %
L-Триптофан	91,0	2,3	97,1	3,4
Кинуренин	108,2	5,7	108,2	6,9
Холин	93,3	1,1	97,1	7,9
Серотонин	91,7	9,1	105,1	4,5
Хинолиновая кислота	95,0	5,7	98,1	7,1
Индол-3-пропионовая кислота	99,1	9,1	104,2	5,7
Индол-3-молочная кислота	91,9	6,8	95,0	9,1
Индол-3-уксусная кислота	92,5	2,3	98,1	3,4
Ксантуреновая кислота	104,1	1,1	105,2	5,7
Триптамин	94,4	3,1	108,9	6,8
Биоптерин	104,1	5,3	92,0	3,4
Кинуреновая кислота	93,7	1,1	97,1	6,8
Индол-3-карбоксальдегид	108,2	3,4	98,1	7,9
Индол-3-масляная кислота	102,1	6,8	95,0	5,7
Индол-3-акриловая кислота	93,1	2,3	106,2	9,1
5-гидроксииндолуксусная кислота	103,1	5,7	93,0	5,7
Дофамин	102,1	7,9	111,2	1,1
Неоптерин	95,0	6,8	101,1	7,9
Антраниловая кислота	109,2	2,3	106,2	7,8
Гамма-аминомасляная кислота	101,1	7,9	92,0	7,7
5-гидрокситриптофан	95,0	1,1	100,1	3,4
Ацетилхолин	103,1	3,4	91,0	1,1
Аспарагин	97,1	7,9	107,2	2,3
Аспарагиновая кислота	107,2	3,4	100,1	3,4
Цитруллин	104,1	5,7	98,1	9,1
Кортизол	100,1	4,5	97,1	5,7
Адреналин	107,2	6,8	95,0	1,1
Глутаминовая кислота	107,2	1,1	109,2	3,4
Глутамин	108,2	4,5	110,2	3,4
L-ДОФА	111,2	9,1	91,0	2,3
Метанефрин	93,0	4,5	99,1	3,4
Норадреналин	106,2	9,1	96,3	3,4
Норметанефрин	92,0	6,8	91,0	5,7
Фенилаланин	103,1	5,7	94,0	1,1
Пиколиновая кислота	105,2	7,9	108,2	9,1
Тирозин	109,2	1,1	103,1	9,1

3.2.7. Стабильность

Исследования стабильности проводили для обеспечения гарантии того, что каждый этап исследования (от приготовления биологического образца до его анализа), также, как и применяемые условия хранения, не оказывают существенного влияния на концентрацию исследуемого аналита. Стабильность оценивали с использованием образцов контроля качества на уровнях концентрации: LQC и HQC, которые анализировали сразу же после приготовления и хранения в предназначенных условиях. Содержание исследуемого аналита в образцах контроля качества определяли на основании калибровочных кривых, полученных с использованием свежеприготовленных калибраторов. Полученные значения концентрации исследуемого аналита сравнивали с их номинальными значениями. Стабильность оценивали для:

1. Рабочих растворов исследуемого аналита, которые хранились 6 часов при комнатной температуре: $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$;
2. Биологических образцов, которые хранились 24 часа в автосамплере хромато-масс-спектрометрической системы при температуре: $10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
3. Биологических образцов, которые предварительно подвергали 3 циклам замораживания-размораживания;
4. Биологических образцов, которые предварительно подвергали хранению в течение 30 дней в условиях глубокой заморозки при температуре: минус $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Стабильность считали приемлемой, если средняя концентрация исследуемого аналита в образцах контроля качества после их хранения в предназначенных условиях была в пределах $\pm 15\%$ от их номинальных значений.

Результаты исследования стабильности представлены в Таблице 11

Таблица 11 – Результаты исследования стабильности

Соединение	LQC				HQC			
	6 часов при комнатной температуре (стандарт)	24 часа в автосамплере	Хранение 20 дней при минус 35±1°С.	После трех циклов заморозки и/разморозки	6 часов при комнатной температуре (стандарт)	24 часа в автосамплере	Хранение 20 дней при минус 35±1°С.	После трех циклов заморозки и/разморозки
L-Триптофан	100,9	103,3	98,8	112,2	102,6	90,7	102,6	108,1
Кинуренин	111,7	105,0	95,9	110,2	99,3	95,9	99,3	101,1
Холин	99,9	97,5	101,6	100,1	98,1	100,9	102,9	109,2
Серотонин	97,5	103,3	97,2	111,8	100,9	99,2	104,4	103,1
Хинолиновая кислота	99,2	105,0	98,8	107,2	101,5	97,0	102,3	108,8
Индол-3-пропионовая кислота	97,0	101,6	95,9	101,1	97,7	96,0	102,6	108,2
Индол-3-молочная кислота	96,0	97,5	101,6	110,2	105,4	102,6	99,3	97,1
Индол-3-уксусная кислота	102,6	101,1	97,2	92,0	97,7	106,4	102,9	100,1
Ксантуреновая кислота	106,4	100,9	100,9	111,2	98,1	103,1	104,4	105,2
Триптамин	103,1	111,7	99,2	98,1	100,9	98,0	102,3	94,0
Биоптерин	99,2	99,9	97,0	93,0	101,5	95,3	102,6	99,1
Кинуреновая кислота	97,0	103,3	96,0	97,1	97,7	100,0	101,6	95,0
Индол-3-карбоксальдегид	99,5	105,0	102,6	110,2	102,9	90,7	98,7	109,2
Индол-3-масляная кислота	96,4	97,5	106,4	110,2	104,4	95,9	95,8	100,8

Продолжение Таблицы 11.

Индол-3-акриловая кислота	98.7	103.3	100,9	100,1	102.3	100,9	96.8	92,0
5-гидроксииндол-уксусная кислота	99.4	105.0	99.2	102,1	103.2	99.2	99.7	97,1
Дофамин	104.3	101.6	97.0	92,7	102.9	97.0	94.6	92,7
Неоптерин	102.0	97.5	96.0	96,1	104.4	96.0	98.7	109,2
Антраниловая кислота	96.3	106.4	104.3	103,1	102.3	101.1	105.4	101,9
Гамма-аминомасляная кислота	101.6	98.0	106.4	97,1	100,9	99.2	101.6	99,1
5-гидрокситриптофан	97.5	95.3	103.1	111,2	99.2	97.0	97.5	102,3
Ацетилхолин	101.1	100,0	98.0	92,0	97.0	96.0	101.1	98,1
Аспарагин	100,9	90,7	95.3	102,1	96.0	102.6	100,9	101,1
Аспарагиновая кислота	111.7	95.9	100,0	105,8	102.6	106.4	111.7	102,8
Цитруллин	99.9	100,9	90,7	105,0	106.4	103.1	99.9	108,2
Кортизол	103.3	99.2	95.9	107,2	100,9	99.2	103.3	103,1
Адреналин	105.0	97.0	100,9	94,4	99.2	97.0	105.0	107,4
Глутаминовая кислота	97.5	96.0	99.2	96,1	97.0	99.5	97.5	91,0
Глутамин	103.3	101.1	111.7	105,2	96.0	96.4	103.3	94,5
L-ДОФА	97.0	102.3	99.9	108,2	104.3	98.7	102.3	109,2
Метанефрин	96.0	103.2	103.3	99,1	102.6	99.2	103.2	99,1
Норадреналин	104.3	102.9	105.0	106,2	97,1	97.0	102.9	111,2
Норметанефрин	102.6	104.4	97.5	99,1	110,2	96.0	104.4	104,1
Фенилаланин	94.2	102.3	103.3	108,2	110,2	101.1	102.3	92,3
Пиколиновая кислота	96.3	97.2	93.5	100,1	100,1	97.5	97.2	109,2
Тирозин	101.2	98.7	92.6	96,1	102,1	99.7	102.4	95,4

3.3. Исследование воздействия диазепама на метаболомный профиль рыб вида *Danio rerio*

Для изучения возможности использования рыб вида *Danio rerio* с целью исследования метаболомных изменений, связанных с нейромедиаторами и метаболитами, близкими к нейромедиаторам, как ответ на введение веществ, действующих на ЦНС, было проведено фармакометаболомное исследование количественных изменений метаболитов, участвующих в работе ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической /адренергической, холинергической систем, системы аспартата, кинуренинового, индольного путей метаболизма триптофана (микробиомный путь) и прочих метаболитов, относящихся к нейротрансмиссии, после введения диазепама в концентрациях 0,8, 1,6, 16 и 160 мкг/л в среду обитания рыб вида *Danio rerio*. Диазепам является фармакологическим веществом с четко описанными свойствами и механизмом действия на ЦНС, который используется в качестве эталонного препарата сравнения в методиках поиска анксиолитических препаратов [5, 29].

Список количественно измеряемых метаболитов представлен в Таблице 1. Методика их количественного определения была разработана и валидирована. Валидация методики количественного определения основных нейромедиаторов и связанных с нейротрансмиссией веществ методом ВЭЖХ-МС/МС представлена в главе 3, раздел 2.

Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного (2,5 ч) воздействия диазепама представлены в Приложении А, Таблица А1. Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после длительного (96 ч) воздействия диазепама представлены в Приложении А, Таблица А2.

3.3.1. Морфологические характеристики

У рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию диазепама в широком диапазоне концентраций, как во время краткосрочного (2,5 ч), так и во время длительного (96 ч) воздействия, не наблюдалось морфологических изменений. В частности, у мальков рыб вида *Danio rerio* из опытных групп не было обнаружено нарушений развития тела, формирования хвоста, гиперпигментации; плавники, сомиты и нотохорда были развиты нормально; не было обнаружено нарушений развития внутренних органов (отека перикарда, желточного мешка, нераскрытия плавательного пузыря) (Рисунок 8).

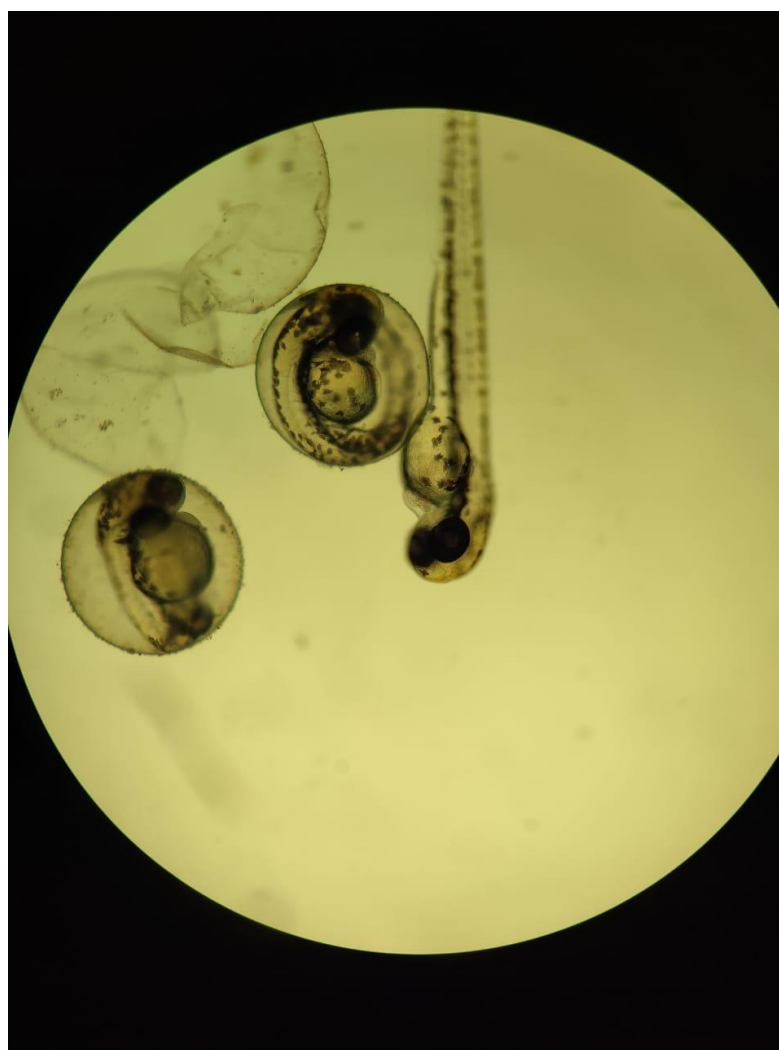


Рисунок 8 – Мальки рыб вида *Danio rerio* после воздействия диазепама в концентрации 160 мкг/л в течение 4-х дней

3.3.2. ГАМКергическая система и система аспартата

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (2,5 ч) и длительное (96 ч) воздействие диазепама в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути ГАМКергической системы и системы аспартата. На Рисунке 9 представлена схема метаболизма аспарагиновой и глутаминовой кислот.

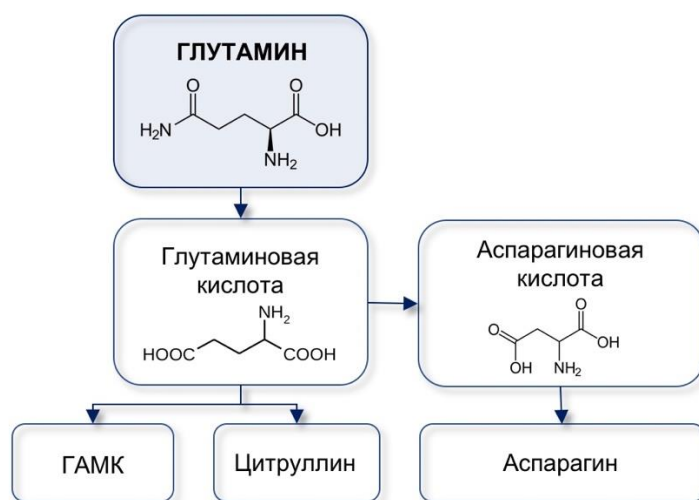


Рисунок 9 – Схема метаболизма аспарагиновой и глутаминовой кислоты

ГАМКергическая система

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама на рыб вида *Danio rerio*, не оказывало дозозависимого изменения в измеренных значениях концентрации ГАМК. Единственным отличием было статистически значимое увеличение концентрации ГАМК в опытной группе №2, подвергавшейся воздействию раствора 1,6 мкг/л диазепама, по сравнению с опытными группами №3-4, подвергавшихся воздействию 16 и 160 мкг/л диазепама (Рисунок 10А). Длительное воздействие (96 ч) диазепама не вызывало изменений в значениях концентрации ГАМК (Рисунок 10А). Концентрация глутаминовой кислоты была увеличена только в опытной группе №4, получавшей раствор 160 мкг/л диазепама по сравнению с опытной группой №1, получавшей раствор 0,8 мкг/л диазепама во время краткосрочного воздействия (Рисунок 10Б). Концентрации

глутаминовой кислоты статистически значимо не изменялись ни в одной из опытных групп после длительного воздействия диазепама (Рисунок 10Б). Концентрации глутамина статистически значимо не изменялись как после краткосрочного, так и после длительного воздействия диазепама на рыб вида *Danio rerio* (Рисунок 10В).

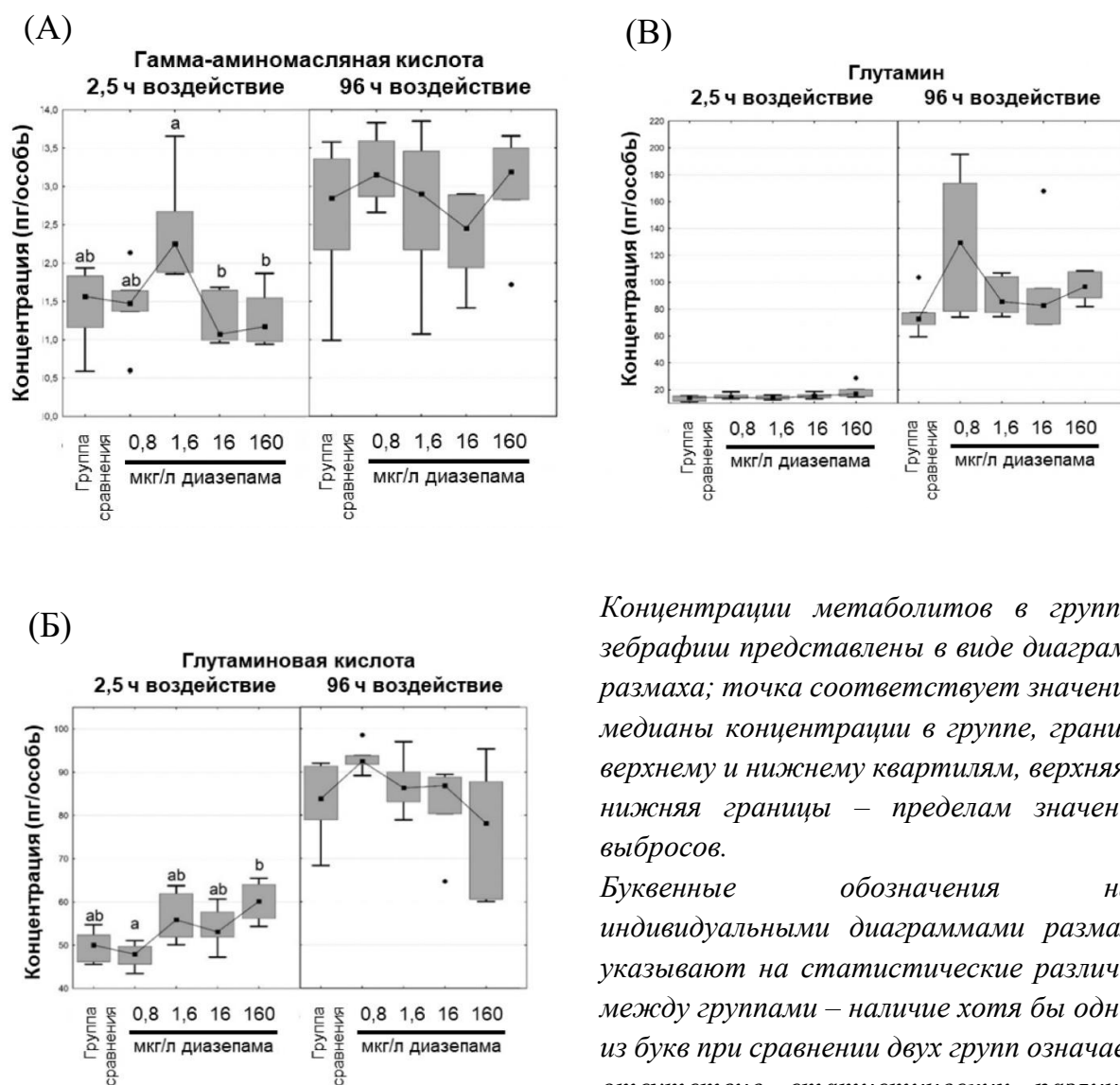
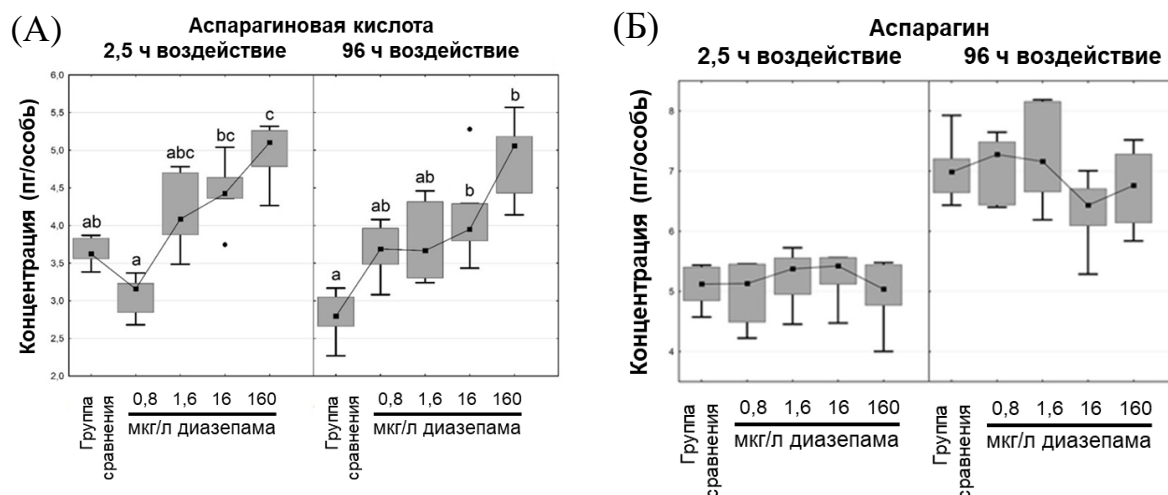


Рисунок 10 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов ГАМКергической системы от введенной дозы диазепама. ГАМК (А), глутаминовая кислота (Б) и глутамин (В)

Система аспартата

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама привело к увеличению концентраций аспарагиновой кислоты. В частности, опытные группы №3-4, получавшие 16 и 160 мкг/л диазепама, показали увеличенные концентрации аспарагиновой кислоты по сравнению с опытной группой №1, получавшей 0,8 мкг/л. Также, опытная группа №4, получавшая высшую дозу диазепама, показала увеличенные концентрации аспарагиновой кислоты по сравнению с контрольной группой (Рисунок 11А). Длительное воздействие (96 ч) диазепама вызвало увеличение концентраций аспарагиновой кислоты в опытных группах №3-4, получавших 16 и 160 мкг/л по сравнению с контрольной группой (Рисунок 11А). Концентрации аспарагина статистически значимо не изменялись как после краткосрочного, так и после длительного воздействия диазепама (Рисунок 11Б).



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани - верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы - пределам значений выбросов.

Буквенные обозначения над индивидуальными диаграммами размаха указывают на статистические различия между группами – наличие хотя бы одной из букв при сравнении двух групп означает отсутствие статистических различий между ними.

Рисунок 11 – График зависимости концентраций аспарагиновой кислоты и аспарагина от введенной дозы диазепама. Аспарагиновая кислота (А) и аспарагин (Б)

3.3.3. Серотонинергическая система и кинурениновый путь метаболизма триптофана

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (2,5 ч) и длительное (96 ч) воздействие диазепама в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути серотонинергической системы и кинуренинового пути метаболизма триптофана.

На рисунке 12 представлена схема метаболизма триптофана через кинуреноновый, серотониновый и индолный пути.

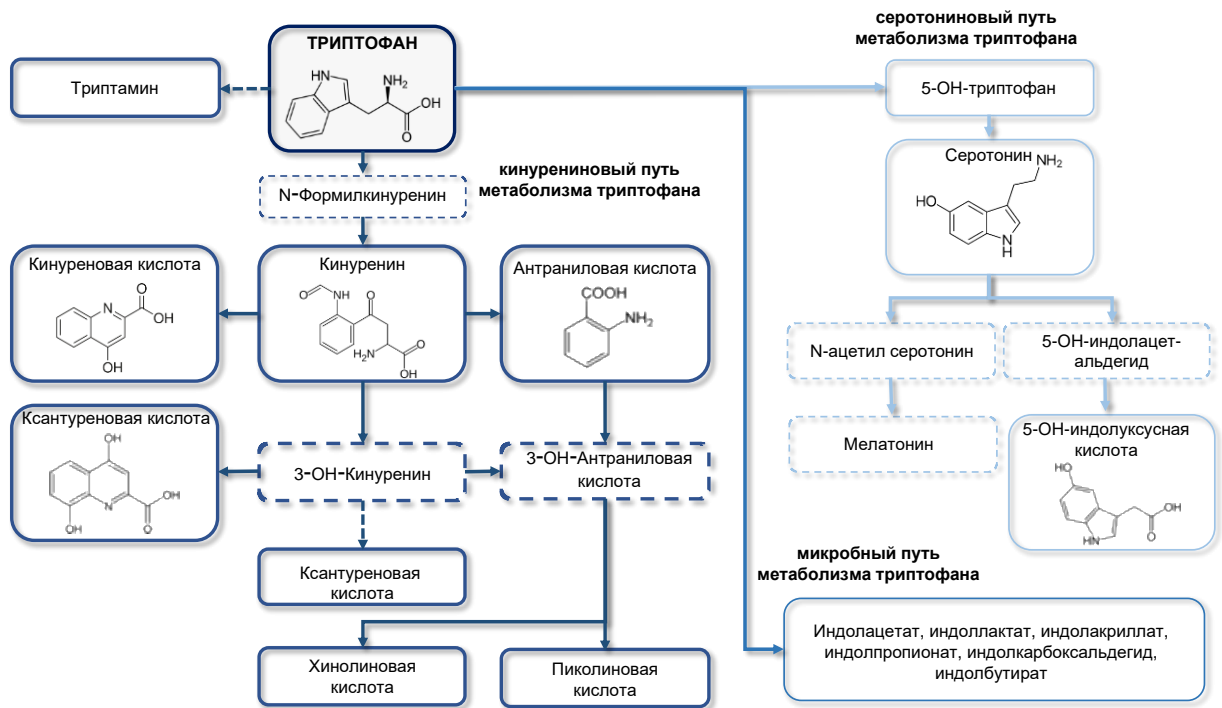
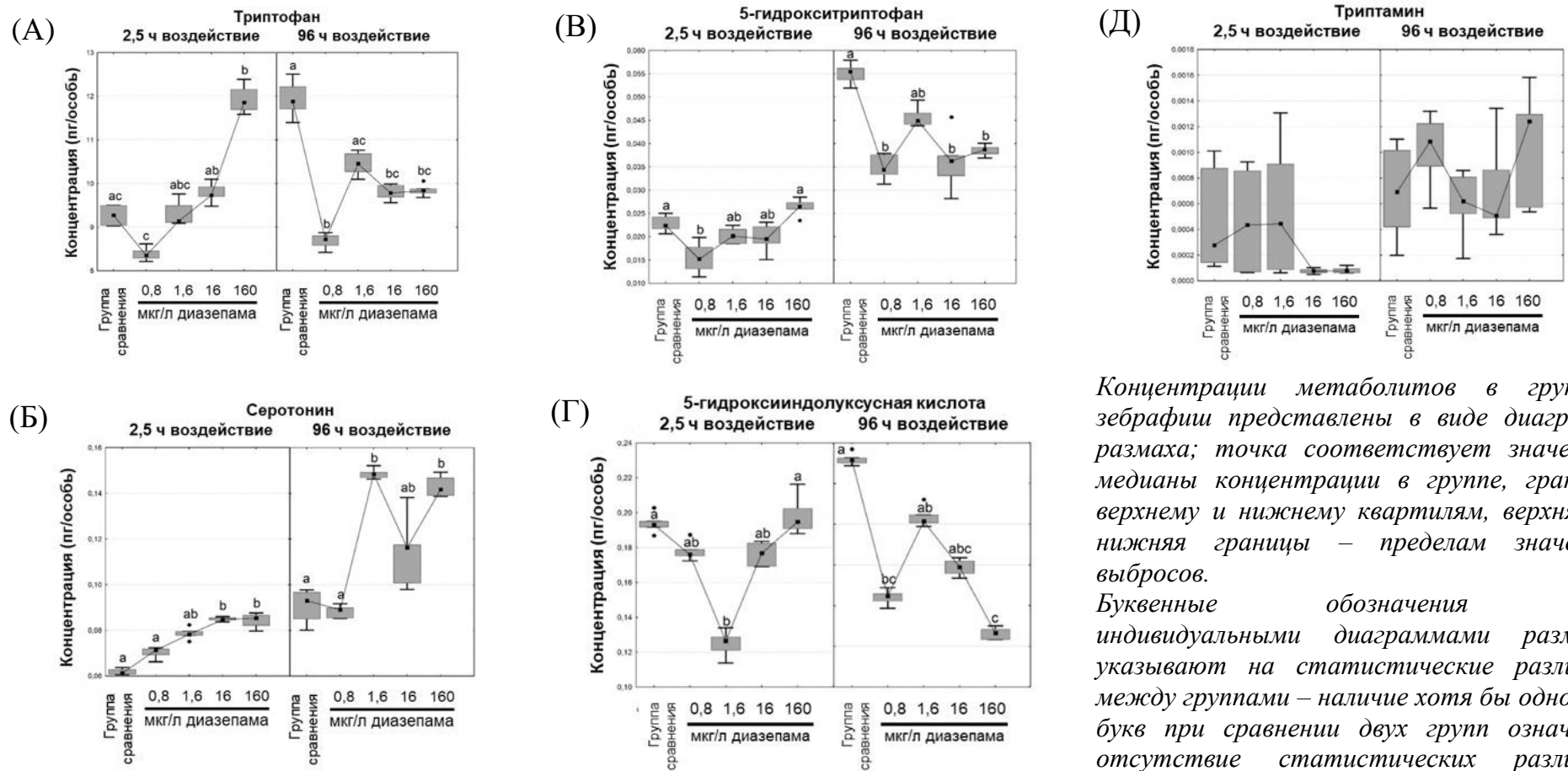


Рисунок 12 – Схема метаболизма триптофана через серотониновый, кинурениновый и микробный пути

Серотонинергическая система

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама вызывало увеличение концентраций триптофана (Рисунок 13А). В частности, у опытных групп №3-4, которые подвергались воздействию растворов диазепама с концентрациями 16 и 160 мкг/л соответственно, были обнаружены повышенные концентрации триптофана относительно группы сравнения. Опытные группы №3-4,

получавшие 16 и 160 мкг/л диазепама, показали повышенные концентрации триптофана по сравнению с опытной группой №1, получавшей 0,8 мкг/л диазепама (Рисунок 13А). Напротив, длительное воздействие (96 ч) диазепама вызвало уменьшение концентраций триптофана. Опытные группы №1, 3-4, получавшие 0,8, 16 и 160 мкг/л диазепама соответственно, показали статистически значимое сниженные концентрации триптофана по сравнению с контрольной группой (Рисунок 13А). Концентрации серотонина увеличивались в зависимости от увеличения концентраций диазепама в опытных группах во время краткосрочного воздействия (2,5 ч). Опытные группы №3-4, получавшие 16 и 160 мкг/л диазепама, показали повышение концентраций серотонина по сравнению с контрольной группой, а также по сравнению с опытной группой №1, получавшей 0,8 мкг/л (Рисунок 13Б). Длительное воздействие (96 ч) диазепама также вызывало повышение концентраций серотонина в опытных группах №2,4, получавших 1,6 и 160 мкг/л диазепама по сравнению с контрольной группой и опытной группой №1, получавшей 0,8 мкг/л диазепама (Рисунок 13Б). Концентрации 5-гидрокситриптофана после краткосрочного воздействия (2,5 ч) диазепама были завышены у опытной группы №4 по сравнению с опытной группой №1. После длительного воздействия (96 ч) диазепама концентрации 5-гидрокситриптофана были статистически ниже у опытных групп №1, №3-4 относительно группы сравнения (Рисунок 13В). Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама в концентрации 1,6 мкг/л на опытную группу №2 привело к снижению концентраций 5-гидроксииндолуксусной кислоты по сравнению с контрольной группой и опытной группой №4. Длительное воздействие (96 ч) диазепама привело к снижению концентраций 5-гидроксииндолуксусной кислоты у опытных групп №1 и №4 относительно группы сравнения (Рисунок 13Г).



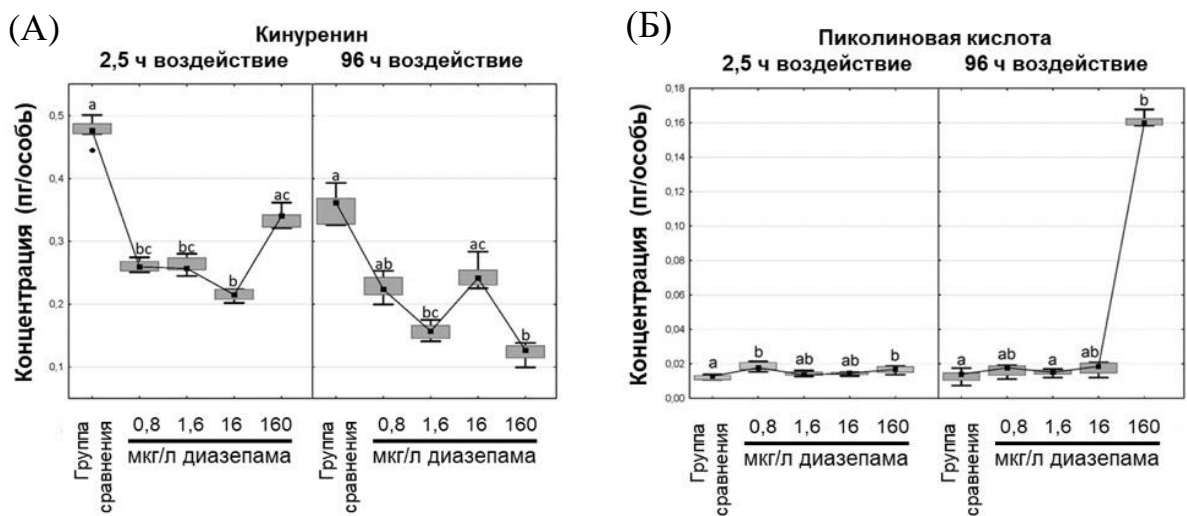
Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани - верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов.

Буквенные обозначения над индивидуальными диаграммами размаха указывают на статистические различия между группами – наличие хотя бы одной из букв при сравнении двух групп означает отсутствие статистических различий между ними.

Рисунок 13 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов серотонинергической системы от введенной дозы диазепам. Триптофан (А), серотонин (Б), 5-гидрокситриптофан (В), 5-гидроксииндолуксусная кислота (Г) и триптамин (Д)

Кинурениновый путь метаболизма триптофана

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама вызывало снижение концентраций кинуренина у опытной группы №3 по сравнению с контрольной группой и опытной группой №4 (Рисунок 14А). Длительное воздействие (96 ч) диазепама привело к уменьшению концентраций кинуренина у опытной группы №2 относительно группы сравнения, а также у опытной группы №4 относительно группы сравнения и опытной группы №3 (Рисунок 14А). Краткосрочное воздействие диазепама вызвало увеличение концентраций пиколиновой кислоты у опытных групп №1-4 по сравнению с контрольной группой. Длительное воздействие диазепама привело к увеличению концентраций пиколиновой кислоты у опытной группы №4 по сравнению с контрольной группой и опытной группой №2 (Рисунок 14Б).



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов.

Буквенные обозначения над индивидуальными диаграммами размаха указывают на статистические различия между группами – наличие хотя бы одной из букв при сравнении двух групп означает отсутствие статистических различий между ними.

Рисунок 14 – Графики зависимости концентраций метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана от введенной дозы диазепама. Кинуренин (А) и пиколиновая кислота (Б)

3.3.4. Дофаминергическая система

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (2,5 ч) и длительное (96 ч) воздействие диазепама в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути дофаминергической системы и адренергической системы (синтез катехоламинов). На Рисунке 15 представлена схема метаболизма фенилаланина по пути синтеза катехоламинов.

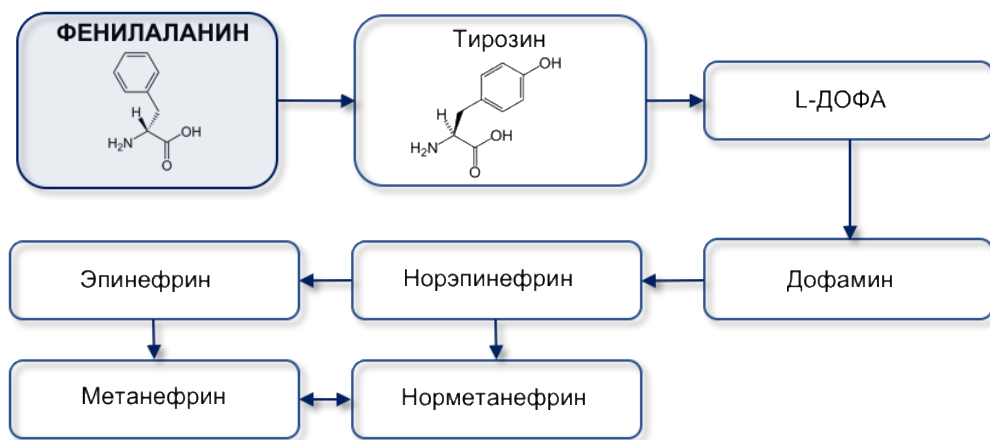


Рисунок 15 – Схема метаболизма фенилаланина

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама вызывало увеличение концентраций фенилаланина. В частности, опытная группа №4 рыб вида *Danio rerio*, получавшая 160 мкг/л диазепама, показала большие концентрации фенилаланина по сравнению с опытными группами №1 и №2, подвергавшихся воздействию 0,8 и 1,6 мкг/л (Рисунок 16А). После длительного воздействия (96 ч), концентрации фенилаланина в опытных группах №1, №3 и №4, получавших 0,8, 16 и 160 мкг/л диазепама, по сравнению с контрольной группой, были увеличены (Рисунок 16А). Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама вызывало увеличение концентраций тирозина в опытной группе №4, получавшей 160 мкг/л диазепама, по сравнению с опытными группами №1-2, получавшими 0,8 и 1,6 мкг/л, соответственно. Также, в опытной группе №1, получавшей 0,8 мкг/л диазепама, наблюдались сниженные концентрации

тирозина относительно группы сравнения (Рисунок 16Б). Напротив, длительное воздействие (96 ч) диазепама вызывало снижение концентраций тирозина. В частности, концентрации тирозина в опытной группе №3, подвергавшейся воздействию 16 мкг/л диазепама, были снижены относительно группы сравнения; помимо этого, опытная группа №4, подвергавшаяся воздействию 160 мкг/л диазепама, показала снижение концентраций тирозина по сравнению с опытной группой №2, получавшей 1,6 мкг/л диазепама и группой сравнения (Рисунок 16Б). Другие метаболиты, связанные с дофаминергической системой (L-ДОФА, дофамин, норадреналин, адреналин, норметанефрин и метанефрин), показывали нестабильные статистические различия среди опытных групп как после краткосрочного (2,5 ч), так и после длительного воздействия (96 ч). Единственная тенденция концентраций, которую можно было наблюдать, это резкое увеличение концентраций метаболитов в опытной группе №1, подвергавшейся воздействию 0,8 мкг/л диазепама в течение короткого промежутка времени с последующим трендом к снижению концентраций метаболитов (Рисунки 16В-Д и 17А-В).

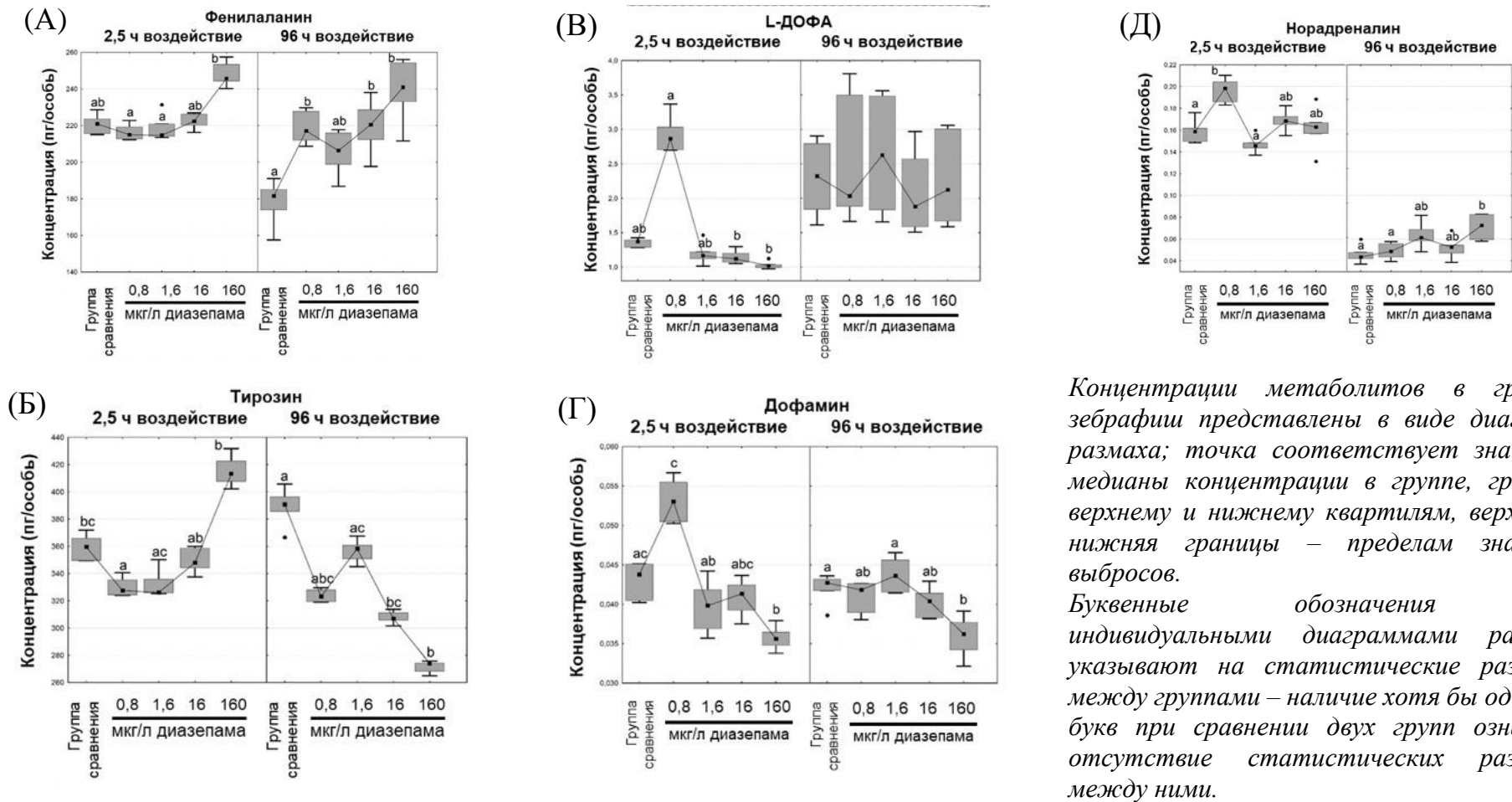
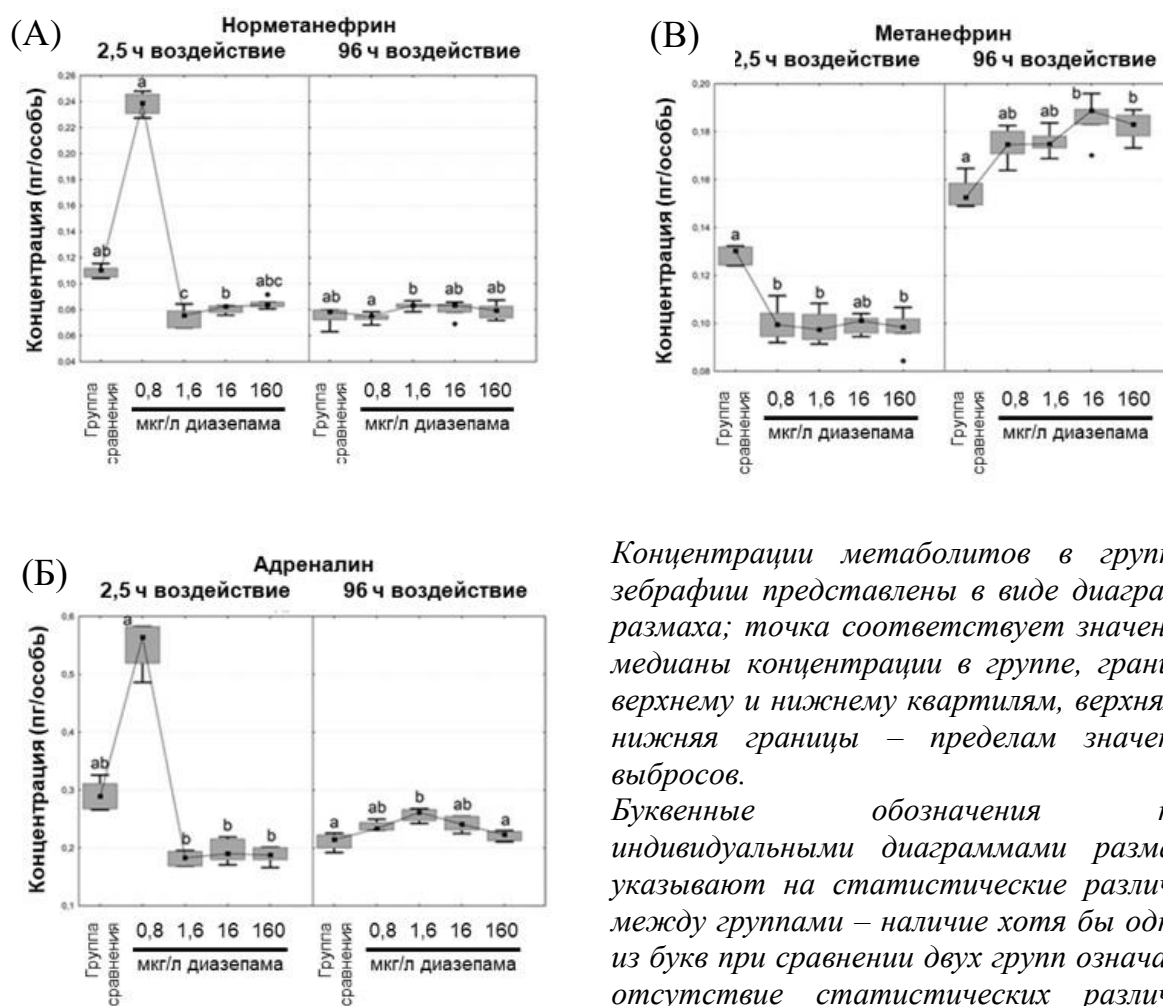


Рисунок 16 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов дофаминергической системы от введенной дозы диазепам (часть 1). Фенилаланин (А), тирозин (Б), L-ДОФА (В), дофамин (Г) и норадреналин (Д)



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов.

Буквенные обозначения над индивидуальными диаграммами размаха указывают на статистические различия между группами – наличие хотя бы одной из букв при сравнении двух групп означает отсутствие статистических различий между ними

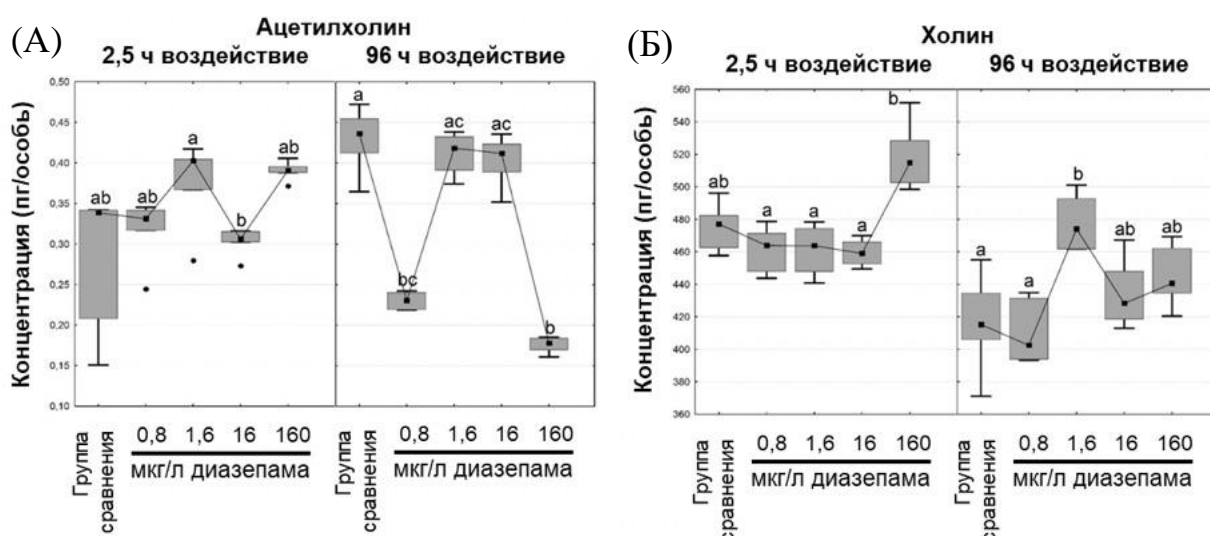
Рисунок 17 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов дофаминергической системы от введенной дозы диазепема (часть 2). Норметанефрин (А), адреналин (Б) и метанефрин (В)

3.3.5. Холинергическая система

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (2,5 ч) и длительное (96 ч) воздействие диазепема в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на метаболиты холинергической системы.

Концентрации холина и ацетилхолина изменялись как после краткосрочного (2,5 ч), так и после длительного воздействия (96 ч). В частности, концентрации ацетилхолина у опытной группы №3 были статистически ниже, чем у опытной группы №2 после краткосрочного

воздействия диазепама. После длительного воздействия диазепама, концентрации ацетилхолина у опытных групп №1 и №4 были снижены относительно группы сравнения (Рисунок 18А). Концентрации холина были повышены у опытной группы №4 по сравнению с опытными группами №1-3 после краткосрочного воздействия диазепама. Длительное воздействие диазепама привело к увеличению концентраций холина у опытной группы №2 по сравнению с контрольной группой и опытной группой №1 (Рисунок 18Б).



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов.

Буквенные обозначения над индивидуальными диаграммами размаха указывают на статистические различия между группами – наличие хотя бы одной из букв при сравнении двух групп означает отсутствие статистических различий между ними.

Рисунок 18 – Графики зависимости концентраций метаболитов холинергической системы от введенной дозы диазепама. Ацетилхолин (А) и холин (Б)

3.3.6. Прочие метаболиты, связанные с нейротрансмиссией

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (2,5 ч) и длительное (96 ч) воздействие диазепама в разных дозах на рыбах вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на

молекулярные пути микробного пути метаболизма триптофана, а также прочих метаболитов, связанных с нейротрансмиссией (кортизол, цитруллин, биоптерин, неоптерин).

Концентрации метаболитов микробного пути метаболизма триптофана (индол-3-карбоксальдегид, индол-3-уксусная кислота, индол-3-масляная кислота, индол-3-молочная кислота, индол-3-акриловая кислота и индол-3-пропионовая кислота) и прочих метаболитов, связанных с нейротрансмиссией (кортизол, цитруллин, биоптерин, неоптерин) изменялись независимо от концентраций диазепама как во время краткосрочного воздействия (2,5 ч), так и во время длительного воздействия (96 ч) диазепама в разных дозах на рыб вида *Danio rerio*.

3.4. Определение полуметальной концентрации 5F-АПИНАК

С целью определения рабочих концентраций растворов 5F-АПИНАК, было проведено определение полуметальной концентрации 5F-АПИНАК для эмбрионов рыб вида *Danio rerio*. Результаты определения полуметальной концентрации представлены в Таблице 12 и на Рисунке 19.

Таблица 12 – Выживаемость эмбрионов рыб вида *Danio rerio* при изучении полуметальной концентрации 5F-АПИНАК

Опытная группа	Количество эмбрионов в группе	Количество погибших эмбрионов	Выживаемость в группе (%)
10 мкМ 5F-АПИНАК	20	0	100
20 мкМ 5F-АПИНАК	20	2	90
40 мкМ 5F-АПИНАК	20	5	75
80 мкМ 5F-АПИНАК	20	13	35
100 мкМ 5F-АПИНАК	20	18	10
Положительный контроль (4 мг/л 3,4-дихлоранилина в 1% растворе ДМСО в среде E3)	20	15	25

Продолжение Таблицы 12.

Отрицательный контроль (среда E3)	20	1	95
Контроль раствора-носителя (1% раствор ДМСО в среде E3)	20	0	100

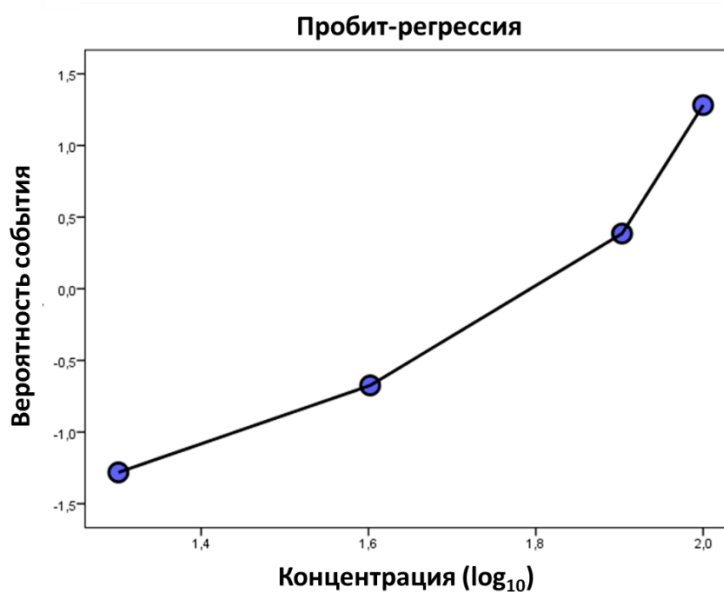


Рисунок 19 – График пробит-регрессии определения полулетальной концентрации 5F-АПИНАК

По результатам пробит-регрессионного анализа была рассчитана полулетальная концентрация 5F-АПИНАК равная 55,0 мкМ (95% доверительный интервал – 44,3-68,7 мкМ). Выживаемость эмбрионов в отрицательном контроле составила 95%, в контроле раствора-носителя – 100%; смертность в положительном контроле составила 75%. Данные показатели не превышают значений установленных критериев приемлемости эксперимента (выживаемость в отрицательном контроле и в контроле раствора-носителя – более 90%, смертность в положительном контроле – не менее 30%), что подтверждает достоверность проведенного исследования.

5F-АПИНАК продемонстрировал показатели токсичности на уровне других каннабиноидов. Так, для рыб вида *Danio rerio*, летальными

концентрациями Δ^9 -ТГК и синтетических каннабиноидов CP 55,940 и WIN 55,212-2 являются 10 мкМ, 50 мкМ и 3 мкМ, соответственно [45].

По результатам проведенного исследования и на основании данных о токсичности нефторированного аналога 5F-АПИНАК – АПИНАК [178, 179] – для проведения метаболомного анализа высшей дозой 5F-АПИНАК была выбрана концентрация 10 мкМ.

3.5. Исследование воздействия 5F-АПИНАК на метаболомный профиль рыб вида *Danio rerio*

Для установления возможности использования рыб *Danio rerio* с целью изучения метаболомных изменений, связанных с нейромедиаторами и метаболитами, близкими к нейромедиаторам, как ответ на введение веществ, действующих на ЦНС, было проведено фармакометаболомное исследование количественных изменений метаболитов участвующих в работе ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической /адренергической, холинергической системы, системы аспартата, кинуренинового, индольного путей метаболизма триптофана (микробиомный путь) и прочих метаболитов, относящихся к нейротрансмиссии, после введения 5F-АПИНАК в концентрациях 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 и 10 мкМ в среду обитания рыб вида *Danio rerio*. 5F-АПИНАК является фармакологическим веществом – агонистом каннабиноидных рецепторов. Выбор данного вещества основывался на основании отсутствия комплексных исследований в области изучения эффектов агонистов каннабиноидных рецепторов на нейромедиаторные системы ЦНС.

Список количественно измеряемых метаболитов представлен в Таблице 1. Методика их количественного определения была разработана и валидирована. Валидация методики количественного определения основных нейромедиаторов и связанных с нейротрансмиссией веществ методом ВЭЖХ-МС/МС представлена в главе 3, раздел 2.

Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного (4 ч) воздействия 5F-АПИНАК в широком концентрационном диапазоне представлены в Приложении А, Таблица А3. Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после длительного (96 ч) воздействия 5F-АПИНАК в широком концентрационном диапазоне представлены в Приложении А, Таблица А4.

3.5.1. Морфологические характеристики

Краткосрочное (4 ч) воздействие 5F-АПИНАК не вызвало морфологических изменений ни у одной из опытных групп. Долгосрочное (96 ч) воздействие раствора 5F-АПИНАК в концентрации 10 мкМ приводило к множественным морфологическим нарушениям в развитии мальков рыб вида *Danio rerio*, а именно: приблизительно 60% мальков не вылупились из хорионов, у 20% мальков было искривление позвоночника, а также у всех мальков была зафиксирована гиперпигментация тела (Рисунок 20).

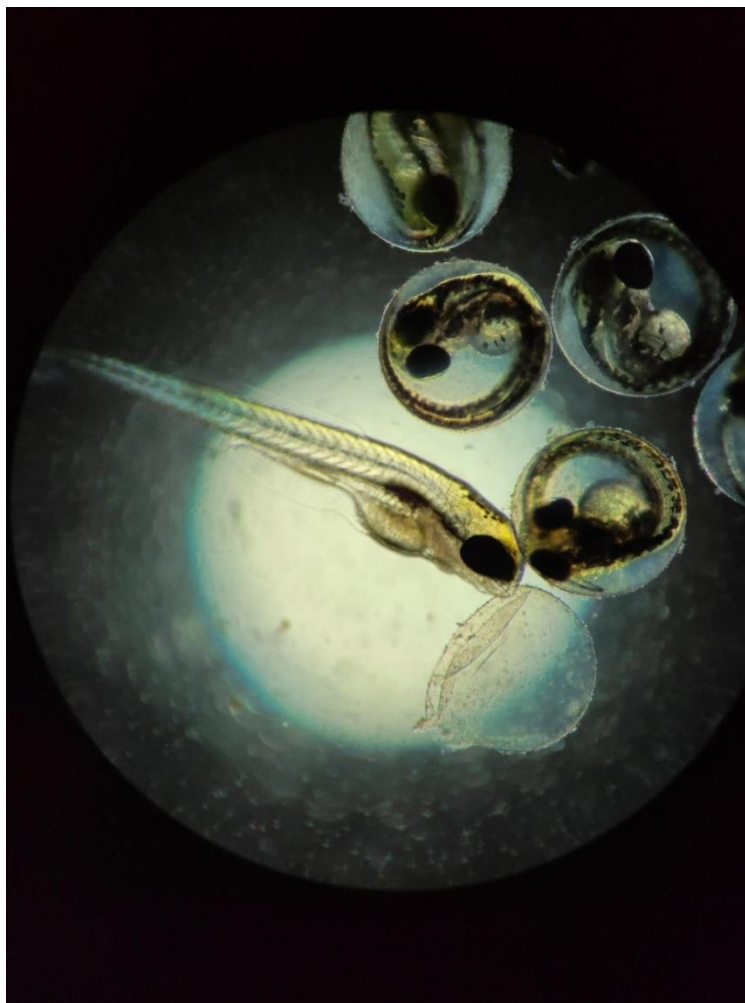


Рисунок 20 – Мальки рыб вида *Danio rerio*, подвергавшиеся воздействию 5F-АПИНАК в концентрации 10 мкМ в течение 4 дней

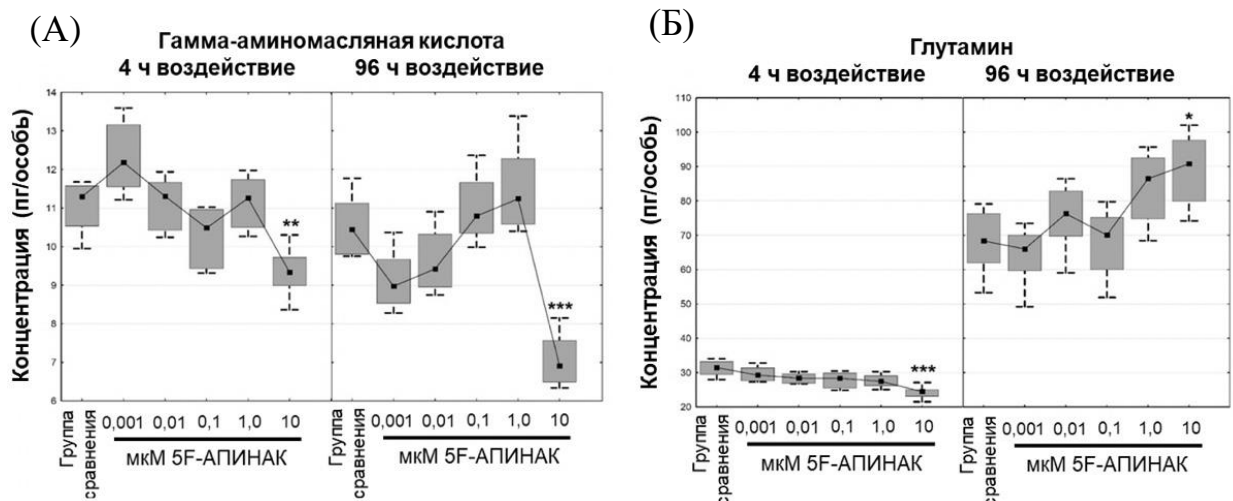
3.5.2. ГАМКергическая система

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (4 ч) и длительное (96 ч) воздействие 5F-АПИНАК в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути ГАМКергической системы.

Концентрации ГАМК были снижены у опытной группы №5, получавшей высшую дозу 5F-АПИНАК относительно группы сравнения как после краткосрочного, так и после длительного воздействия (96 ч) (Рисунок 21А).

Концентрации глутамина после краткосрочного воздействия (4 ч) показали наличие тенденции к снижению в зависимости от увеличения

концентрации 5F-АПИНАК, при этом единственная группа, у которой концентрации глутамина статистически значимо отличались от контрольной группы, была опытная группа №5, получавшая высшую дозу 5F-АПИНАК (Рисунок 21Б). Напротив, длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК вызывало увеличение концентраций глутамина, при этом опытная группа №5, получавшая высшую дозу 5F-АПИНАК, статистически отличалась от группы сравнения (Рисунок 21Б). Концентрации глутаминовой кислоты показывали некоторые статистически значимые отличия на промежутке вводимых доз, однако различий между опытными группами и группой сравнения зарегистрировано не было.



Концентрации метаболитов в группах рыб вида *Danio rerio* представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

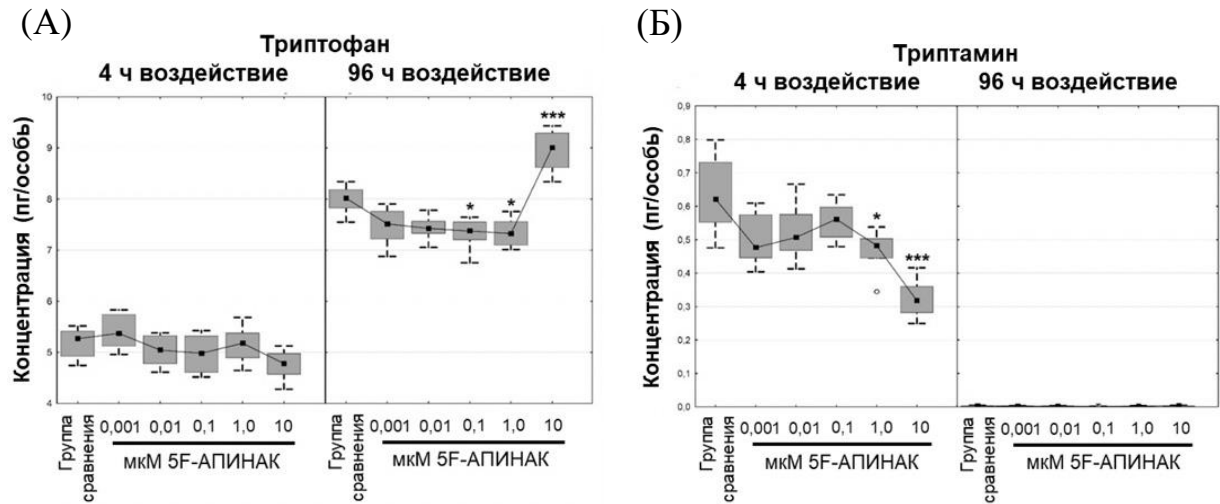
Рисунок 21 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов ГАМКергической системы от введенной дозы 5F-АПИНАК. ГАМК (А) и глутамин (Б)

3.5.3. Серотонинергическая система и кинурениновый путь метаболизма триптофана

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное воздействие (4 ч) и длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути серотонинергической системы и кинурениновый путь метаболизма триптофана.

Серотонинергическая система

Концентрации триптофана после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК статистически не отличались ни у одной из исследуемых групп (Рисунок 22А). Длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК вызывало уменьшение концентраций триптофана в опытных группах № 3-4, со статистически значимым увеличением концентраций у опытной группы №5, получавшей 10 мкМ 5F-АПИНАК, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 22А). Концентрации триптамина после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК уменьшались в зависимости от увеличения дозы 5F-АПИНАК с наличием статистических различий в опытных группах №4-5, получавших 1,0 и 10 мкМ 5F-АПИНАК, соответственно (Рисунок 22Б). Концентрации триптамина после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК статистически не отличались среди исследуемых групп, однако характеризовались очень малыми значениями (менее 0,005 пг/особь) (Рисунок 22Б). Концентрации 5-гидрокситриптофана, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты не показали статистических различий ни в одной из опытных групп.



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Рисунок 22 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов серотонинергической системы от введенной дозы 5F-АПИНАК. Триптофан (А) и триптамин (Б)

Кинурениновый путь метаболизма триптофана

Концентрации ксантуреновой кислоты не изменялись после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio*, однако длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК вызвало постепенное понижение концентраций ксантуреновой кислоты, которое сопровождалось резким подъемом у опытной группы №5, получавшей 10 мкМ 5F-АПИНАК (Рисунок 23А). Концентрации пиколиновой кислоты также не изменялись после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК, тогда как длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК в концентрациях 0,01, 1,0 и 10 мкМ вызвали резкий подъем концентраций пиколиновой кислоты у опытных групп № 2, № 4-5, а также снижение концентраций пиколиновой кислоты у опытной группы №3 относительно группы сравнения (Рисунок 23Б).

Концентрации анраниловой кислоты у опытных групп №1-3 после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК были снижены по сравнению с контрольной группой, а у опытной группы №4 были повышены (Рисунок 23В). Концентрации кинуренина после краткосрочного воздействия (4 ч) у опытных групп №1 и №4 были снижены по сравнению с контрольной группой, в то время как у опытной группы №2 концентрации кинуренина были повышены по сравнению с контрольной группой. Концентрации кинуренина после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК были снижены у опытных групп №1, №3 и №5 относительно группы сравнения (Рисунок 23Г). Концентрации кинуреновой кислоты после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК были снижены у опытных групп №1 и №4 по сравнению с контрольной группой, в то время как концентрации кинуреновой кислоты у опытной группы №2 были повышены относительно группы сравнения (Рисунок 23Д).

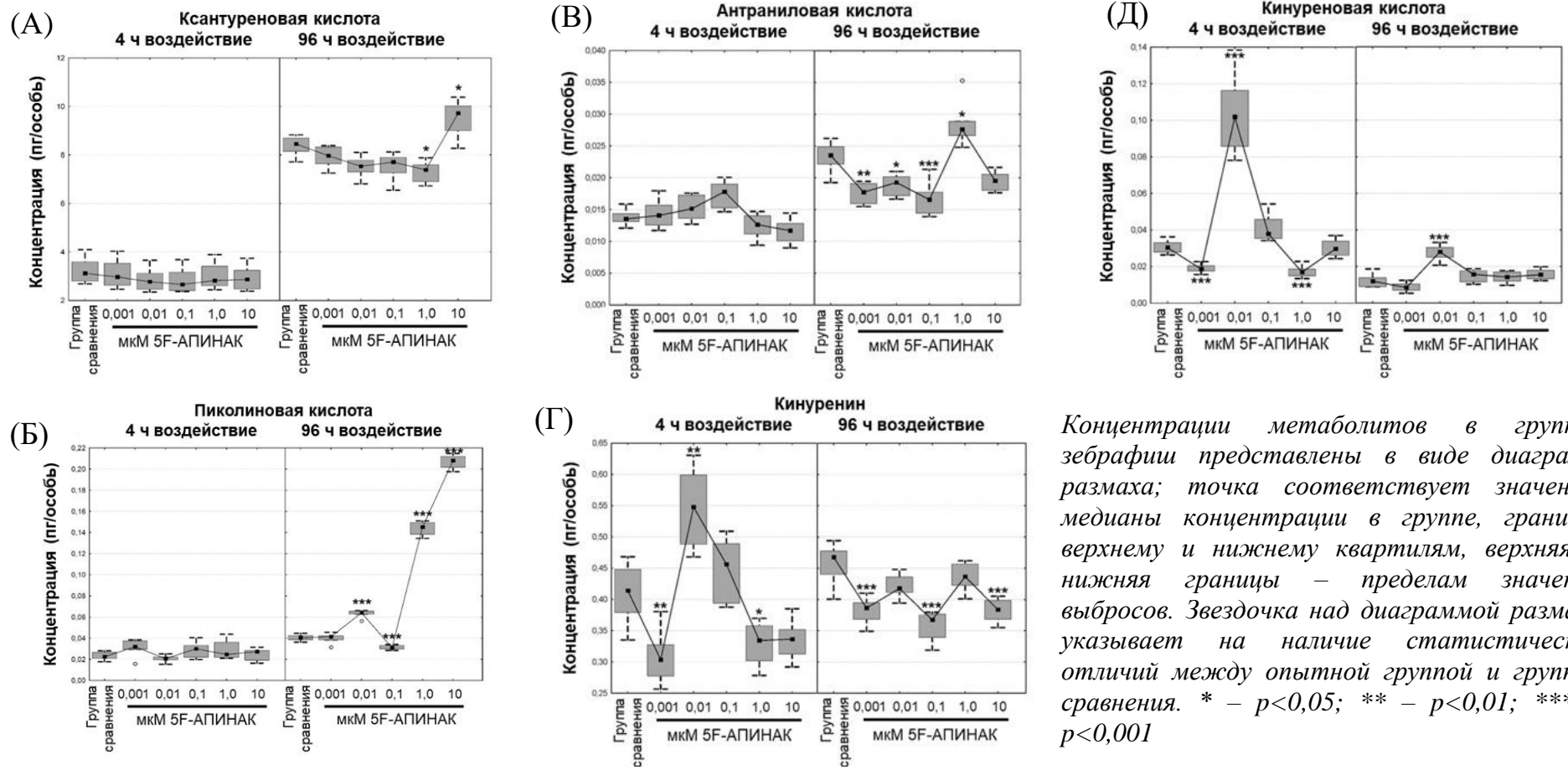


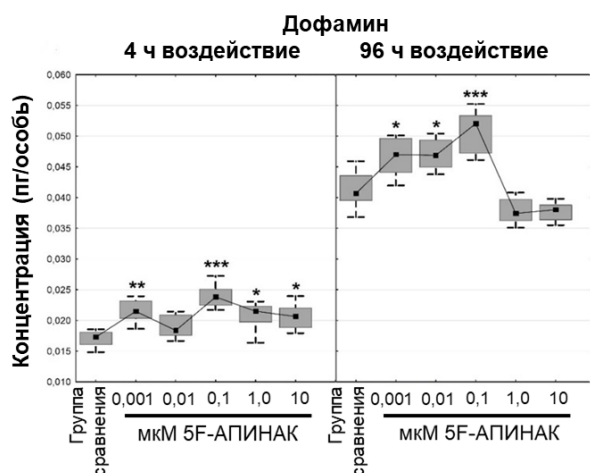
Рисунок 23 – Графики зависимости концентраций основных метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана от введенной дозы 5F-АПИПАК. Ксантуреновая кислота (А), пиколиновая кислота (Б), антраниловая кислота (В), кинуренин (Г) и кинуреновая кислота (Д)

3.5.4. Дофаминергическая система

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (4 ч) и длительное (96 ч) воздействие 5F-АПИНАК в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути дофаминергической и адренергической систем.

Краткосрочное воздействие (4 ч) 5F-АПИНАК вызвало увеличение концентраций дофамина у рыб вида *Danio rerio* в опытных группах №1, №3-5 относительно группы сравнения. Длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК вызывало увеличение концентраций дофамина в опытных группах №1-3 по сравнению с контрольной группой, однако опытные группы №4-5, подвергавшиеся воздействию 1,0 и 10 мкМ 5F-АПИНАК, показали тенденцию к снижению концентраций дофамина по сравнению с контрольной группой (Рисунок 24).

Концентрации тирозина были снижены у опытной группы №5 по сравнению с контрольной группой после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК. После длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК концентрации тирозина были снижены у опытной группы №3 по сравнению с контрольной группой. L-ДОФА был повышен у опытной группы №3 относительно группы сравнения после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК. Концентрации норметанефрина у опытной группы №5 также были ниже по сравнению с контрольной группой после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК.



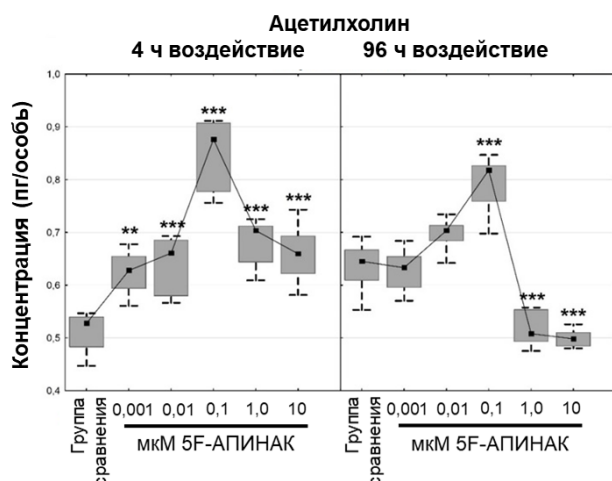
Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Рисунок 24 – График зависимости концентраций дофамина от введенной дозы 5F-АПИНАК

3.5.5. Холинергическая система

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (4 ч) и длительное (96 ч) воздействие 5F-АПИНАК в разных дозах на рыб вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути холинергической системы.

Краткосрочное воздействие (4 ч) 5F-АПИНАК вызывало увеличение концентраций ацетилхолина у рыб вида *Danio rerio* во всех опытных группах. Длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК привело к схожему тренду увеличения концентраций ацетилхолина, однако статистически значимое увеличение концентраций ацетилхолина по сравнению с контрольной группой было зафиксировано только у опытной группы №3. В то же время, опытные группы №4-5, получавшие 1,0 и 10 мкМ 5F-АПИНАК, показали значительное снижение концентраций ацетилхолина по сравнению с контрольной группой (Рисунок 25). Концентрации холина не отличались у опытных групп относительно группы сравнения.



Концентрации метаболитов в группах зебрафиш представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Рисунок 25 – График зависимости концентраций ацетилхолина от введенной дозы 5F-АПИНАК

3.5.6. Прочие метаболиты, связанные с нейротрансмиссией

В рамках данного раздела изучалось краткосрочное (4 ч) и длительное (96 ч) воздействие 5F-АПИНАК в разных дозах на рыбах вида *Danio rerio* как экспериментальных животных для исследования его влияния на молекулярные пути микробного пути метаболизма триптофана, а также прочих метаболитов, связанных с нейротрансмиссией (кортизол, цитруллин, биоптерин, неоптерин).

Концентрации аспарагиновой кислоты были снижены у опытных групп №3 и №5 по сравнению с контрольной группой после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК.

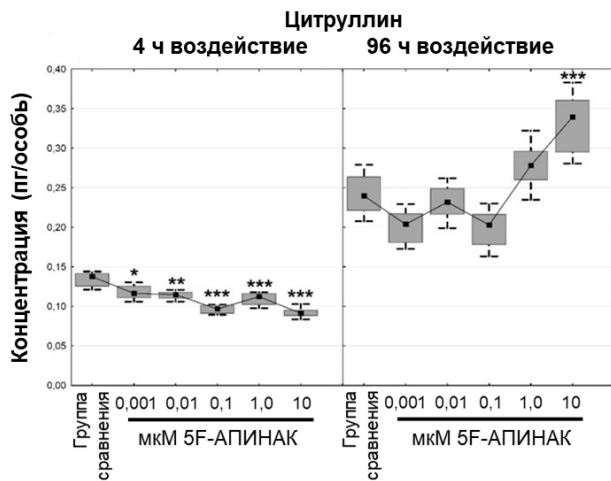
Концентрации биоптерина были статистически выше у опытных групп №1 и №3-5 относительно группы сравнения после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК.

Концентрации индол-3-карбоксальдегида также были снижены у опытной группы №5 по сравнению с контрольной после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК, а также у опытных групп №3 и №5 по сравнению с контрольной после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК.

Концентрации индол-3-карбоксальдегида после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК были повышены у опытной группы №4 по сравнению с контрольной.

Концентрации аспарагина, кортизола, неоптерина, а также таких метаболитов микробного пути метаболизма триптофана, как индол-3-уксусная кислота, индол-3-масляная кислота, индол-3-молочная кислота, индол-3-акриловая кислота и индол-3-пропионовая кислота не изменялись у опытных групп по сравнению с контрольной как после краткосрочного (4 ч), так и после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК.

Концентрации цитруллина после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК были статистически ниже у всех опытных групп относительно группы сравнения, однако длительное воздействие (96 ч) 5F-АПИНАК вызвало увеличение концентраций цитруллина у опытной группы №5 по сравнению с контрольной (Рисунок 26).



Концентрации метаболитов в группах зебрафии представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Рисунок 26 – График зависимости концентраций цитруллина от введенной дозы 5F-АПИНАК

3.6. Исследование воздействия 5F-АПИНАК на поведенческие реакции рыб вида *Danio rerio*

С целью подтверждения влияния 5F-АПИНАК на ЦНС, а также для установления связи метаболомных изменений концентраций нейромедиаторов у рыб вида *Danio rerio* как ответа на введение вещества, действующего на ЦНС, был проведен поведенческий анализ рыб вида *Danio rerio* после воздействия 5F-АПИНАК.

Кратковременное воздействие (4 ч) 5F-АПИНАК на мальков рыб вида *Danio rerio* дозозависимо уменьшало общее пройденное расстояние (Таблица 13, Рисунки 27 и 29) [23, 25, 40]. При длительном воздействии (48 ч) 5F-АПИНАК также наблюдалось снижение общих пройденных расстояний мальками зебрафиш (Таблица 13, Рисунки 28 и 29) [23, 168, 169]. Воздействие самой высокой дозы 5F-АПИНАК (10 мкМ) вызывало резкое снижение двигательной активности сразу после введения (Рисунок 27), которое сохранялось вплоть до второго дня воздействия (Рисунок 28) [45].

Таблица 13 – Значения общих пройденных расстояний мальками рыб вида *Danio rerio* во время 4-х часового и 48-ми часового воздействия 5F-АПИНАК

Общее пройденное расстояние		
Группы	Среднее \pm стандартное отклонение (мм)	<i>p</i> уровень значимости по сравнению с группой контроля
4-х часовое воздействие		
Группа сравнения	9957,3 \pm 885,5	—
Опытная группа (0,001 мкМ)	8140,2 \pm 882,7	НЗ*
Опытная группа (0,01 мкМ)	7969,8 \pm 530,4	НЗ*
Опытная группа (0,1 мкМ)	7518,0 \pm 533,5	>0,01
Опытная группа (1,0 мкМ)	5496,1 \pm 461,3	>0,001
Опытная группа (10 мкМ)	3608,4 \pm 285,8	>0,001
48-ми часовое воздействие		
Группа сравнения	51718,4 \pm 3018,6	—

Продолжение Таблицы 13.

Опытная группа (0,001 мкМ)	47797,4±2271,9	НЗ*
Опытная группа (0,01 мкМ)	45747,2±2515,5	>0,01
Опытная группа (0,1 мкМ)	46283,6±2156,1	>0,05
Опытная группа (1,0 мкМ)	43150,3±2098,0	>0,001
Опытная группа (10 мкМ)	29406,8±1783,8	>0,001

* – статистически не значимые отличия ($p > 0,05$).

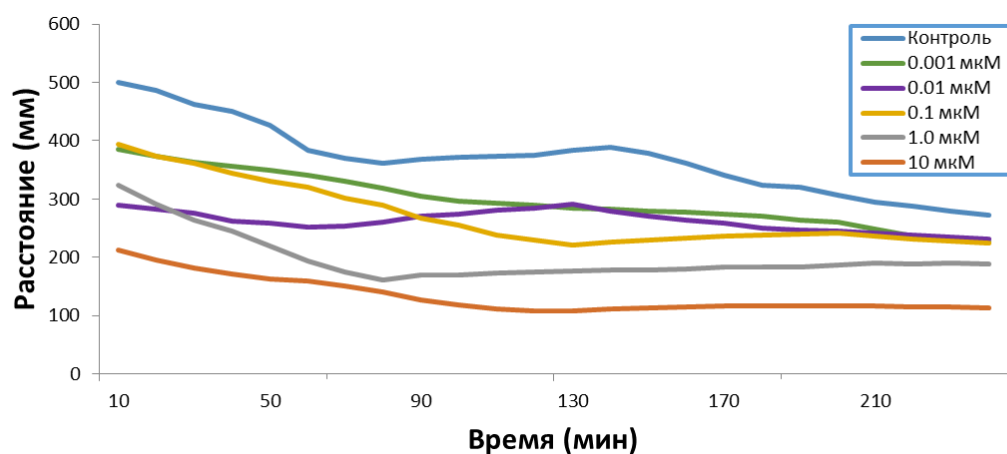


Рисунок 27 – Общее расстояние, пройденное мальками рыб вида *Danio rerio* на протяжении 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

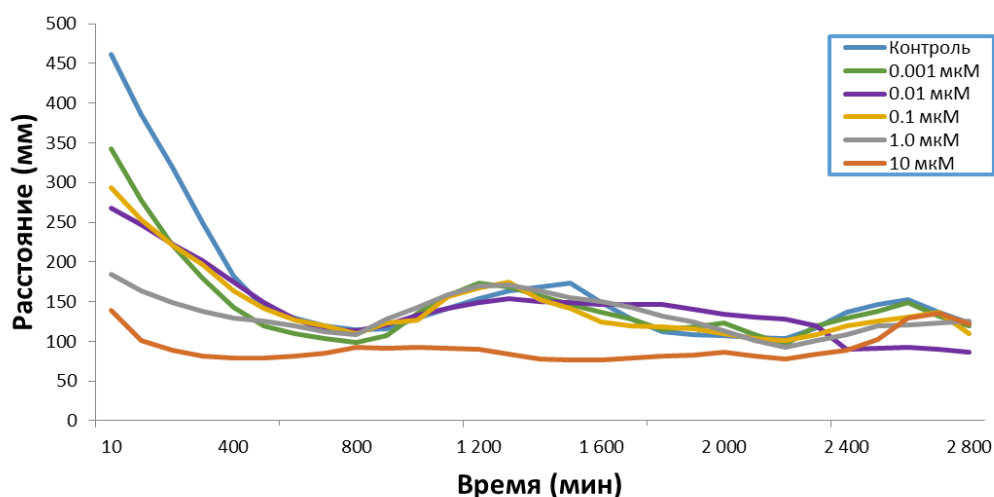


Рисунок 28 – Общее расстояние, пройденное мальками рыб вида *Danio rerio* на протяжении 48-ми часового воздействия 5F-АПИНАК

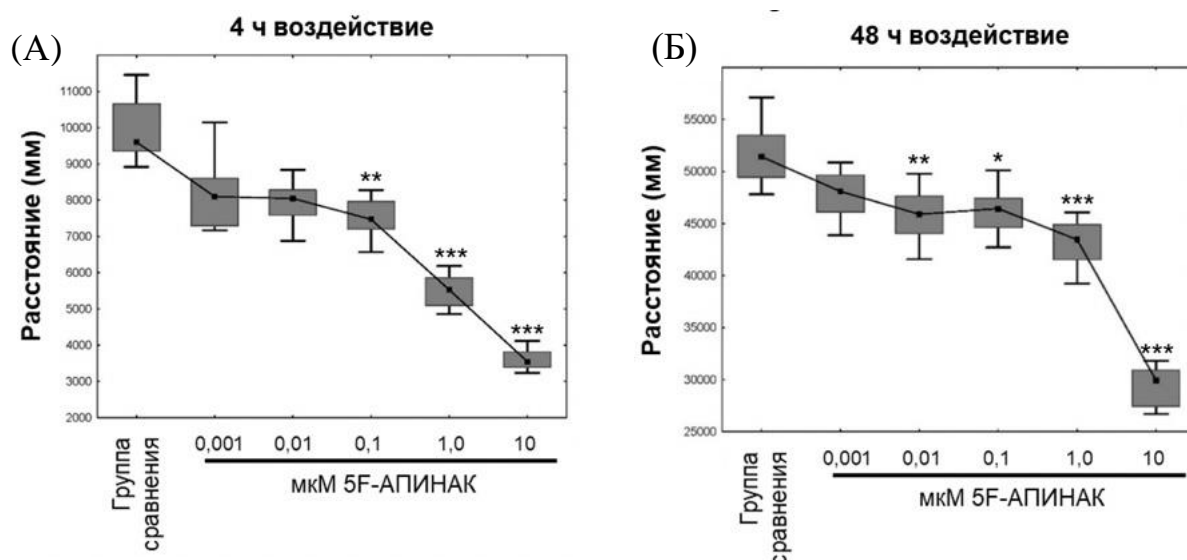


Рисунок 29 – Значения общих пройденных расстояний мальками рыб вида *Danio rerio* во время 4-х часового (А) и 48-ми часового воздействия 5F-АПИАКА (Б)

Значения пройденных расстояний группами рыб вида *Danio rerio* представлены в виде диаграмм размаха; точка соответствует значению медианы концентрации в группе, грани – верхнему и нижнему квартилям, верхняя и нижняя границы – пределам значений выбросов. Звездочка над диаграммой размаха указывает на наличие статистических отличий между опытной группой и группой сравнения. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Анализ данных о пройденном мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянии во время длительного воздействия 5F-АПИАКА показал, что на активность мальков рыб вида *Danio rerio* также влияло время суток: в дополнение к результатам 4-х часового воздействия, эта модель показала, что животные были более активны в течение дневного времени [23]. Интересно, что самая высокая доза ухудшала способность синхронизировать двигательную активность с дневной фазой, что проявлялось в отсутствии различий в пройденном расстоянии в светлое и темное время суток.

Некоторые нейромедиаторы показали статистически значимые корреляции с общими пройденными расстояниями. Результаты корреляционного анализа представлены в Таблице 14 и на Рисунках 30-36.

Таблица 14 – Показатели корреляционной зависимости между концентрациями эндогенных метаболитов и пройденными мальками рыб вида *Danio rerio* расстояниями во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

Метаболит	Коэффициент корреляции r	p-уровень значимости
Гамма-аминомасляная кислота	0,58	< 0,001
Глутаминовая кислота	0,22	–
Глутамин	0,81	< 0,001
Триптофан	0,47	< 0,01
5-гидрокситриптофан	0,06	–
Серотонин	0,11	–
5-гидроксииндолуксусная кислота	0,13	–
Триптамин	0,82	< 0,001
Фенилаланин	0,52	< 0,01
Тирозин	0,57	< 0,001
L-ДОФА	-0,08	–
Дофамин	-0,18	–
Норадреналин	0,21	–
Норметанефрин	0,50	< 0,01
Адреналин	0,05	–
Метанефрин	0,16	–
Аспарагиновая кислота	0,62	< 0,001
Аспарагин	0,33	< 0,05
Ацетилхолин	-0,25	–
Холин	0,53	< 0,001
Кинуренин	0,42	< 0,05
Кинуреновая кислота	0,23	–
Антралиловая кислота	0,51	< 0,01
Ксантуреновая кислота	0,27	–
Хинолиновая кислота	0,45	< 0,01
Пиколиновая кислота	0,04	–
Индол-3-карбоксальдегид	0,55	< 0,001
Индол-3-уксусная кислота	0,06	–
Индол-3-масляная кислота	0,22	–
Индол-3-молочная кислота	0,29	–
Индол-3-акриловая кислота	0,35	< 0,05
Индол-3-пропионовая кислота	0,39	< 0,05
Кортизол	0,25	–
Цитруллин	0,77	< 0,001
Биоптерин	0,06	–
Неоптерин	0,25	–

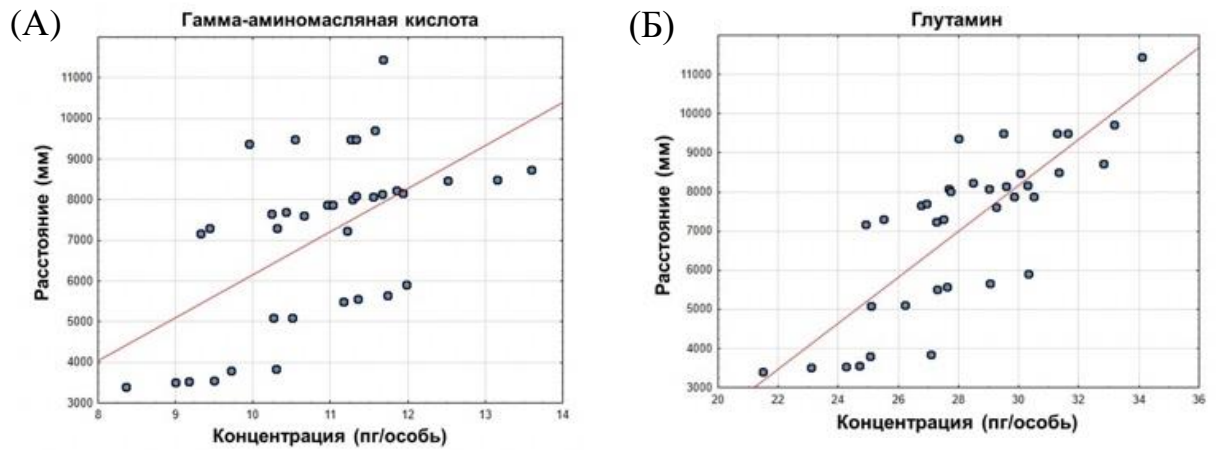


Рисунок 30 – Корреляционная зависимость между концентрациями ГАМК (А), глутамина (Б) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

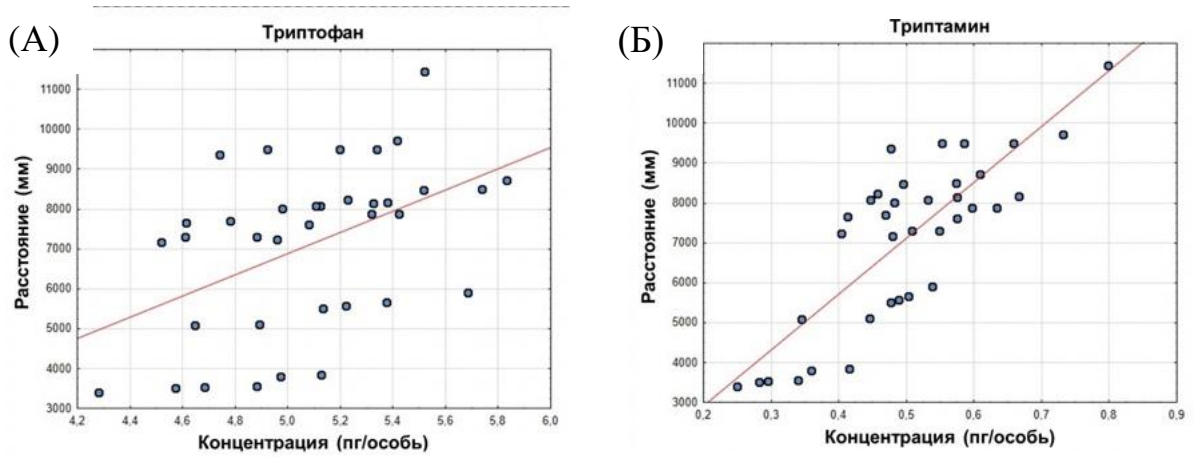


Рисунок 31 – Корреляционная зависимость между концентрациями триптофана (А), триптамина (Б) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

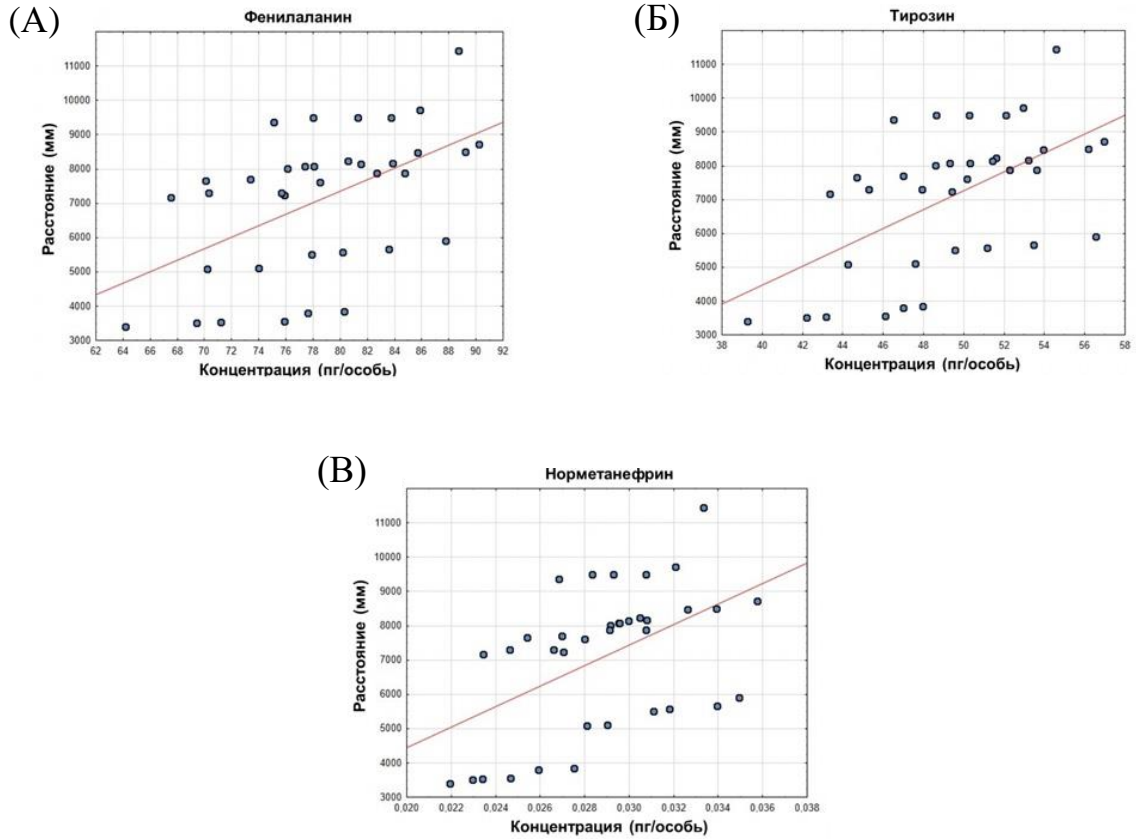


Рисунок 32 – Корреляционная зависимость между концентрациями фенилаланина (А), тирозина (Б), норметанефрина (В) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

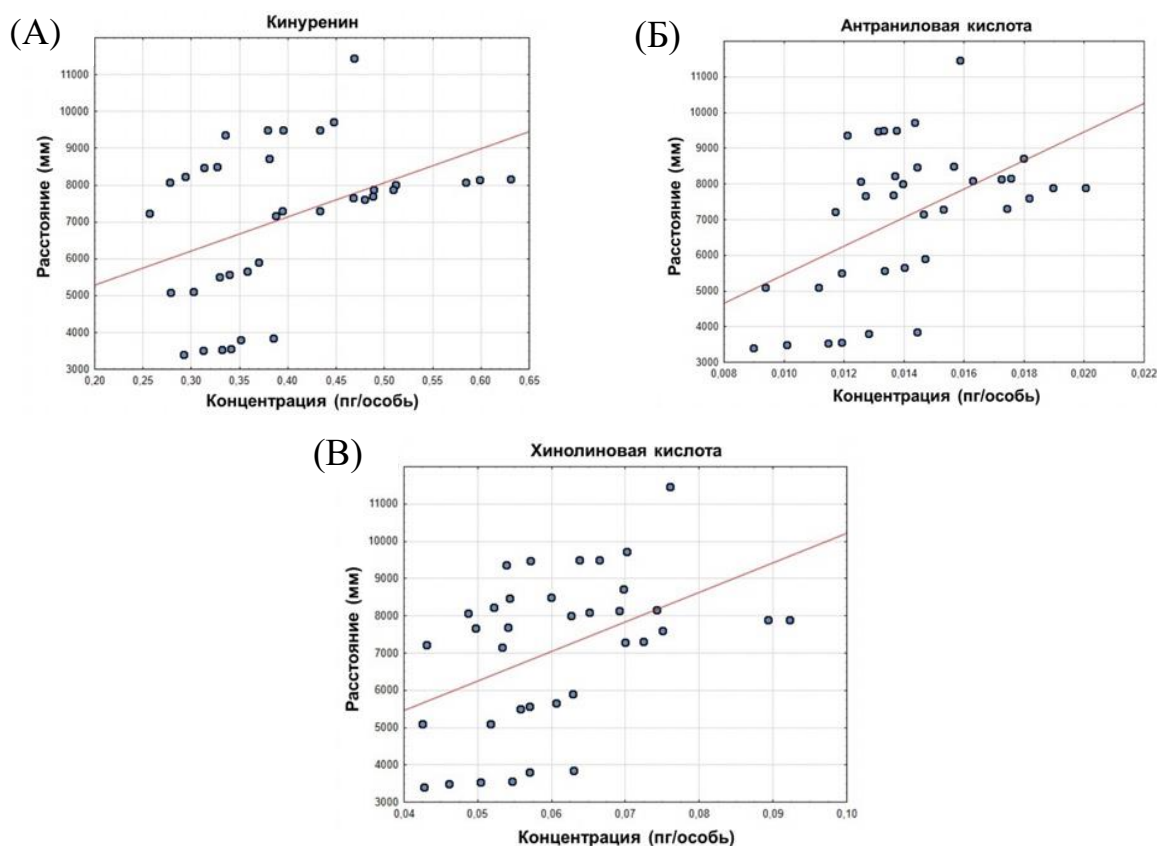


Рисунок 33 – Корреляционная зависимость между концентрациями кинуренина (А), антрилиловой кислоты (Б), хинолиновой кислоты (В) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

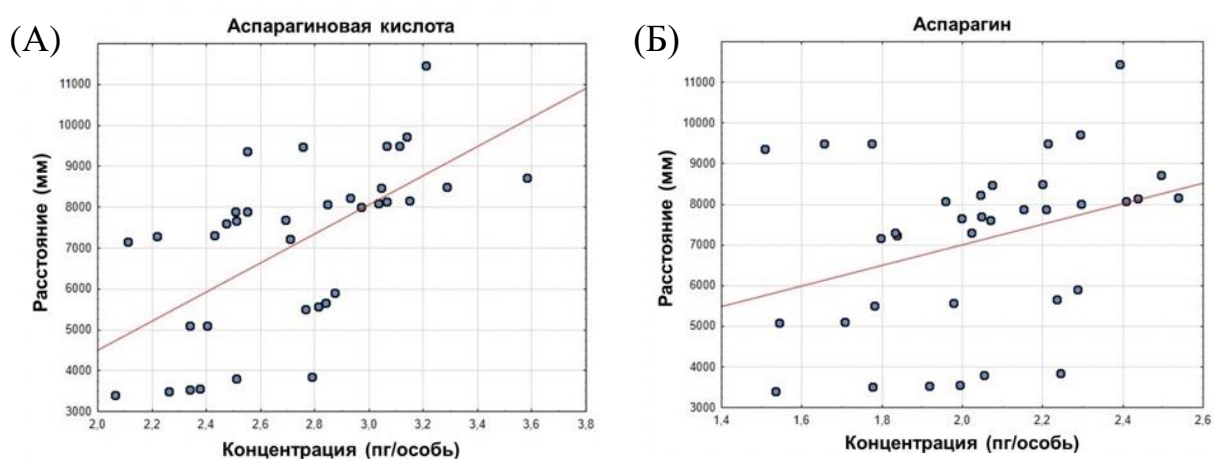


Рисунок 34 – Корреляционная зависимость между концентрациями аспарагиновой кислоты (А), аспарагина (Б) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

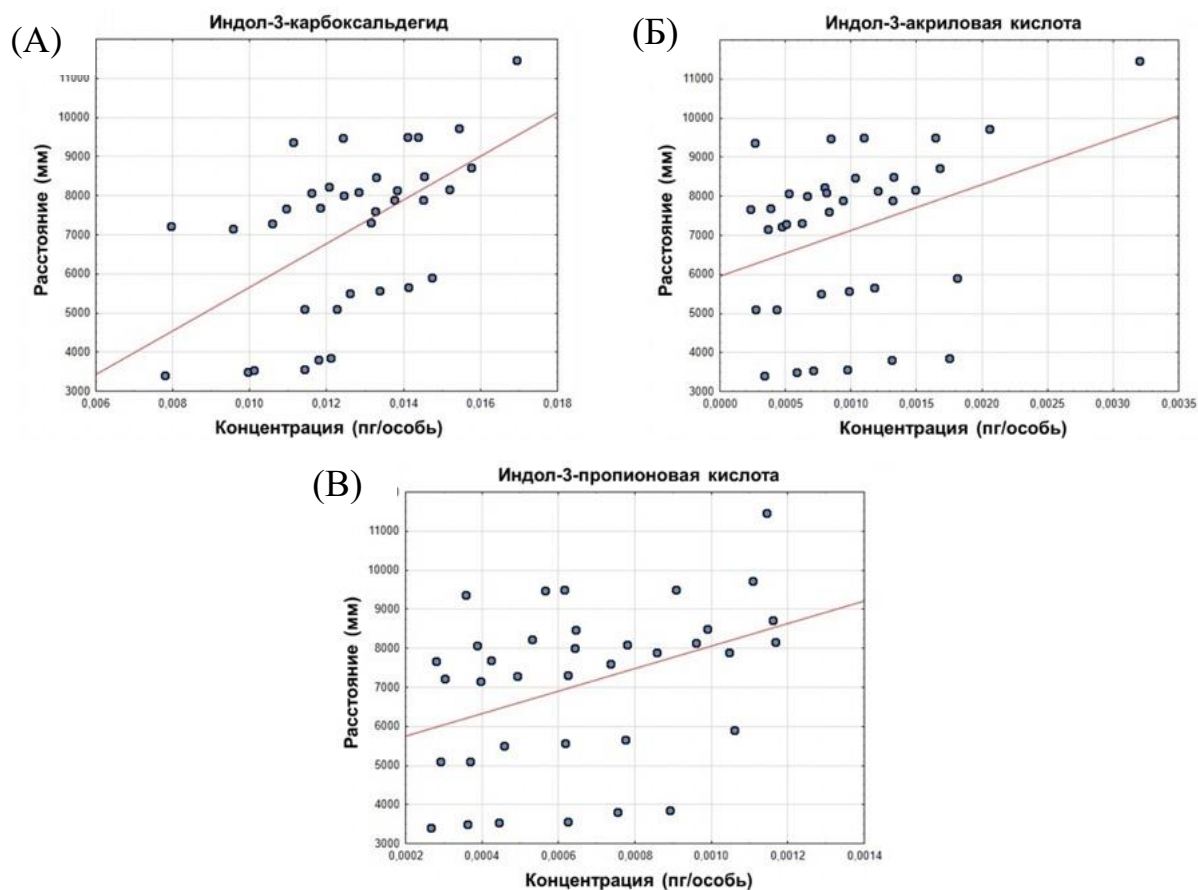


Рисунок 35 – Корреляционная зависимость между концентрациями индол-3-карбоксальдегида (А), индол-3-акриловой кислоты (Б), индол-3-пропионовой кислоты (В) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

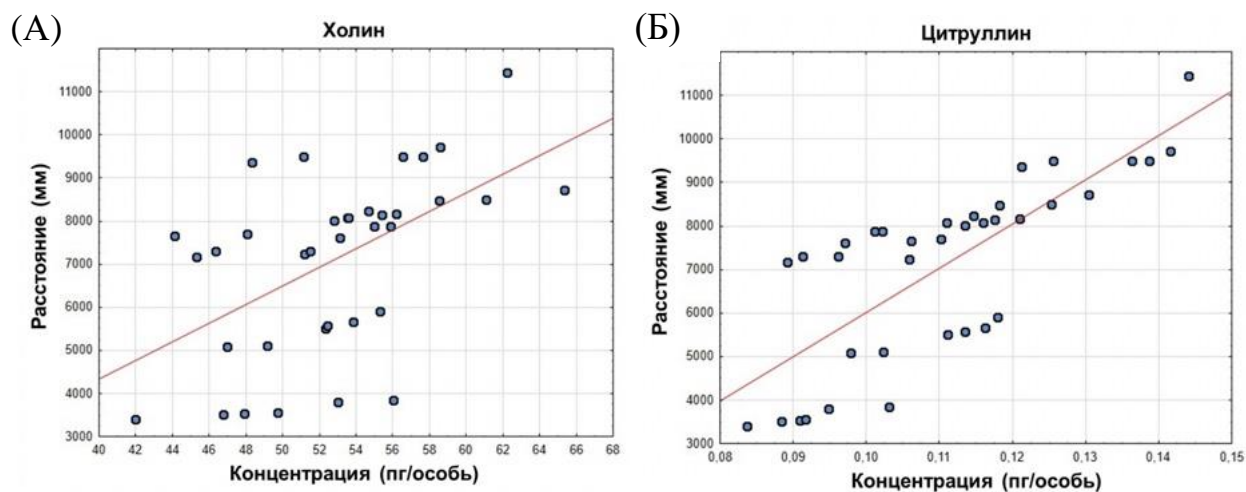


Рисунок 36 – Корреляционная зависимость между концентрациями холина (А), цитруллина (Б) и пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием во время 4-х часового воздействия 5F-АПИНАК

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

Был представлен подход для нецелевого метаболомного профилирования образцов проб рыб вида *Danio rerio* на примере воздействия диазепама. Был показан метод обработки результатов нецелевого метаболомного профилирования, включающий в себя анализ главных компонент и дискриминантный анализ ортогональных проекций на скрытые структуры для выделения метаболитов, чей концентрационный уровень значительно изменился в ответ на воздействие исследуемого фармакологического вещества.

Было продемонстрировано применение целевого фармакометаболомного профилирования образцов рыб вида *Danio rerio* под воздействием диазепама и 5F-АПИНАК, включающее в себя изучение профилей нейромедиаторов и эндогенных соединений, связанных с нейротрансмиссией.

Воздействие диазепама приводит к изменению концентраций эндогенных метаболитов, связанных с нейротрансмиссией, у рыб вида *Danio rerio*, следовательно, данный модельный организм может быть использован в качестве биологической модели для изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия с использованием фармакометаболомных методов. Также было доказано, что диазепам, являясь по механизму действия веществом, воздействующим на рецепторы ГАМК_A, способен вызывать изменения в концентрациях эндогенных метаболитов многих систем нейромедиаторов, включая серотонинергическую, дофаминергическую, холинергическую системы и систему аспартата. Также примечательным является факт увеличения концентраций аспарагиновой кислоты у групп рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию диазепама, что может говорить о реализации нейротоксических эффектов через NMDA-рецепторную систему.

Воздействие 5F-АПИНАК на мальков рыб вида *Danio rerio* приводило к изменению концентраций многих эндогенных метаболитов, связанных с нейротрансмиссией. Также одним из результатов эксперимента по воздействию 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* было проявление тератогенного действия этого вещества в концентрации 10 мкМ. Данные, полученные с помощью фармакометаболических методов, могут дополнить сведения о механизме действия синтетических каннабиноидов.

Острое воздействие 5F-АПИНАК дозозависимо снижало двигательную активность рыб вида *Danio rerio*, что согласуется с литературными данными в экспериментах и на грызунах, и на рыбах вида *Danio rerio*, из чего можно заключить, что *Danio rerio* можно использовать как инструмент быстрого предварительного скрининга поведенческой и неврологической активности физиологически активных веществ [23].

Стоит, однако, отметить, что у каждой биологической модели есть свои сильные и слабые стороны, например, отрицательная корреляция между эволюционным родством с людьми и экспериментальными соответствиями. Кроме того, следует учитывать, что результаты поведенческих анализов варьируют у разных штаммов рыб вида *Danio rerio* [22, 23], однако этот эффект межиндивидуальной изменчивости [22, 23] может быть компенсирован высокой производительностью и пропускной способностью животной модели.

5F-АПИНАК в дозе 10 мкМ (наибольшая использованная) оказывал влияние на циркадный ритм мальков рыб вида *Danio rerio*. Таким образом, можно предположить, что эта биологическая модель может быть применена для изучения изменений циркадных ритмов, вызываемых физиологически активными веществами [22, 23].

Биологические образцы, приготовленные из мальков рыб вида *Danio rerio*, содержат, помимо прочих органов, мозг исследуемых животных, что делает возможным определение целевой панели эндогенных метаболитов, связанных с нейротрансмиссией, в одном образце. Это приводит к

существенному ускорению и упрощению процесса исследования фармакологических эффектов химических субстанций нейротропного действия методами фармакометаболического анализа по сравнению с экспериментами на традиционных моделях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование трансляционных подходов, а также новых животных моделей в области доклинических исследований фармакологически активных веществ является неотъемлемой частью модернизации экспериментальной фармакологии. Проведенные исследования позволили разработать методологические подходы к изучению фармакологических эффектов физиологически активных веществ на рыбах вида *Danio rerio* как экспериментальных животных, применяя методы метаболомного профилирования.

На первом этапе необходимо установить метаболические пути, наиболее значимо изменяющиеся при воздействии исследуемых веществ. При исследовании нейротропных веществ нецелевыми фармакометаболомными методами необходимо уделить особое внимание эндогенным веществам, которые потенциально могут быть связаны с нейрональной передачей. Такими веществами могут являться аминокислоты-предшественники нейромедиаторов (фенилаланин, тирозин, триптофан и т.п.), органические кислоты, стероиды и т.д. При нецелевом фармакометаболомном исследовании влияния диазепама на метаболом мальков зебрафиш были обнаружены изменения концентраций эндогенных метаболитов, потенциально связанных с нейротрансмиссией, что позволило выдвинуть гипотезу о влиянии диазепама на множество путей нейрональной передачи, а также доказать возможность использования рыб вида *Danio rerio* как модельного организма для изучения фармакометаболомных эффектов физиологически активных веществ.

После установления метаболических путей нецелевыми фармакометаболомными методами необходимо провести разработку и валидацию методик целевого определения концентраций эндогенных веществ, участвующих в метаболических путях, наиболее задействованных в процессах формирования фармакологического эффекта. В случае исследования фармакологических эффектов нейротропных веществ

необходимо разработать методику количественного определения эндогенных веществ, участвующих в различных нейромедиаторных системах. При использовании количественного метаболомного анализа наибольшего количества нейромедиаторов и их производных представляется возможность широко оценить влияние нейротропных веществ на различные системы нейромедиаторов.

Для оценки влияния фармакологических веществ на целевые метаболические пути необходимо выбрать референтное фармакологически активное вещество с хорошо описанными эффектами на организм, оказывающее влияние на метаболические пути, концентрации метаболитов которых будут изучаться в исследовании. Так, для исследования фармакометаболических эффектов нейротропных веществ с использованием рыб вида *Danio rerio* как модельного организма, в качестве референтного вещества был выбран диазепам, который является фармакологическим веществом с четко описанными свойствами и механизмом действия на ЦНС и использующийся в качестве эталонного препарата сравнения в методиках поиска анксиолитических препаратов [5, 6, 15].

В эксперименте по воздействию диазепама на мальков рыб вида *Danio rerio* не было обнаружено дозозависимых изменений в концентрациях метаболитов ГАМКергической системы. Полученный результат можно объяснить тем фактом, что первичный механизм действия бензодиазепинов заключается в связывании с ГАМК_A-рецептором, и, тем самым, увеличении отклика на воздействие ГАМК [47]. Известно, что диазепам, действуя на ГАМК_A-рецепторы, усиливает эффекты ГАМК даже при малых ее концентрациях [195]. Полученные данные согласуются с исследованиями о механизме действия диазепама, которое предполагает модуляцию ГАМК_A-рецепторов, при этом не влияя на синтез ГАМК.

Была обнаружена тенденция к увеличению концентраций глутаминовой кислоты у мальков зебрафиш при краткосрочном воздействии (2,5 ч) диазепама. Глутаминовая кислота в ионизированной форме (глутамат)

является наиболее распространенной аминокислотой в ЦНС [265]. Глутамат – один из главных нейромедиаторов в ЦНС, к основным функциям которого относится образование возбуждающих постсинаптических потенциалов вплоть до формирования эксайтотоксичности [265]. Также глутаминовая кислота является прекурсором ГАМК; реакция превращения глутаминовой кислоты в ГАМК протекает с помощью фермента глутаматдекарбоксилазы [100]. Учеными было обнаружено, что система глутамата играет важную роль в формировании бензодиазепиновой зависимости, и было обнаружено, что введение антагонистов глутамата приводило к увеличению срока формирования зависимости [227]. Увеличение концентраций глутаминовой кислоты после краткосрочного воздействия диазепама на рыб вида *Danio rerio* может указывать на уменьшение синтеза ГАМК из глутамата как следствие усиления ГАМКергической иннервации.

Концентрации аспарагиновой кислоты были увеличены как после краткосрочного, так и после длительного воздействия диазепама. Аспарагиновая кислота является альфа-аминокислотой, которая играет роль в биосинтезе протеинов, принимает участие в цикле мочевины и глюконеогенезе, а также является агонистом рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA-рецепторы) и альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионой кислоты (AMPA-рецепторы). Данные, полученные в ходе эксперимента на рыбах вида *Danio rerio*, согласуются с данными исследователей, которые в своих работах показали, что воздействие диазепама увеличивает уровни аспартата в мозге [45]. Активация NMDA- и AMPA-рецепторов вызывает развитие эксайтотоксических эффектов, следовательно, аспарагиновая кислота, являясь агонистом этих рецепторов, вызывает эффекты, противоположные ингибиторным рецепторам, таким как рецепторы ГАМК_A. Было установлено, что завышенные уровни аспарагиновой кислоты связаны с эксайтотоксичностью [206]. Также существуют исследования, показывающие, что зависимость от диазепама формируется, в частности, из-за стимуляции рецепторов NMDA [205, 211]. Таким образом, можно

заклучить, что увеличенные концентрации аспарагиновой кислоты, вызванные воздействием диазепама, играют важную роль в формировании негативных эффектов (тревожность, ригидность мышц, припадки), возникающих после отмены приема диазепама.

Полученные результаты о воздействии диазепама на мальков рыб вида *Danio rerio* показали, что диазепам влияет на концентрации метаболитов серотонинергической системы. Примечательным является тот факт, что концентрации триптофана статистически значимо увеличивались после краткосрочного воздействия диазепама (2,5 ч) и уменьшались после длительного воздействия диазепама (96 ч). Триптофан – это альфа-аминокислота, которая является прекурсором нейромедиатора серотонина. Полученные в ходе экспериментов данные согласуются с исследованиями, проведенными на грызунах, которые показали, что краткосрочное воздействие диазепама вызывало увеличение концентраций триптофана в мозге мышей [164], в то время, как длительное воздействие приводило к уменьшению концентраций триптофана в мозге крыс [201].

Триптофан является незаменимой аминокислотой, поэтому её запасы зависят только от количества нутриентов в желточном мешке мальков рыб вида *Danio rerio*. Увеличенные концентрации триптофана у опытной группы №4, подвергавшейся воздействию высшей дозы диазепама краткосрочно (2,5 ч), по сравнению с контрольной группой могут быть объяснены снижением скорости биотрансформации данной аминокислоты в ее метаболиты, то есть может быть связано с угнетением активности фермента триптофангидроксилазы. Уменьшение концентрации триптофана в опытных группах, подвергавшихся воздействию диазепама в течение длительного промежутка времени (96 ч), может быть связано с усилением метаболизма триптофана как следствие увеличения образования серотонина в ходе развития толерантности к диазепаму. Данный вывод согласуется с тем фактом, что концентрации серотонина у мальков рыб вида *Danio rerio* увеличивались после длительного воздействия диазепама.

Серотонин является нейромедиатором, который вовлечен в регулирование психологических процессов, в частности, регуляции настроения, уменьшении уровней депрессии и тревожности [228]. Существуют исследования, доказывающие, что анксиолитическое действие диазепама реализуется, в том числе, через серотонинергическую систему, включая как серотонин, так и его прекурсор [92, 264]. Некоторые авторы сообщают, что прием диазепама уменьшает выброс серотонина в различных частях мозга крыс [195, 199]. Снижение нейронального выброса серотонина, а также увеличение его синтеза из триптофана, потенциально могут объяснить повышение его концентраций у мальков рыб вида *Danio rerio*.

Длительное воздействие диазепама вызывало уменьшение концентраций 5-гидроксииндолуксусной кислоты в опытных группах. Научные работы мировых ученых в области исследования концентраций моноаминов в ЦНС после воздействия бензодиазепинов приводят противоречивые данные о концентрациях 5-гидроксииндолуксусной кислоты. Так, Pratt и соавт. и Rastogi и соавт. сообщают, что воздействие широкого ряда бензодиазепинов (клоназепам, диазепам, хлордиазепоксид, клобазам) приводило к увеличению концентраций 5-гидроксииндолуксусной кислоты в мозге крыс [195, 199]. В то же время, Voix и соавт. сообщают, что интраперитонеальное введение диазепама и алпразолама не вызывало статистически значимых изменений в концентрациях 5-гидроксииндолуксусной кислоты в мозге крыс [60]. В эксперименте на зебрафиш было обнаружено уменьшение концентраций 5-гидроксииндолуксусной кислоты после длительного воздействия диазепама, что может говорить об уменьшении скорости биотрансформации серотонина, однако в связи с наличием расхождений с полученными ранее данными, необходимо провести подтверждающие исследования с использованием других биологических моделей.

Концентрации метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана изменялись после воздействия диазепама. Концентрации

кинуренина снижались у групп рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию диазепама, в то время как концентрации пиколиновой кислоты повышались у групп, подвергавшихся воздействию высшей дозы диазепама в течение длительного промежутка времени (96 ч). Как кинуренин, так и пиколиновая кислота являются потенциальными антагонистами рецепторов NMDA, оказывая при этом нейропротективное действие [86]. Снижение концентраций кинуренина может потенциально указывать на смещение катаболизма триптофана в сторону серотонинергической системы, а также свидетельствовать об увеличении катаболизма кинуренина, в то время как повышение концентраций пиколиновой кислоты может указывать на реализацию компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение эксайтотоксического действия аспарагиновой кислоты.

Концентрации фенилаланина и тирозина увеличивались после краткосрочного воздействия (2,5 ч) диазепама, но имели различные направления изменений после длительного воздействия (96 ч). Фенилаланин и тирозин являются аминокислотами-прекурсорами для синтеза моноаминов семейства дофамина. Информация о влиянии диазепама на концентрации данных метаболитов практически отсутствует, однако существующие исследования сообщают, что уровни экспрессии фермента тирозингидроксилазы, который катализирует реакцию превращения тирозина в L-ДОФА, повышаются после воздействия диазепама [222, 229]. Длительное воздействие диазепама на беременных крыс Лонг-Эванс вызывало уменьшение концентраций тирозина в мозге крысят [121]. Превращение тирозина в L-ДОФА и последующие метаболиты, а также уменьшение экспрессии тирозингидроксилазы потенциально может объяснить снижение уровней тирозина после длительного воздействия (96 ч) диазепама. Повышенные концентрации фенилаланина после длительного воздействия могут указывать на уменьшение превращения фенилаланина в тирозин посредством влияния на фермент фенилаланингидроксилазу. Повышенные концентрации фенилаланина и тирозина у групп, получавших наивысшую

дозу диазепама в течение короткого промежутка времени (2,5 ч), могут быть связаны с уменьшением метаболизма этих соединений, что подтверждается генеральной тенденцией к снижению концентраций моноаминов при увеличении дозы диазепама.

Интересным является факт увеличения концентраций L-ДОФА, дофамина, норметанефрина и адреналина у опытной группы №1 рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся краткосрочному воздействию (2,5 ч) наименьшей дозы диазепама (0,8 мкг/л), которое сопровождалось последующим снижением концентраций метаболитов при увеличении дозировки. Диазепам увеличивает двигательную активность у мышей, вызывая «бифазный» эффект, который реализуется в увеличении активности при низких дозах диазепама и угнетении при высоких дозах [94, 200]. Также существуют доказательства того, что введение ингибиторов синтеза катехоламинов и антагонистов дофаминергических рецепторов нивелирует диазепам-индуцированные изменения локомоторной активности [223, 226]. В связи с этим можно заключить, что результаты, полученные в ходе эксперимента на рыбах вида *Danio rerio*, поддерживают гипотезу о воздействии диазепама на уровни дофамина, и влияют, среди прочего, на двигательную активность через дофаминергическую систему, причём краткосрочное воздействие вызывает разнонаправленные изменения концентраций большинства метаболитов дофаминергической системы в зависимости от вводимой дозы диазепама. Длительное воздействие (96 ч) диазепама привело к снижению концентраций дофамина у рыб вида *Danio rerio*. Снижение концентраций дофамина после длительного воздействия диазепама может быть связано с истощением дофаминергических синапсов вследствие формирования зависимости от диазепама. Схожая тенденция изменения концентраций других моноаминов (L-ДОФА, норметанефрин, адреналин) может указывать на возможный вклад иных моноаминов в формировании бифазного поведенческого ответа на острое введение диазепама.

На данный момент существует малое количество исследований, посвященных изучению влияния бензодиазепинов на концентрации адреналина и норадреналина. Так, в работе Stein и соавт. было обнаружено, что введение алпразолама приводило к уменьшению оборота норадреналина в ЦНС крыс [225]. В то же время, Rastogi и соавт. обнаружили, что хроническое введение диазепама и бромазепама приводило к увеличению концентраций норадреналина в некоторых отделах мозга крыс [199]. Таким образом, можно заключить, что повышение концентраций норадреналина после длительного воздействия (96 ч) диазепама у рыб вида *Danio rerio* может быть связано с уменьшением его расщепления; также повышенные концентрации как адреналина, так и норадреналина, могут быть связаны с увеличением катаболизма дофамина. Вышеописанные выводы подтверждаются видом тенденций концентраций метанефрина, которые уменьшались при краткосрочном воздействии (2,5 ч) диазепама и увеличивались при длительном воздействии (96 ч).

Ацетилхолин является одним из важнейших нейромедиаторов в ЦНС. Существует сравнительно малое количество исследований, посвященных изучению влияния диазепама на холинергическую систему. В экспериментах на мышах, Lundgren и соавт. доказали, что введение диазепама приводило к увеличению уровней ацетилхолина, при этом не наблюдалось изменения концентраций холина и изменения активности холинацетилтрансферазы и ацетилхолинэстеразы [87]. Увеличение концентраций ацетилхолина можно объяснить некоторой антихолинергической активностью диазепама, которая проявляется за счет снижения выброса ацетилхолина из преганглионарных нервных волокон, что приводит к уменьшению его расщепления [87]. Для установления механизмов реализации данного эффекта необходимо провести подтверждающие исследования.

Информация об эффектах диазепама на концентрации метаболитов микробиомного пути метаболизма триптофана отсутствует, однако существуют исследования, в которых обсуждается возможность связывания

вышеуказанных метаболитов с сайтом связывания бензодиазепинов и его последующей аллостерической модификацией [235]. Таким образом, изменения концентраций индоловых кислот могут отражать действие диазепама на ЦНС рыб вида *Danio rerio*.

При исследовании фармакометаболомных эффектов малоизученных веществ следует опираться на данные о возможных эффектах веществ той же фармакологической группы. Таким образом, для интерпретации фармакометаболомных эффектов, вызываемых 5F-АПИНАК, который относится к группе синтетических каннабиноидов, исследовались работы мировых ученых в области изучения эффектов других каннабимиметиков.

Помимо наличия изменений в концентрациях эндогенных метаболитов нейромедиаторных систем, у опытной группы №5, подвергавшейся воздействию высшей дозы 5F-АПИНАК (10 мкМ) в течение длительного промежутка времени (96 ч), были обнаружены морфологические изменения, которые включали в себя гиперпигментацию тела и искривление позвоночника. Схожие морфологические изменения были зафиксированы в других экспериментах на рыбах вида *Danio rerio* при исследовании негативных эффектов каннабимиметиков. Например, воздействие Δ^9 -ТГК и синтетических каннабиноидов CP 55940 и WIN 55,212-2 вызвало морфологические изменения у мальков рыб вида *Danio rerio*, которые включали в себя искривление позвоночника, отек желточного мешка и отек перикарда [111]. Негативные эффекты на развитие эмбриона также были изучены с помощью других животных моделей. Например, было обнаружено, что воздействие Δ^9 -ТГК в концентрации от 0,7 до 1,4 мг/кг на беременных кроликов вызывало увеличение уровня смертности эмбрионов [217]. Дальнейшие исследования показали, что воздействие Δ^9 -ТГК и марихуаны увеличивало количество случаев выкидышей, нарушений развития скелета и мягких тканей (гидронефроз, гидроцефалия, расщепление нёба) у грызунов [182]. Воздействие синтетического каннабиноида HU 210 на куриные эмбрионы вызвало увеличение смертности, а также привело к уменьшению

длины тела, массы тела и массы мозга эмбрионов [83, 112]. У людей употребление Δ^9 -ТГК было связано с увеличением количества выкидышей, фетального алкогольного синдрома, а также с нарушением памяти и способностей к обучению у детей [178]. Согласно отчетам ВОЗ, исследования случай-контроль в этой области показали, что употребление каннабиноидов во время беременности связано с некоторыми негативными последствиями для эмбриона, например уменьшение длины и веса ребенка при рождении, снижение качества сна, снижение вербальной активности и памяти ребенка [128]. В эксперименте на рыбах вида *Danio rerio* было зарегистрировано, что 5F-АПИНАК проявляет тератогенные свойства. Несмотря на это, увеличения уровня смертности мальков рыб вида *Danio rerio* зарегистрировано не было. Данный вывод согласуется с ранее полученными данными по веществу АПИНАК, которое является нефторированным аналогом 5F-АПИНАК [219].

Концентрации ГАМК были снижены у опытных групп, получавших наивысшую дозу 5F-АПИНАК, как после краткосрочного (4 ч), так и после длительного воздействия (96 ч). Было установлено, что каннабиноиды способны ингибировать выброс некоторых нейромедиаторов, в том числе ГАМК, а также уменьшать ГАМКергическую иннервацию [91, 220]. Было обнаружено, что рецепторы ГАМК модулируются с помощью эндоканнабиноидной системы; некоторые авторы сообщают, что введение эндоканнабиноидов усиливает стимуляцию ГАМК_A-рецепторов при малых дозах ГАМК [76]. Напротив, некоторыми авторами было показано, что длительное воздействие каннабимиметиков вызывает эксайтотоксические эффекты и увеличивают выброс ГАМК [53, 119]. Сниженные уровни ГАМК у опытных групп №5 рыб вида *Danio rerio*, получавших наивысшую дозу 5F-АПИНАК как краткосрочно, так и длительно, могут объясняться способностью каннабимиметиков усиливать ГАМКергическую иннервацию, что потенциально приводит к уменьшению синтеза ГАМК. Уменьшение концентраций ГАМК также может быть связано с повышением ее расщепления в синаптической щели как следствие ее увеличенного выброса.

Для установления истинного механизма понижения концентраций ГАМК после воздействия 5F-АПИНАК необходимо провести дополнительные подтверждающие исследования.

Концентрации глутамина были снижены у опытной группы №5, получавшей 10 мкМ 5F-АПИНАК в течение короткого промежутка времени (4 ч). В случае длительного воздействия (96 ч) концентрации глутамина показывали наличие восходящей тенденции, при этом статистически значимо концентрации глутамина отличались только у опытной группы №5 по сравнению с контрольной группой. Глутамин является прекурсором синтеза нейромедиаторов глутаминовой кислоты и ГАМК. Согласно литературным данным, хроническое воздействие Δ^9 -ТГК повышало общий уровень глутамин+глутамат в ЦНС у людей [130]. Также было доказано, что агонисты каннабиноидных рецепторов угнетают высвобождение глутамина [177]. Несмотря на малое количество научных работ, посвященных изучению концентраций глутамина в ЦНС, можно сделать заключение, что краткосрочное воздействие 5F-АПИНАК вызывает снижение концентраций глутамина путем угнетения его высвобождения из клеток, в то время как длительное воздействие 5F-АПИНАК может вызывать увеличение синтеза глутамина, возможно через увеличение катаболизма ГАМК.

После воздействия 5F-АПИНАК концентрации триптофана и триптамина статистически значимо изменялись у опытных групп по сравнению с контрольной группой. Серотонинергическая система вовлечена в регуляцию множества нейрофизиологических процессов, включая регуляцию настроения, восприятия, злости, агрессии, внимания и тревожности [190]. Некоторые исследователи сообщают, что эндоканнабиноидная система участвует в регуляции настроения и формировании депрессии через серотонинергическую систему [174]. Также было обнаружено, что при введении Δ^9 -ТГК и синтетического каннабиоида WIN 55,212-2 наблюдается ингибирование синтеза 5-гидрокситриптофана и серотонина с помощью действия на активность триптофангидроксилазы в различных регионах мозга

крыс [232]. В эксперименте на рыбах вида *Danio rerio* увеличенные концентрации триптофана после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК могут быть объяснены ингибированием триптофангидроксилазы и уменьшением катаболизма триптофана.

В настоящее время триптамин относят к группе «следовых аминов» – соединений, которые структурно похожи на классические моноамины и подвергаются метаболическим превращениям по схожим биохимическим путям; они проявляют агонизм к группе рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами первого типа (trace amine-associated receptor 1, TAAR1). Следовые амины играют роль в регуляции количества моноаминов в синаптической щели, в частности, стимуляция TAAR1 приводит к выбросу нейромедиаторов и препятствует их обратному захвату [175, 177]. На данный момент, информация об уровнях триптамина или его синтезе после воздействия каннабиноидов отсутствует. Однако существуют работы, в которых приводится информация, что триптамин очень быстро метаболизируется моноаминоксидазами мозга, и таким образом, у триптамина очень короткий период полураспада [76]. Возможно, что повышенное использование и усиленный катаболизм данного следового амина как следствие увеличения моноаминергической иннервации может объяснить снижение концентраций триптамина после краткого воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК.

Концентрации метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана изменялись как после краткосрочного (4 ч), так и после длительного (96 ч) воздействия 5F-АПИНАК. Большинство метаболитов кинуренинового пути связаны с действием на рецепторы NMDA. Было доказано, что увеличенные концентрации агонистов NMDA-рецепторов связаны с проявлением эксайтотоксичности в мозге [108]. Воздействие каннабиноидов приводило к снижению активации рецепторов NMDA, тем самым, уменьшая эксайтотоксические эффекты в ЦНС. Некоторые авторы, напротив, сообщают, что воздействие синтетического каннабиноида WIN

55,212-2 и эндоканнабиноида анандамида усиливало эффекты NMDA [49, 167, 178]. Концентрации кинуреновой кислоты были повышены у опытных групп рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся краткосрочному и длительному воздействию 5F-АПИНАК. Кинуреновая кислота проявляет антагонизм к рецепторам NMDA, таким образом кинуреновая кислота оказывает нейропротективное и нейроингибиторное действие, ассоциированное с антагонизмом к сайту связывания глицина рецепторов NMDA [86, 233]. Уровни ксантуреновой кислоты были повышены у рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию 5F-АПИНАК в течение длительного промежутка времени. Некоторые авторы полагают, что ксантуреновая кислота оказывает нейромодуляторные эффекты через усиление нейрональной передачи [262]. Также считается, что антраниловая кислота и пиколиновая кислота уменьшают эксайтотоксические эффекты через гиперполяризацию мембран нервных клеток [109, 232]. Исходя из полученных данных, можно сделать заключение о том, что воздействие 5F-АПИНАК приводило к увеличению концентраций метаболитов кинуренинового пути метаболизма триптофана, проявляющих антагонизм к рецепторам NMDA. Данное явление может быть объяснено реализацией нейропротекторных эффектов как ответ на введение токсического агента – 5F-АПИНАК.

Концентрации дофамина у рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК были увеличены, в то время как после длительного воздействия (96 ч) 5F-АПИНАК было обнаружено увеличение концентраций дофамина у опытных групп №1-3 с последующим падением у опытных групп №4-5. Дофамин является одним из главных нейромедиаторов в ЦНС; он играет ключевую роль в формировании поведения, связанного с системой вознаграждения (или «системой внутреннего подкрепления»), при этом большинство веществ, вызывающих зависимость, увеличивают выброс или блокируют обратный захват дофамина в нейронах. Известно, что активность дофаминовых рецепторов может регулироваться эндоканнабиноидной системой, при этом острое воздействие Δ^9 -ТГК

ассоциировано с увеличением иннервации дофаминергических нейронов, увеличением синтеза дофамина и его выбросом в синаптическую щель [242]. Острое воздействие синтетического каннабиноида WIN 55,212-2 вызывало увеличение синтеза дофамина и норадреналина в различных регионах мозга крыс [244]. Хроническое введение синтетических каннабиноидов крысам и мышам увеличивало экспрессию тирозингидроксилазы – фермента, который катализирует реакцию преобразования тирозина в метаболиты семейства дофамина [105]. Повышение уровней дофамина после краткосрочного воздействия 5F-АПИНАК может быть связано с увеличением его синтеза. Повышение концентраций дофамина у опытных групп №1-3 после длительного воздействия также может быть связано с увеличением синтеза данного нейромедиатора, тогда как снижение концентраций дофамина у опытных групп №4-5 может потенциально объясняться истощением запасов дофамина при его повышенном синтезе и катаболизме при воздействии высоких доз 5F-АПИНАК.

При краткосрочном воздействии (4 ч) 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* концентрации ацетилхолина повышались, в то время как длительное воздействие (96 ч) приводило к уменьшению концентраций ацетилхолина. Введение Δ^9 -ТГК повышало концентрации ацетилхолина и холина практически во всех регионах мозга мышей [93]. Введение синтетического каннабиноида WIN 55,212-2 в низких концентрациях стимулировало выброс ацетилхолина в гиппокампе, тогда как высокие дозы вызывали длительное уменьшение выброса у крыс [94, 233, 245]. Также было обнаружено ингибирование выброса ацетилхолина в синапсосомах гиппокампа каннабиноидом WIN 55,212-2 [210]. Некоторые исследования в этой области сообщают об уменьшении концентраций ацетилхолина в гиппокампе после воздействия каннабимиметиков [106, 173]. Несмотря на противоречивость полученных ранее данных, можно сделать предположение о том, что краткосрочное воздействие 5F-АПИНАК на мальков рыб вида *Danio rerio* приводило к увеличению синтеза ацетилхолина, в то время как длительное

воздействие потенциально приводило к уменьшению концентраций ацетилхолина за счет уменьшения его синтеза или уменьшения выброса в синаптическую щель.

Концентрации цитруллина снижались у опытных групп рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного воздействия (4 ч) 5F-АПИНАК, однако после длительного воздействия (96 ч), концентрации цитруллина были статистически выше у опытной группы №5 по сравнению с контрольной группой. Цитруллин является субстратом для синтеза метаболитов ГАМКергической системы [263]. На данный момент не существует данных, описывающих явления изменения концентраций цитруллина при воздействии каннабимиметиков. Изменение концентраций цитруллина может быть связано как с явлением увеличения метаболизма соединений ГАМКергической системы, так и с нарушением равновесия других биохимических путей (например, цикл мочевины).

С целью подтверждения влияния 5F-АПИНАК на ЦНС, а также для установления связи метаболомных изменений у рыб вида *Danio rerio* в ответ на введение вещества, действующего на ЦНС, был проведен поведенческий анализ рыб вида *Danio rerio* после воздействия 5F-АПИНАК.

В эксперименте по изучению двигательной активности мальков рыб вида *Danio rerio* наблюдалось дозозависимое снижение общего пройденного расстояния при увеличении дозы 5F-АПИНАК. Согласно литературным данным, в зависимости от концентрации исследуемого агониста каннабиноидных рецепторов, двигательная активность мальков рыб вида *Danio rerio* может изменяться в виде двухфазного ответа, а именно, стимуляция активности при низких дозах веществ и подавление при высоких [95]. Данный вид эффекта на двигательную активность наблюдался при введении таких агонистов каннабиноидных рецепторов, как: анандамид, Δ^9 -ТГК [70], WIN 55,212-2 [71], JWH-018 [202], АКВ48, 5F-АКВ48 [202], 5F-ADBINACA, АВ-FUBINACA и STS-135 [213], и предполагает, что данный вид ответа типичен для самой эндоканнабиноидной системы, нежели, чем для

молекул-агонистов каннабиноидных рецепторов [23, 132]. Двигательные нарушения вплоть до акинезии являются одними из наиболее распространенных эффектов, наблюдаемых при приеме каннабимиметиков [23, 24, 132]. Изменение поведенческой активности, вызываемое синтетическими каннабиноидами, может быть связано со способностью к увеличению высвобождения дофамина в прилежащем ядре, возможно, через мезоаккумбальный дофаминергический путь по каннабиноидно-рецепторному механизму [131]. В отличие от вышеупомянутых исследований, в эксперименте по воздействию 5F-АПИНАК не было обнаружено бифазного ответа. Данное различие может быть связано с выбранными концентрациями вещества.

Введение 5F-АПИНАК вызывало дозозависимое уменьшение общего пройденного расстояния как в течение первых 4-х часов после введения, так и во время длительного воздействия [23, 203]. Эти результаты согласуются с исследованиями влияния Δ^9 -ТГК на рыб вида *Danio rerio*. Интересным является факт того, что как Δ^9 -ТГК, так и каннабидиол, оказывают ингибирующий эффект на двигательную активность у взрослых рыб вида *Danio rerio*, что проявлялось в снижении скорости плавания и уменьшении пройденного расстояния [23, 130]. Наличие данных эффектов традиционно принято считать проявлением тревожности. Однако недавние исследования показали, что воздействие агонистов каннабиноидных рецепторов на мальков рыб вида *Danio rerio* изменяло синаптическую активность в нервно-мышечных соединениях, снижало частоту сердечных сокращений, а также реакцию на резкие звуки [224]. Данные исследования показывают, что снижение активности мальков рыб вида *Danio rerio* может происходить не только из-за тревожного состояния.

В некоторых исследованиях было доказано, что уменьшение концентраций ГАМК [169], глутамина [116], триптофана [161], холина [58], среди прочих, связаны с тревожными расстройствами. Так как уменьшение пройденных расстояний мальками рыб вида *Danio rerio* при воздействии

каннабиноидов связывают с проявлением тревожного эффекта [129, 130], полученные данные согласуются с литературными.

ГАМК является тормозным нейромедиатором, одной из главных функций которого является регулирование уровней тревожности. Также было доказано, что синтетические каннабиноиды угнетают двигательную активность через ингибирование захвата ГАМК [84].

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Введение диазепама малькам рыб вида *Danio rerio* вызывает изменения в концентрациях эндогенных метаболитов, связанных с метаболическими путями синтеза нейромедиаторов. Наиболее сильные изменения наблюдались в метаболическом пути биосинтеза катехоламинов ($p < 0,05$).

2. Разработанная аналитическая методика определения панели эндогенных соединений – нейромедиаторов и их метаболитов – соответствует валидационным характеристикам FDA и EMA, в частности: селективность, линейность калибровочных кривых, эффект переноса, правильность и прецизионность, эффект матрицы, коэффициент экстракции, стабильность.

3. Воздействие диазепама на мальков рыб вида *Danio rerio* вызывало изменение концентраций эндогенных метаболитов – нейромедиаторов различных систем нейрональной передачи как после краткосрочного (2,5 ч), так и после длительного воздействия (96 ч). Статистически значимые различия ($p < 0,05$) наблюдались в концентрациях метаболитов серотонинергической, дофаминергической, холинергической систем, а также кинуренинового пути метаболизма триптофана и системы аспартата. Концентрации ГАМК не изменялись при введении диазепама (либо не показывали дозозависимого ответа на введение), из чего можно заключить, что механизм действия диазепама реализуется только через модуляцию ГАМК_A-рецептора, при этом не влияя на синтез ГАМК.

4. Воздействие синтетического каннабиноида 5F-АПИНАК на рыб вида *Danio rerio* приводило к статистически значимым ($p < 0,05$) изменениям концентраций ГАМК, дофамина, триптофана и ацетилхолина как после краткосрочного (4 ч), так и после длительного (96 ч) воздействия. Наиболее значимые изменения концентраций нейромедиаторов наблюдались при длительном воздействии 5F-АПИНАК в высшей исследованной дозе (10 мкМ) (уменьшение концентраций ацетилхолина и ГАМК, $p < 0,001$).

5. Длительное воздействие дозы 5F-АПИНАК в концентрации 10 мкМ вызвало морфологические нарушения у эмбрионов рыб вида *Danio rerio*, тем самым показывая, что 5F-АПИНАК в концентрации 10 мкМ проявляется эмбриотоксическое действие. Так, 60% мальков не вышли из хориона к пятому дню после оплодотворения, у 20% мальков наблюдалось искривление позвоночника, а также у всех мальков была зафиксирована гиперпигментация тела.

6. Воздействие 5F-АПИНАК вызывало дозозависимое снижение двигательной активности мальков рыб вида *Danio rerio*, при этом концентрация 5F-АПИНАК 10 мкМ вызывало серьезное снижение двигательной активности, что говорит о токсическом эффекте данной концентрации вещества. Выявлены статистически значимые корреляции между пройденным мальками рыб вида *Danio rerio* расстоянием и концентрациями нейромедиаторов под воздействием 5F-АПИНАК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная и валидированная методика целевого фармакометаболического анализа концентраций нейромедиаторов и их метаболитов может быть использована для изучения фармакологических эффектов химических веществ нейротропного действия с использованием *Danio rerio* как модельного организма.

2. При изучении фармакологических эффектов ЛС бензодиазепинового ряда с помощью фармакометаболических методов следует обращать особое внимание на концентрации метаболитов серотонинергической, дофаминергической, холинергической систем, а также кинуренинового пути метаболизма триптофана и системы аспартата.

3. Рекомендуется исследовать изменение концентраций ГАМК, дофамина, триптофана и ацетилхолина при изучении эффектов синтетических каннабиноидов фармакометаболическими методами, так как синтетические каннабиноиды оказывают существенное влияние на нейромедиаторные системы, в которые входят вышеуказанные метаболиты.

4. При изучении эффектов синтетических каннабиноидов целесообразно регистрировать морфологические и поведенческие изменения у рыб вида *Danio rerio* для исследования токсичности веществ (эмбриотоксичность, тератогенность) и поиска корреляционных зависимостей между поведенческими реакциями и изменениями концентраций нейромедиаторов и их метаболитов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспектива дальнейшей разработки данной темы может заключаться в оценке фармакометаболомных эффектов других нейротропных веществ на модели рыб вида *Danio rerio* с целью накопления данных и возможного предсказания эффектов неизвестных химических веществ потенциально нейротропного действия. Также возможно проведение дополнительных поведенческих исследований с целью установления характера нейротропного действия. Кроме того, возможны разработки иных метаболомных панелей и проведение фармакометаболомных исследований, направленных на изучение влияния химических веществ на различные системы органов (сердечно-сосудистая, пищеварительная и т.д.). Помимо этого, дальнейшее изучение предложенной модели может быть сфокусировано на изучении механизмов действия изучаемых ЛС за счет комплексной оценки их метаболомных, транскриптомных и геномных данных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЕД₅₀ – полуэффективная доза

ЛД₅₀ – полулетальная доза

ЛК₅₀ – полулетальная концентрация

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

МС – масс-спектрометрия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

СД – сахарный диабет

НБОВ – наследственные болезни обмена веществ

5F-АПИНАК – (3s,5s,7s)-адамantan-1-ил 1-(5-фторпентил)-1H-индазол-3-карбоксилат

ЕЗ – среда для содержания эмбрионов ЕЗ

дпо – дней после оплодотворения

MRM – мониторинг множественных реакций

ЦНС – центральная нервная система

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин

NMDA-рецептор – рецептор N-метил-D-аспартата

AMPA-рецептор – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

ГАМК_A-рецептор – рецептор гамма-аминомасляной кислоты типа A

Δ^9 -ТГК – тетрагидроканнабинол

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

TAAR1 – рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, первого типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрашитов, Р.Х. Обзор существующих методик оценки активности СYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров / Р.Х. Абдрашитов, Г.Н. Гильдеева, Г.В. Раменская, В.В. Смирнов // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2015. – Т. 1. – С. 4-11.
2. Бабченко, В.Я. Модели черепно-мозговой травмы у зебраданио (*Zebrafish, danio rerio*) / В.Я. Бабченко, А.С. Белова, А.А. Баширзаде [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2021. – Т. 107. – № 9. – С. 1059-1076.
3. Барулин, Н.В. Влияние различных инкубационных сред на эмбриональное развитие данио рерио в эксперименте *in vivo* / Н.В. Барулин, Я.А. Яськина, К.Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2020. – Т. 4. – № 39. – С. 21-25.
4. Беляева, Н.Ф. Зебрафиш как модель в биомедицинских исследованиях / Н.Ф. Беляева, В.Н. Каширцева, Н.В. Медведева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – № 1. – 120-131.
5. Воронина, Т.А. Перспективы поиска новых анксиолитиков / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65. – № 5. – С. 4-17.
6. Девяшин, А.С. Оценка дозозависимых эффектов анксиолитиков бензодиазепинового ряда на примере диазепамы у *Danio rerio* / А.С. Девяшин, А.А. Блаженко, В.А. Лебедев [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 43-49.
7. Дедов, И.И. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы / И.И. Дедов, А.Н. Тюльпаков, В.П. Чехонин [и др.] // Вестник РАМН. – 2021. – Т. 12. – С. 4-12.

8. Дрягина, Н.В. Метаболом головного мозга / Н.В. Дрягина, Е.А. Кондратьева, Я.А. Дубровский, А.Н. Кондратьев // Российский неврологический журнал. – 2020. – Т. 1. – С. 4-12.
9. Застрожин, М.С. Влияние карбамазепина на активность изофермента цитохрома P450 3A4 у больных алкогольной зависимостью / М.С. Застрожин, В.В. Смирнов, Д.А. Сычев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79. – № 10. – С. 18-21.
10. Застрожин, М.С. Связь профиля эффективности и безопасности бромдигидрохлорфенилбензодиазепина с полиморфизмом CYP2C19*17 у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью / М.С. Застрожин, Л.И. Сейфуллаева, В.Р. Мустафина [и др.] // Наркология. – 2018. – Т. 17. – № 4. – С. 30-40.
11. Зуб, А.В. Возможность использования биологической модели пресноводной рыбы Данио рерио в доклинических исследованиях / А.В. Зуб, В.Л. Загребин, И.А. Дворяшина, А.В. Терентьев // Вестник ВолгГМУ. – 2020. – Т. 73. – № 1. – С. 10-13.
12. Карцова, Л. А. Применение хроматографических и электрофоретических методов в метаболомных исследованиях / Л.А. Карцова, С.А. Соловьева // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т. 74. – № 4. – С. 243-253.
13. Качанов, Д.А. *Danio rerio* (Zebrafish) как универсальный модельный объект в доклинических исследованиях / Д.А. Качанов, Н.М. Лакеенков, К.Е. Левикин [и др.] // Forcipe. – 2018. – Т. 1. – № 1. – С. 49-53.
14. Качанов, Д.А. Сравнительный обзор возможностей использования *Danio rerio* (zebrafish) в качестве модельного объекта в доклинических исследованиях / Д.А. Качанов, М.О. Бардаков, Е.Н. Лукин [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2020. – Т. 96. – № 6. – С. 107-111.

15. Королев, А.О. Исследование роли ГАМК А рецепторов в механизме психотропного действия производных пирроло[1,2-А][1,4]дiazепинов на оперантной модели лекарственной дифференцировки у крыс Вистар / А.О. Королев, Т.С. Калинина, А.В. Волкова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – № 6. – С. 3-7.
16. Кротова, Н.А. Зебраданио (Zebrafish) как новая перспективная модель в трансляционной нейробиологии / Н.А. Кротова, А.М. Лакстыгал, А.С. Таранов [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105. – № 11. – С. 1417-1435.
17. Кукес, В.Г. Персонализированная медицина в клинической фармакологии / В.Г. Кукес // Биомедицина. – 2010. – Т. 3. – С. 22-24.
18. Кукес, В.Г. Персонализированная медицина в клинике внутренних болезней / В.Г. Кукес, В.Ф. Маринин, Ю.В. Олефир [и др.] // Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95. – № 3. – С. 197-200.
19. Лебедев, В.А. Возможность использования поведенческих ответов *Danio rerio* в оценке дозозависимых эффектов феназепамы / В.А. Лебедев, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – Т. 1. – С. 12-21.
20. Левикин, К.Е. Сравнительные эффекты влияния антидепрессантов разных фармакологических групп на поведение взрослых особей *Danio rerio* / К.Е. Левикин, Д.А. Качанов, Г.Я. Лапкина, А.А. Слобожанин, А.В. Павлыш // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 51-56.
21. Ливанова, А.А. *Danio rerio* как экспериментальная модель в радиобиологии / А.А. Ливанова, А.В. Завирский, В.Ю. Кравцов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2020. – Т. 60. – № 2. – С. 163-174.

22. Маркин, П.А. Анализ воздействия нового психоактивного вещества 5F-АПИНАК на концентрации эндобиотиков различных нейромедиаторных систем на примере моделей зебрафиш (*Danio rerio*) и кроликов / П.А. Маркин, К.М. Шестакова, Н.Е. Москалева [и др.] // *International Journal of Medicine and Psychology*. – 2020. – Т. 3. – № 5. – С. 123-132.
23. Маркин П. А., Тарасов В. В., Апполонова С. А. Сравнительный анализ моделей поведения зебрафиш и мышей под воздействием нового психоактивного вещества APINAC // www.issledo.ru Редакционная коллегия. – 2019. – С. 52.
24. Маркин П. А., Тарасов В. В., Апполонова С. А. Анализ модели поведения зебрафиш под воздействием нового психоактивного вещества 5F-APINAC // Перспективные научные исследования и инновационно-технологические разработки : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 27 августа 2020г. : Белгород : ООО Агентство перспективных научных исследований (АПНИ), 2020. С. 15-24. URL: <https://apni.ru/article/1069-analiz-modeli-povedeniya-zebrafish-pod-vozd> (дата обращения: 20.05.2021)
25. Маркин П.А. Метаболомное профилирование как способ оценки безопасности и/или эффективности физиологически активных веществ // IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” с международным участием 27 сентября - 03 октября 2020г. : Краснодар : Научный совет РАН по аналитической химии, 2020. С. 44. URL: https://www.analytconf.ru/files/2020/analytconf-2020_materialy-conference.pdf (дата обращения: 21.05.2021)
26. Маслов, Д.Л. Фармакометабономика - новый подход к персонализации лекарственной терапии / Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова, П.Г. Лохов, А.И. Арчаков // *Биомедицинская химия*. – 2017. – Т. 63. – № 2. – С. 115-123.

27. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2013. — 944 с.
28. Морозов, С.В. Проблемы комплексного химического профилирования лекарственных растений / С.В. Морозов, Н.И. Ткачева, А.В. Ткачев // Химия растительного сырья. — 2018. — Т. 4. — С. 5-28.
29. Незнамов, Г.Г. Новый анксиолитик афобазол: результаты сравнительного клинического исследования с диазепамом при генерализованном тревожном расстройстве / Г.Г. Незнамов, С.А. Сюняков, Д.В. Чумаков [и др.] // Психиатрия и психофармакотерапия им. П.Б. Ганнушкина. — 2006. — Т. 4. — С. 8-13.
30. Орлова, А.А. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор) / А.А. Орлова, Й. Стругар, О.Ю. Штарк [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2021. — Т. 10. — № 1. — С. 97-105.
31. Смирнов, В.В. Влияние изофермента CYP2D6 на метаболизм лекарственных препаратов и методы определения его активности / В.В. Смирнов, Р.Х. Абдрашитов, Е.А. Егоренков [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2015. — Т. 3. — С. 32-35.
32. Смирнов, В.В. Определение активности ферментов метаболизма лекарственных средств - перспектива использования в клинической практике / В.В. Смирнов, Е.А. Егоренков, Л.М. Красных, Г.Ф. Василенко, Г.В. Раменская // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2016. — Т. 4. — С. 28-32.
33. Кукес, В. Г. Клиническая фармакогенетика / Сычев Д. А. , Раменская Г. В. , Игнатъев И. В. , Кукес В. Г. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 248 с. - ISBN 978-5-9704-0458-4. - Текст : электронный // URL :

<https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970404584.html> (дата обращения: 16.08.2021).

34. Сычев, Д.А. Этапы разработки и внедрения технологий персонализированной медицины в клиническую практику / Д.А. Сычев // *World Journal of Personalized Medicine*. – 2017. – Т. 1. – № 1. – С. 1-4.

35. Сычев, Д.А. Персонализированная медицина: взгляд клинического фармаколога / Д.А. Сычев, Г.Н. Шуев, Е.С. Торбенков, М.А. Адриянова // *Consilium Medicum*. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 61-68.

36. Сычев, Д.А. Методология проведения клинических исследований в области персонализированной медицины: фокус на фармакогенетику / Д.А. Сычев, Д.В. Иващенко, К.Б. Мирзаев // *Вестник Росздравнадзора*. – 2018. – Т. 2. – С. 28-35.

37. Фурина Р.Р. Метаболомические исследования в медицине / Р.Р. Фурина, Н.И. Митракова, В.Л. Рыжков, И.К. Сафиуллин // *Казанский медицинский журнал*. – 2014. – Т. 95. – № 1. – С. 1-6.

38. Шабанов, П.Д. Влияние стресса новизны на поведенческие ответы *danio rerio* и оценка дозозависимых эффектов анксиолитиков бензодиазепинового ряда на примере феназепам / П.Д. Шабанов, В.А. Лебедев, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 57-63.

39. Шестакова, К.М. Изучение фармакокинетики нового синтетического каннабимиметика 5F-APINAC и его влияния на триптофановый метаболизм // IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” с международным участием 27 сентября - 03 октября 2020г. : Краснодар : Научный совет РАН по аналитической химии, 2020. С. 132. URL: https://www.analytconf.ru/files/2020/analytconf-2020_materialy-conference.pdf (дата обращения: 21.05.2021)

40. Шестакова К. М., Маркин П. А., Тарасов В. В., Савчук С. А. Изучение метаболизма нового синтетического каннабимиметика 5F-APINAC // Ценность естественно-научного и технического знания в условиях современной техногенной цивилизации : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 27 мая 2020г. : Белгород : ООО Агентство перспективных научных исследований (АПНИ), 2020. С. 25-38. URL: <https://apni.ru/article/813-izuchenie-metabolizma-novogo-sinteticheskogo> (дата обращения: 20.05.2022)
41. Шимширт, А.А. Изучение влияния диазепама на тревожные реакции у мышей, вызванные индометацином / А.А. Шимширт, Т.С. Калинина, Т.А. Воронина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – № 1. – С. 45-46.
42. Шимширт, А.А. Экспериментальное изучение влияния индометацина и его комбинации с диазепамом на тревожные реакции / А.А. Шимширт, Т.С. Калинина, Т.А. Воронина // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. – 2012. – Т. 1. – С. 30-35.
43. Achenbach, J. C. Analysis of the Uptake, Metabolism, and Behavioral Effects of Cannabinoids on Zebrafish Larvae / J.C. Achenbach, J. Hill, J.P.M. Hui, et al. // Zebrafish. – 2018. – Vol. 15. – № 4. – P. 349-360.
44. Ahn, E. Temporal fluxomics reveals oscillations in TCA cycle flux throughout the mammalian cell cycle / E. Ahn, P. Kumar, D. Mukha, A. Tzur, T. Shlomi // Molecular Systems Biology. – 2017. – Vol. 13. – № 11. – P. 953.
45. Akhtar, M.T. Developmental effects of cannabinoids on zebrafish larvae / M. T. Akhtar, S. Ali, H. Rashidi, et al. // Zebrafish. – 2016. – Vol. 10. – № 3. – P. 283-293.
46. Akhtar, M. T. Metabolic effects of cannabinoids in zebrafish (*Danio rerio*) embryos determined by ¹H NMR metabolomics / M.T. Akhtar, M.Y. Mushtaq, R.

Verpoorte, M.K. Richardson, Y.H. Choi // *Metabolomics*. – 2016. – Vol. 12. – № 44. – P. 1-11.

47. Akhtar, M.T. Zebrafish as a Model for Systems Medicine R and D: Rethinking the Metabolic Effects of Carrier Solvents and Culture Buffers Determined by ¹H NMR Metabolomics / M.T. Akhtar, M.Y. Mushtaq, R. Verpoorte, M.K. Richardson, Y.H. Choi // *OMICS A Journal of Integrative Biology*. – 2016. – Vol. 20. – № 1. – P. 42-52.

48. Anichtchik, O. Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) / O. Anichtchik, V. Sallinen, N. Peitsaro, P. Panula // *Journal of Comparative Neurology*. – 2006. – Vol. 498. – № 5. – P. 593-610.

49. Appolonova, S.A. In vivo and in vitro metabolism of the novel synthetic cannabinoid 5F-APINAC / S.A. Appolonova, C. Palacio, K.M. Shestakova, N.V. Mesonzhnik, et al. // *Forensic Toxicology*. – 2020. – Vol. 38. – № 1. – P. 160-171.

50. Assem, M. The impact of uremic toxins on cerebrovascular and cognitive disorders / M. Assem, M. Lando, M. Grissi, et al. // *Toxins*. – 2018. – Vol. 10. – № 7. – P. 303.

51. Badyal, D.K. Animal use in pharmacology education and research: The changing scenario / D.K. Badyal, C. Desai // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 46. – № 3. – P. 257-265.

52. Bayés, A. Evolution of complexity in the zebrafish synapse proteome / A. Bayés, M.O. Collins, R. Reig-Viader, et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8 – P. 14613.

53. Berger, M. The expanded biology of serotonin / M. Berger, J.A. Grey, B.L. Roth // *Annual Review of Medicine*. – 2009. – Vol. 60. – P. 355-366.

54. Berman, J. The zebrafish as a tool to study hematopoiesis, human blood diseases, and immune function / J. Berman, E. Payne, C. Hall // *Advances in Hematology*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 425345.

55. Bhattacharya S. Chapter 24. The Role of Computational Systems Biology Models in Toxicity Testing in the 21 st Century: an Example with Predictive Multi-Scale Models of the Liver 2011.
56. Bhattacharyya, S. Metabolomic signature of exposure and response to citalopram/escitalopram in depressed outpatients / S. Bhattacharyya, A.T. Ahmed, M. Arnold, D. Liu, et al. // *Translational Psychiatry*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 173.
57. Bilici, R. Bilici R. Synthetic cannabinoids / R. Bilici // *Northern Clinics of Istanbul*. – 2014. – Vol. 1. – № 2. – P. 121-126.
58. Bjelland, I. Choline in anxiety and depression: The Hordaland Health Study / I. Bjelland, G.S. Tell, S.E. Vollset, S. Konstantinova, P.M. Ueland // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2009. – Vol. 90. – № 4. – P. 1056-1060.
59. Boekelheide, K. A mechanistic redefinition of adverse effects - A key step in the toxicity testing paradigm shift / K. Boekelheide, M.E. Andersen // *Altex*. – 2010. – Vol. 27. – № 4. – 243-252.
60. Boix, F. Handling-habituation prevents the effects of diazepam and alprazolam on brain serotonin levels in rats / F. Boix, A.F. Teruel, R.M. Escorihuela, A, Tobena // *Behavioural Brain Research*. – 1990. – Vol. 36. – № 3. – P. 209-215.
61. Bouatra, S. The Human Urine Metabolome / S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, et al. // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e73076.
62. Braford, M.R. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? / M.R. Braford // *Brain, behavior and evolution*. – 1995. – Vol. 46. – № 4-5. – P. 259-274.
63. Brand, M. Keeping and raising zebrafish / M. Brand, M. Granato, C. Nüsslein-Volhard // *Zebrafish*. – 2002. – Vol. 261.

64. Brindle, J.T. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics / J.T. Brindle, H. Antti, E. Holmes, et al. // *Nature Medicine*. – 2002. – Vol. 8. – № 12. – P. 1439-1444.
65. Brink, W.J. van den. Multivariate pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) analysis with metabolomics shows multiple effects of remoxipride in rats / W.J. van den Brink, J. Elassaiss-Schaap, B. Gonzalez-Amoros, et al. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 109. – P. 431-440.
66. Brown, J.M. The gut microbial endocrine organ: Bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases / J.M. Brown, S.L. Hazen // *Annual Review of Medicine*. – 2015. – Vol. 66. – P. 343-359.
67. Burgess, H.A. Sensorimotor gating in larval zebrafish / H.A. Burgess, M. Granato // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – Vol. 27. – № 18. – P. 4984-4994.
68. Burt, T. Pharmacometabolomics in Early-Phase Clinical Development / T. Burt, S. Nandal // *Clinical and Translational Science*. – 2016. – Vol. 9. – № 3. – P. 128-138.
69. Calcaterra, N.E. Classics in chemical neuroscience: Diazepam (valium) / N.E. Calcaterra, J.C. Barrow // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. 253-260.
70. Canazza, I. Effect of the novel synthetic cannabinoids AKB48 and 5F-AKB48 on “tetrad”, sensorimotor, neurological and neurochemical responses in mice. In vitro and in vivo pharmacological studies / I. Canazza, A. Ossato, C. Trapella, et al. // *Psychopharmacology*. – 2016. – Vol. 233. – P. 3685-3709.
71. Canazza, I. Pharmaco-toxicological effects of the novel third-generation fluorinate synthetic cannabinoids, 5F-ADBINA, AB-FUBINA, and STS-135 in mice. In vitro and in vivo studies / I. Canazza, A. Ossato, F. Vincenzi, et al. // *Human Psychopharmacology*. – 2017. – Vol. 32. – № 3.

72. Candy, J. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts / J. Candy, C. Collet // *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. – 2005. – Vol. 1727. – № 1. – P. 35-44.
73. Carpio, Y. Zebrafish as a genetic model organism / Y. Carpio, M. P. Estrada // *Biotechnologia Aplicada*. – 2006. – Vol. 23. – № 4. – P. 265-270.
74. Cassani, E. Increased urinary indoxyl sulfate (indican): New insights into gut dysbiosis in Parkinson's disease / E. Cassani, M. Barichella, R. Canello, et al. // *Parkinsonism and Related Disorders*. – 2015. – Vol. 21. – № 4. – P. 389-393.
75. Cassar, S. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology / S. Cassar, I. Adatto, J.L. Freeman, et al. // *Chemical Research in Toxicology*. – 2020. – Vol. 33. – № 1. – P. 95-118.
76. Castaneto, M.S. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications / M.S. Castaneto, D.A. Gorelick, N.A. Desrosiers, et al. // *Drug and Alcohol Dependence*. – 2014. – Vol. 144. – P. 12-41.
77. Chávez, M.N. Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration / M.N. Chávez, G. Aedo, F.A. Fierro, et al. // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 56.
78. Chiang, C.K. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner / C.K. Chiang, T. Tanaka, R. Inagi, T. Fujita, M. Nangaku // *Laboratory Investigation*. – 2011. – Vol. 91. – № 11. – P. 1564-1571.
79. Chouchani, E.T. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515. – № 7527. – P. 431-435.
80. Cicatiello, A.G. Metabolic effects of the intracellular regulation of thyroid hormone: Old players, new concepts / A.G. Cicatiello, D. Di Girolamo, M. Dentice // *Frontiers in Endocrinology*. – 2018. – Vol. 9. – № 474.

81. Clayton, T.A. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism / T.A. Clayton, D. Baker, J.C. Lindon, J.R. Everett, J.K. Nicholson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106. – № 34. – P. 14728-14733.
82. Clish, C.B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine / C.B. Clish // *Molecular Case Studies*. – 2015. – Vol. 1. – № 1. – P.a000588.
83. Cohen, K. Chronic Use of Synthetic Cannabinoids Is Associated With Impairment in Working Memory and Mental Flexibility / K. Cohen, Y. Mama, P. Rosca, A. Pinhasov, A. Weinstein // *Frontiers in Psychiatry*. – 2020. – Vol. 602. – № 11.
84. Colizzi, M. Delta-9-tetrahydrocannabinol increases striatal glutamate levels in healthy individuals: implications for psychosis / M. Colizzi, N. Weltens, P. McGuire, et al. // *Molecular Psychiatry*. – 2019. – Vol. 25. – P. 3231-3240.
85. Collier, S.R. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine / S.R. Collier, D.P. Casey, J.A. Kanaley // *Growth Hormone and IGF Research*. – 2005. – Vol. 15. – № 2. – P. 136-139.
86. Connick, J.H. Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo / J.H. Connick, T.W. Stone // *British Journal of Pharmacology*. – 1988. – Vol. 93. – P. 868-876.
87. Consolo, S. Effect of diazepam on mouse whole brain and brain area acetylcholine and choline levels / S. Consolo, H. Ladinsky, G. Peri, S. Garattini // *European Journal of Pharmacology*. – 1974. – Vol. 27. – № 2. – 266-268.
88. Costello, L.C. The important role of osteoblasts and citrate production in bone formation: “Osteoblast Citration” as a new concept for an old relationship / L.C. Costello, R.B. Franklin, M.A. Reynolds, M.Chellaiah // *Open Bone Journal*. – 2012. – Vol. 4. – № 1.

89. Dang, L. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate / L. Dang, D.W. White, S. Gross, et al. // *Nature*. – 2009. – Vol. 462. – P. 739-744.
90. David, A. Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent / A. David, A. Lange, C.R. Tyler, E.M. Hill // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 621. – P. 782-790.
91. Deshpande, L.S. Prolonged cannabinoid exposure alters GABAA receptor mediated synaptic function in cultured hippocampal neurons / L.S. Deshpande, R.E. Blair, R.J. DeLorenzo // *Experimental Neurology*. – 2011. – Vol. 229. – № 2. – P. 264-273.
92. Djeridane, Y. Diazepam affects both level and amplitude of rat locomotor activity rhythm but has no effect on core body temperature / Y. Djeridane, B. Lemmer, Y. Touitou // *Chronobiology International*. – 2005. – Vol. 22. – № 6. – P. 975-985.
93. Domino, E.F. Cannabinoids and the cholinergic system / E.F. Domino // *Journal of clinical pharmacology*. – 1981. – Vol. 21. – № S1. – P. 249S-255S.
94. Dong, X.X. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases / X.X. Dong, Y. Wang, Z. Qin // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2009. – Vol. 30. – P. 379-387.
95. Drews, E. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats / E. Drews, M. Schneider, M. Koch // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2005.
96. Dunn, W.B. Measuring the metabolome: Current analytical technologies / W.B. Dunn, N.J.C. Bailey, H.E. Johnson // *Analyst*. – 2005. – Vol. 130. – № 5. – P. 606-625.
97. Elahi, D. Interaction of arginine and gastric inhibitory polypeptide on insulin release in man / D. Elahi, G.S. Raizes, R. Andres, et al. // *American Journal of*

Physiology - Endocrinology and Metabolism. – 1982. – Vol. 242. – № 5. – P. E343-351.

98. Ellero-Simatos, S. Pharmacometabolomics reveals that serotonin is implicated in aspirin response variability / S. Ellero-Simatos, J.P. Lewis, A. Georgiades, et al. // CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology. – 2014. – Vol. 3. – № 7. – P. e125.

99. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. // U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2018.

100. Fenalti, G. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop / G. Fenalti, R.H.P. Law, A.M. Buckle, et al. // Nature Structural and Molecular Biology. – 2007. – Vol. 14. – № 4. – P.280-286.

101. Flores, M. P4 medicine: How systems medicine will transform the healthcare sector and society / M. Flores, G. Glusman, K. Brogaard, N.D. Price, L. Hood // Personalized Medicine. – 2013. – Vol. 10. – № 6. P. 565-576.

102. Fujii, H. Role of uremic toxins for kidney, cardiovascular, and bone dysfunction / H. Fujii S. Goto, M. Fukagawa // Toxins. – 2018. – Vol. 10. – № 5. – P. 202.

103. Gabbs, M. Advances in Our Understanding of Oxylipins / M. Gabbs, S. Leng, J.G. Devassy, Md. Monirujjaman, H.M. Aukema // American Society for Nutrition. – 2015. – Vol 6. – № 5. – P. 513-540.

104. Gessel, M.M. MALDI imaging mass spectrometry: Spatial molecular analysis to enable a new age of discovery / M.M. Gessel, J.L. Norris, R.M. Caprioli // Journal of Proteomics. – 2014. – Vol. 107. – P. 71-82.

105. Gevi, F. Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism / F. Gevi, L. Zolla, S. Gabriele, A.M. Persico // Molecular autism. – 2016. – Vol. 7. – P. 47.

106. Gifford, A.N. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from hippocampal and cortical synaptosomes / A.N. Gifford, M. Bruneus,

S.J. Gatley, N.D. Volkow // *British Journal of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 131. – № 3. – P. 645-650.

107. Gill, S.R. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome / S.R. Gill, M. Pop, R.T. DeBoy, et al. // *Science*. – 2006. – Vol. 5778. – № 312. – P. 1355-1359.

108. Gowda, G.A.N. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics / G.A.N. Gowda, S. Zhang, H. Gu, et al. // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2008. – Vol. 8. – № 5. – P. 617-633.

109. Grant, R.S. The physiological action of picolinic acid in the human brain / R.S. Grant, S.E. Coggan, G.A. Smythe // *International Journal of Tryptophan Research*. – 2009. – Vol. 2. – P. 71-79.

110. Grebe, S.K.G. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? / S.K.G. Grebe, R.J. Singh // *Clinical Biochemist Reviews*. – 2011. – Vol. 32. – № 1. – P. 5-31.

111. Greizerstein, H.B. Ethanol and diazepam effects on intrauterine growth of the rat / H.B. Greizerstein, L.K. Aldrich // *Developmental Pharmacology and Therapeutics*. – 1983. – Vol. 6. – № 6. – P. 409-418.

112. Gustafsson, S.B. Effects of cannabinoids on the development of chick embryos in ovo / S.B. Gustafsson, S.O.P Jacobsson // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 13486.

113. Han, Y. Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*) / Y. Han, J. Zhang, J. Qian, C. Hu // *Journal of Applied Toxicology*. – 2015. – Vol. 35. – № 3. – P. 241-252.

114. Hansen, R.L. High-Spatial Resolution Mass Spectrometry Imaging: Toward Single Cell Metabolomics in Plant Tissues / R.L. Hansen, Y.J. Lee // *Chemical Record*. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 65-77.

115. Hartung, T. Systems Toxicology: Real World Applications and Opportunities / T. Hartung, R.E. Fitzgerald, P. Jennings, et al. // *Chemical Research in Toxicology*. – 2017. – Vol. 30. – № 4. – P. 870-882.
116. Hartung, T. Food for thought... on mapping the human toxome / T. Hartung, M. McBride // *Altex*. – 2011. – Vol. 28. – № 2. – P. 83-93.
117. He, J.H. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity / J.H. He, S.Y. Guo, F. Zhu, et al. // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2013. – Vol. 67. – № 1. – P. 25-32.
118. He, X. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease: Insights on mechanism and application of metabolomics / X. He, G. Ji, W. Jia, H. Li // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – № 3. – P. 300.
119. Hellmuth, C. Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children / C. Hellmuth, F.F. Kirchberg, N. Lass, et al. // *Journal of Diabetes Research*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2108909.
120. Höglund, E. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review / E. Höglund, Ø. Øverli, S. Winberg // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 158.
121. Holmes, E. Metabolic Phenotyping in Health and Disease / E. Holmes, I.D. Wilson, J.K. Nicholson // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – № 5. – P. 714-717.
122. Horzmann, K.A. Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity / K.A. Horzmann, J.L. Freeman // *Toxics*. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 19.
123. Hou, Y. A metabolomics approach for predicting the response to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer patients / Y. Hou, M. Yin, F. Sun, et al. // *Molecular BioSystems*. – Vol. 10. – № 8. – P. 2126-2133.

124. Howe, K. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome / K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 498-503.
125. Hu, Y. Changes of embryonic development, locomotor activity, and metabolomics in zebrafish co-exposed to chlorpyrifos and deltamethrin / Y. Hu, J. Hu, W. Li, Y. Gao, Y. Tian // *Journal of Applied Toxicology*. – 2021. – Vol. 41. – № 9. – P. 1345-1356.
126. Hutton, J.C. Interaction of branched chain amino acids and keto acids upon pancreatic islet metabolism and insulin secretion / J.C. Hutton, A. Sener, W.J. Malaisse // *Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – Vol. 255. – № 15. – P. 7340-7346.
127. ICH ICH guideline M10 on bioanalytical method validation // *EMA Guidance Document*. – 2019. – Vol. 44.
128. Ito, S. Protein-bound Uremic toxins: New culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients / S. Ito, M. Yoshida // *Toxins*. – 2014. – Vol. 6. – № 2. – P. 665-678.
129. Iversen, L. Cannabis and the brain / L. Iversen // *Brain*. – 2003. – Vol. 126. – № 6. – P. 1252-1270.
130. Jenny, M. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and cannabidiol modulate mitogen-induced tryptophan degradation and neopterin formation in peripheral blood mononuclear cells in vitro / M. Jenny, E. Santer, E. Pirich, H. Schennach, D. Fuchs // *Journal of Neuroimmunology*. – 2009. – Vol. 207. – № 1-2. – P. 75-82.
131. Jenny, M. The potential role of cannabinoids in modulating serotonergic signaling by their influence on tryptophan metabolism / M. Jenny, S. Schröcksnadel, F. Überall, D. Fuchs // *Pharmaceuticals*. – Vol. 3. – № 8. – P. 2647-2660.

132. Jensen, H.M. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) / H.M. Jensen, R. Korbut, P.W. Kania, K. Buchmann // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – № 7. – P. e0200016.
133. Jia, M. Toxicity and metabolomics study of isocarbophos in adult zebrafish (*Danio rerio*) / M. Jia, Y. Wang, M. Teng, et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 163. – P. 1-6.
134. Jin, Y. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity / Y. Jin, Z. Liu, T. Peng, Z. Fu // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2015. – Vol. 43. – № 2. – P. 405-414.
135. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia / R. Kaddurah-Daouk, J. McEvoy, R.A. Baillie, et al. // *Molecular Psychiatry*. – 2007. – Vol. 12. – № 10. – P. 934-945.
136. Kaddurah-Daouk, R. Lipidomic analysis of variation in response to simvastatin in the Cholesterol and Pharmacogenetics Study / R. Kaddurah-Daouk, R.A. Baillie, H. Zhu, et al. // *Metabolomics*. – 2010. – Vol. 6. – № 2. – P. 191-201.
137. Kaddurah-Daouk, R. Enteric microbiome metabolites correlate with response to simvastatin treatment / R. Kaddurah-Daouk, R.A. Baillie, H. Zhu, et al. // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 10. – P. e25482.
138. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomics: A global biochemical approach to drug response and disease / R. Kaddurah-Daouk, B.S. Kristal, R.M. Weinshilboum // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2008. – Vol. 48. – P. 653-683.
139. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomic signatures for drug response phenotypes: Pharmacometabolomics enables precision medicine / R. Kaddurah-Daouk, R. Weinshilboum // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2015. – Vol. 98. – № 1. – P. 71-75.

140. Kaddurah-Daouk, R. Pharmacometabolomics: Implications for clinical pharmacology and systems pharmacology / R. Kaddurah-Daouk, R. Weinshilboum // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2014. – Vol. 95. – № 2. – P. 154-167.
141. Kalueff, A.V. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond / A.V. Kalueff, M. Gebhardt, A.M. Stewart, et al. // *Zebrafish*. – 2013. – Vol. 10. – № 1. – P. 70-86.
142. Kalueff, A.V. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders / A.V. Kalueff, A.M. Stewart, R. Gerlai // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2014. – Vol. 35. – № 2. – P. 63-75.
143. Kanungo, J. Zebrafish Model in Drug Safety Assessment / J. Kanungo, E. Cuevas, S.F. Ali, M.G. Paule // *Current Pharmaceutical Design*. – 2014. – Vol. 20. – № 34. – P. 5416-5429.
144. Karu, N. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database / N. Karu, L. Deng, M. Slae, et al. // *Analytica Chimica Acta*. – 2018. – Vol. 1030. – P. 1-24.
145. Kim, K. Mealtime, temporal, and daily variability of the human urinary and plasma metabolomes in a tightly controlled environment / K. Kim, C. Mall, S.L. Taylor, et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 1 – P. e86223.
146. Kim, S. Food metabolomics: From farm to human / S. Kim, J. Kim, E.J. Yun, K.H. Kim // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 37. – P. 16-23.
147. Kimmel, C.B. Stages of embryonic development of the zebrafish / C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling // *Developmental Dynamics*. – 1995. – Vol. 203. – № 3. – P. 253-310.
148. Klein, S. Isotope labeling experiments in metabolomics and fluxomics / S. Klein, E. Heinzle // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 261-272.

149. Kokel, D. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish / D. Kokel, J. Bryan, C. Laggner, et al. // *Nature Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 6. – № 3. – P. 231-237.
150. Koppe, L. Insulin resistance in chronic kidney disease: New lessons from experimental models / L. Koppe, C.C. Pelletier, P.M. Alix, et al. // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2014. – Vol. 29. – № 9. – P. 1666-1674.
151. Krause, D. High kynurenine (a tryptophan metabolite) predicts remission in patients with major depression to add-on treatment with celecoxib / D. Krause, A.M. Myint, C. Schuett, et al. // *Frontiers in Psychiatry*. – 2017. – Vol. 8. – P. 16.
152. Krauss, R.M. Pharmacometabolomics of statin response / R.M. Krauss, H. Zhu, R. Kaddurah-Daouk // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2013. – Vol. 94. – № 5. – P. 562-565.
153. Kuchler, A.M. Development of the Zebrafish Lymphatic System Requires Vegfc Signaling / A.M. Kuchler, E. Gjini, J. Peterson-Maduro, et al. // *Current Biology*. – 2006. – Vol. 16. – № 12. – P. 1244-1248.
154. Lee, C.C. Branched-chain amino acids and insulin metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) / C.C. Lee, S.M. Watkins, C. Lorenzo, et al. // *Diabetes Care*. – 2016. – Vol. 39. – № 4. – P. 582-588.
155. Lee, J. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: A mini-review / J. Lee, J.L. Freeman // *NeuroToxicology*. – 2014. – Vol. 43. – P. 57-64.
156. Lehto, M. The gut-kidney axis: Putative interconnections between gastrointestinal and renal disorders / M. Lehto, P.H. Groop // *Frontiers in Endocrinology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1-11.
157. Lei, X.D. Role of tumor necrosis factor-alpha in zebrafish retinal neurogenesis and myelination / X.D. Lei, Y. Sun, S.J. Cai, et al. // *International Journal of Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 9. – № 6. – P. 831-837.

158. Lele, Z. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research / Z. Lele, P.H. Krone // *Biotechnology Advances*. – 1996. – Vol. 14. – № 1. – P. 57-72.
159. Lenzen, S. Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion / S. Lenzen, H. Formanek, U. Panten // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257. – № 12. – P. 6631-6633.
160. Li, C. Comprehensive and quantitative proteomic analyses of zebrafish plasma reveals conserved protein profiles between genders and between zebrafish and human / C. Li, X.F. Tan, T.K. Lim, Q. Lin, Z. Gong // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 24329.
161. Liabeuf, S. Clinical Studies and Chronic Kidney Disease: What Did we Learn Recently? / S. Liabeuf, N. Neiryneck, T.B. Drueke, R. Vanholder, Z.A. Massy // *Seminars in Nephrology*. – 2014. – Vol. 34. – № 2. – P. 164-179.
162. Liu, S. Zebrafish models for cancer / S. Liu, S.D. Leach // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2011. – Vol. 6. – P. 71-93.
163. Liu, X.Y. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam / X.Y. Liu, Q.P. Zhang, S.B. Li, et al. // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 199. – P. 16-25.
164. Lopez-Castejon, G. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion / G. Lopez-Castejon, D. Brough // *Cytokine and Growth Factor Reviews*. – 2011. – Vol. 22. – № 4. – P. 189-195.
165. López-Rubalcava, C. Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics / C. López-Rubalcava, A. Saldívar, A. Fernández-Guasti // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. – 1992. – Vol. 43. – № 2. – P. 433-440.

166. MacPhail, R.C. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol / R.C. MacPhail, J. Brooks, D.L. Hunter, et al. // *NeuroToxicology*. – 2009. – Vol. 30. – № 1. – P. 52-58.
167. Markin, P.A. Short- and long-term exposures of the synthetic cannabinoid 5F-APINAC induce metabolomic alterations associated with neurotransmitter systems and embryotoxicity confirmed by teratogenicity in zebrafish / P.A. Markin, A. Brito, N.E. Moskaleva, et al. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. – 2021. – Vol. 243. – P. 109000.
168. Markin, P.A. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae / P.A. Markin, A. Brito, N.E. Moskaleva, et al. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. – 2021. – Vol. 38. – P. 100816.
169. Markin P.A., Moskaleva N.Ye., Appolonova S.A. Methodology of the pharmacometabolomic approach in the investigation of the pharmacological effects of physiologically active drugs using *Danio rerio* model: examples on neurotropic drugs // *Scientific research of the SCO countries: synergy and integration*. – 2020. – P. 73-78.
170. Mattes, W.B. Public consortium efforts in toxicogenomics / W.B. Mattes // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 460. – P. 221-238.
171. Mazzali, M. Uric acid and hypertension: Cause or effect? / M. Mazzali, M. Kanbay, M.S. Segal, et al. // *Current Rheumatology Reports*. – 2010. – Vol. 12. – № 2. – P. 108-117.
172. McClay, J.L. Large-scale neurochemical metabolomics analysis identifies multiple compounds associated with methamphetamine exposure / J.L. McClay, D.E. Adkins, S.A. Vunck, et al. // *Metabolomics*. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. 392-402.

173. Melissa, G. Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs / G. Melissa, S. Leng, J.G. Devassy, Md. Monirujjaman, H.M. Aukema // *Advances in Nutrition*. – 2015. – Vol. 6. – № 5. – P. 513-540.
174. Mendiguren, A. Cannabinoids enhance N-methyl-D-aspartate-induced excitation of locus coeruleus neurons by CB1 receptors in rat brain slices / A. Mendiguren, J. Pineda // *Neuroscience Letters*. – 2004. – Vol. 363. – № 1. – P. 1-5.
175. Miller, G.M. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity / G.M. Miller // *Journal of Neurochemistry*. – 2011. – Vol. 116. – № 2. – P. 164-176.
176. Mills, E. Succinate: A metabolic signal in inflammation / E. Mills, L.A.J. O'Neill // *Trends in Cell Biology*. – 2014. – Vol. 24. – № 5. – P. 313-320.
177. Mokdad, A.H. Actual Causes of Death in the United States, 2000 / A.H. Mokdad, J.S. Marks, D.F. Stroup, J.L. Gerberding // *Journal of the American Medical Association*. – 2004. – Vol. 291. – № 10. – P. 1238-1245.
178. Moranta, D. Differential effects of acute cannabinoid drug treatment, mediated by CB1 receptors, on the in vivo activity of tyrosine and tryptophan hydroxylase in the rat brain / D. Moranta, S. Esteban, J.A. García-Sevilla // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2004. – Vol. 369. – № 5. – P. 516-524.
179. Morbiato, E. Potential of the zebrafish model for the forensic toxicology screening of NPS: A comparative study of the effects of APINAC and methiopropamine on the behavior of zebrafish larvae and mice / E. Morbiato, S. Bilel, M. Tirri, et al. // *NeuroToxicology*. – 2020. – Vol. 78. – P. 36-46.
180. Mu, X. Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model / X. Mu, Y. Huang, X. Li, et al. // *Environmental Science and Technology*. – 2018. – Vol. 52. – № 5. – P. 3222-3231.

181. Mueller, T. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei) / T. Mueller, Z. Dong, M.A. Berberoglu, S. Guo // *Brain Research*. – 2011. – Vol. 1381. – P. 95-105.
182. Mueller, T. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio* / T. Mueller, P. Vernier, M.F. Wullimann // *Brain Research*. – 2004. – Vol. 1011. – № 2. – P. 156-169.
183. Muthulakshmi, S. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study / S. Muthulakshmi, K. Maharajan, H.R. Habibi, K. Kadirvelu, M. Venkataramana // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 198. – P. 111-121.
184. Newman, D.J. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 / D.J. Newman, G.M. Cragg // *Journal of Natural Products*. – 2016. – Vol. 79. – № 3. – P. 629-661.
185. Nishimura, Y. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing / Y. Nishimura, A. Inoue, S. Sasagawa, et al. // *Congenital Anomalies*. – 2016. – Vol. 56. – № 1. – P. 18-27.
186. Nusslein-Volhard C. and R. Dahm. *Zebrafish (Practical Approach Series)* // OUP Oxford 328. 2002.
187. Ortiz-Villanueva, E. Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach / E. Ortiz-Villanueva, L. Navarro-Martín, J. Jaumot, et al. // *Environmental Pollution*. – 2017. – Vol. 231. – № 1. – P. 22-36.
188. Osorio, Y. Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel ex vivo splenic explant model system / Y. Osorio, B.L. Travi, A.R. Renslo, A.G. Peniche, P.C. Melby // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2011. – Vol. 5. – № 2. – P. e962.

189. Ossato, A. Psychostimulant effect of the synthetic cannabinoid JWH-018 and AKB48: Behavioral, neurochemical, and dopamine transporter scan imaging studies in mice / A. Ossato, L. Uccelli, S. Bilel, et al. // *Frontiers in Psychiatry*. – 2017. – Vol. 8. – P. 130.
190. Pamanji, R. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos / R. Pamanji, M.S. Bethu, B. Yashwanth, S. Leelavathi, J.V. Rao // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – Vol. 22. – № 10. – P. 7744-7753.
191. Panula, P. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases / P. Panula, Y.C. Chen, M. Priyadarshini, et al. // *Neurobiology of Disease*. – 2010. – Vol. 40. – № 1. – P. 46-57.
192. Pathak, P. Small molecule inhibition of gut microbial choline trimethylamine lyase activity alters host cholesterol and bile acid metabolism / P. Pathak, R.N. Helsley, A.L. Brown, et al. // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 2020. – Vol. 318. – № 6. – P. H1474-H1486.
193. Peterson, R.T. Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development / R.T. Peterson, B.A. Link, J.E. Dowling, S.L. Schreiber // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 24. – P. 12965-12969.
194. Pickering, M. Quantification and validation of HPLC-UV and LC-MS assays for therapeutic drug monitoring of ertapenem in human plasma / M. Pickering, S. Brown. // *Biomedical Chromatography*. – 2013. – Vol. 27. – № 5. – P. 568-574.
195. Sulochana, S.P. Review of the validated HPLC and LC-MS/MS methods for determination of drugs used in clinical practice for Alzheimer's disease / S.P. Sulochana, K. Sharma, R. Mullangi, S.K. Sukumaran // *Biomedical Chromatography*. – 2014. – Vol. 28. – № 11. – P. 1431-1490.

196. Psychogios, N. The human serum metabolome / N. Psychogios, D.D. Hau, J. Peng // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. e16957.
197. Qiao, R. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish / R. Qiao, C. Sheng, Y. Lu, et al. // Science of the Total Environment. – 2019. – Vol. 662. – P. 246-253.
198. Rahman Khan F., Sulaiman Alhewairini S. Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism 2019.
199. Rappaport, S.M. The blood exposome and its role in discovering causes of disease / S.M. Rappaport, D.K. Barupal, D. Wishart, P. Vineis, A. Scalbert // Environmental Health Perspectives. – 2014. – Vol. 122. – № 8. – P. 769-774.
200. Rastogi, R.B. Effects of acute diazepam and clobazam on spontaneous locomotor activity and central amine metabolism in rats / R.B. Rastogi, R.A. Agarwal, Y.D. Lapierre, R.L. Singhal // European Journal of Pharmacology. – 1977. – Vol. 43. – № 2. – P. 91-98.
201. Rees, D.A. Animal models of diabetes mellitus / D.A. Rees, J.C. Alcolado // Diabetic Medicine. – 2005. – Vol. 22. – № 4. – P. 359-370.
202. Robinson, N.B. The current state of animal models in research: A review / N.B. Robinson, K. Krieger, F.M. Khan, et al. // International Journal of Surgery. – 2019. – Vol. 72. – P. 9-13.
203. Rodríguez De Fonseca, F. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity / F. Rodríguez De Fonseca, I.D. Arco, J.L. Martín-Calderón, M.A. Gorriti, M. Navarro // Neurobiology of Disease. – 1998. – Vol. 5. – № 6. – P. 483-501.
204. Rohde, L.A. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms / L.A. Rohde, C.P. Heisenberg. – 2007. – Vol. 261. – P. 159-192.

205. Rohle, D. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells / D. Rohle, J. Popovici-Muller, N. Palaskas, et al. // *Science*. – Vol. 340. – № 6132. – P. 626-630.
206. Rosenkrantz, H. Effects of cannabis on fetal development of rodents. / H. Rozenkrantz // *Advances in the biosciences*. – 1979. – P. 479-499.
207. Rosenthal, N. The mouse ascending: Perspectives for human-disease models / *Nature Cell Biology*. – 2007. – Vol. 9. – P. 993-999.
208. Ross, A.C. Vitamin A as a hormone: Recent advances in understanding the actions of retinol, retinoic acid, and beta carotene / A.C. Ross, M.E. Ternus // *Journal of the American Dietetic Association*. – 1993. – Vol. 93. – № 11. – P. 1285-1290.
209. Rotroff, D.M. Metabolomic signatures of drug response phenotypes for ketamine and esketamine in subjects with refractory major depressive disorder: New mechanistic insights for rapid acting antidepressants / D.M. Rotroff, D.G. Corum, A. Motsinger-Reif, et al. // *Translational Psychiatry*. – 2016. – Vol. 6. – № 9. – P. e894.
210. Sallustio, B.C. LC-MS/MS for immunosuppressant therapeutic drug monitoring / B.C. Sallustio // *Bioanalysis*. – 2010. – Vol. 2. – № 6. – P. 1141-1153.
211. Sánchez-Blázquez, P. The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: Implications in psychosis and schizophrenia / P. Sánchez-Blázquez, M. Rodríguez-Muñoz, J. Garzón // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Vol. 4. – P. 169.
212. Sántha, M. Biologia futura: animal testing in drug development—the past, the present and the future / M. Sántha // *Biologia Futura*. – 2020. – Vol. 71. – № 4. – P. 443-452.
213. Santoriello, C. Hooked! modeling human disease in zebrafish / C. Santoriello, L.I. Zon // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122. – № 7. – P. 2337-2343.

214. Sarath Babu, N. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish / N. Sarath Babu, C.L.N. Murthy, S. Kakara, et al. // *Proteomics*. – 2016. – Vol. 16. – № 9. – 1407-1420.
215. Sato, E. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease / E. Sato, T. Mori, E. Mishima, et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 36618.
216. Savchuk, S. In vivo metabolism of the new synthetic cannabinoid APINAC in rats by GC-MS and LC-QTOF-MS / S. Savchuk, S. Appolonova, A. Pechnikov, et al. // *Forensic Toxicology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 359-368.
217. Schrimpe-Rutledge, A.C. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions / A.C. Schrimpe-Rutledge, S.G. Codreanu, S.D. Sherrod, J.A. McLean // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2016. – Vol. 27. – № 12. – P. 1897-1905.
218. Sehnert, A.J. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility / A.J. Sehnert, A. Huq, B.M. Weinsein, et al. // *Nature Genetics*. – 2002. – Vol. 31. – № 1. – P. 106-110.
219. Shaw, W. Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)- 3-hydroxypropionic acid (HPPHA), an abnormal phenylalanine metabolite of *Clostridia* spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia / W. Shaw // *Nutritional Neuroscience*. – 2010. – Vol. 13. – № 3. – P. 135-143.
220. Sigel, E. The major central endocannabinoid directly acts at GABA A receptors / E. Sigel, R. Baur, I. Rácz, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108. – № 44. – P. 18150-18155.
221. Smith, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action / W.L. Smith // *Biochemical Journal*. – 1989. – Vol. 259. – № 2. – P. 315-324.

222. Sobanska, M. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH) / M. Sobanska, S. Scholz, A.M. Nyman, et al. // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2018. – Vol. 37. – № 3. – P. 657-670.
223. Söderpalm, B. Evidence for a role for dopamine in the diazepam locomotor stimulating effect / B. Söderpalm, L. Svensson, P. Hulthe, K. Johannessen, J.A. Engel // *Psychopharmacology*. – 1991. – Vol. 104. – № 1. – P. 97-102.
224. Sosa, M.A.G. Modeling human neurodegenerative diseases in transgenic systems / M.A.G. Sosa, R.D. Gasperi, G.A. Elder // *Human Genetics*. – 2012. – Vol. 131. – № 4. – P. 535-563.
225. Stein, E.M. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia / E.M. Stein, C.D. DiNardo, D.A. Pollyea, et al. // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. – № 6. – P. 722-731.
226. Stengel, D. In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos / D. Stengel, S. Wahby, T. Braunbeck // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – Vol. 25. – № 5. – P. 4066-4084.
227. Steppuhn, K.G. Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists / K.G. Steppuhn, L. Turski // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90. – № 14. – P. 6889-6893.
228. Stewart, A.M. The behavioral effects of acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish / A.M. Stewart, A.V. Kalueff // *Brain Research*. – 2014. – Vol. 1543. – P. 109-119.
229. Stork, O. Increase of tyrosine hydroxylase and its mRNA in the rat substantia nigra pars reticulata by diazepam and picrotoxin / O. Stork, T. Hashimoto, K. Obata // *Neuroscience Research*. – 1994. – Vol. 19. – № 1. – P. 73-80.

230. Strähle, U. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations / U. Strähle, S. Scholz, R. Geisler, et al. // *Reproductive Toxicology*. – 2012. – Vol. 33. – № 2. – P. 128-132.
231. Stubbs, J.R. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden / J.R. Stubbs, J.A. House, A.J. Ocque, et al. // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2016. – Vol. 27. – № 1. – P. 305-313.
232. Sulcova, E. Biphasic effects of anandamide / E. Sulcova, R. Mechoulam, E. Frideri // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 1998. – Vol. 59. – № 2. – P. 347-352.
233. Szabo, B. Effects of cannabinoids on neurotransmission / B. Szabo, E. Schlicker // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2005. – Vol. 168. – P. 327-365.
234. Tain, Y.L. Toxic dimethylarginines: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) / Y.L. Tain, C.N. Hsu // *Toxins*. – 2017. – Vol. 9. – № 3. – P. 92.
235. Takada A., Shimizu F., Masuda J. Measurement of Plasma Tryptophan Metabolites: Clinical and Experimental Application for Depression and Stress States Assessment 2018.
236. Teng, M. Acute exposure of zebrafish embryo (*Danio rerio*) to flutolanil reveals its developmental mechanism of toxicity via disrupting the thyroid system and metabolism / M. Teng, W. Zhu, D. Wang, et al. // *Environmental Pollution*. – 2018. – Vol. 242. – P. 1157-1165.
237. Teng, M. Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) / M. Teng, W. Zhu, D. Wang, et al. // *Aquatic Toxicology*. – 2018. – Vol. 194. – P. 112-120.

238. Ternes T., Bonerz M., Schmidt T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – T. 938. – №. 1-2. – С. 175-185.
239. Thomaidis, N.S. Emerging contaminants: A tutorial mini-review / N.S. Thomaidis, A.G. Asimakopoulos, A.A. Bletsou // *Global Nest Journal*. – 2012. – Vol. 14. – № 1. – P. 72-79.
240. Thorburn, A.N. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites / A.N. Thorburn, C.I. McKenzie, D. Stanley, et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7320.
241. Tolhurst, G. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP / G. Tolhurst, Y. Zheng, H.E. Parker, et al. // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152. – № 2. – P. 405-413.
242. Treviño-Becerra A. Uric Acid: The Unknown Uremic Toxin 2018.
243. Tu, Z. C-11 Radiochemistry in Cancer Imaging Applications / Z. Tu, R.H. Mach // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 10. – № 11. – P. 1060-1095.
244. Turner, R.M. From the lab to the prescription pad: Genetics, CYP450 analysis, and medication response / R.M. Turner // *Journal of Child and Adolescent Psychiatric Nursing*. – Vol. 26. – № 2. – P. 119-123.
245. Tzavara, E.T. Biphasic Effects of Cannabinoids on Acetylcholine Release in the Hippocampus: Site and Mechanism of Action / E.T. Tzavara, M. Wade, G.G. Nomikos // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 23. – № 28. – P. 9374-9384.
246. Usenko, C.Y. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish / C.Y. Usenko, E.M. Robinson, S. Usenko, B.W. Brooks, E.D. Bruce // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2011. – Vol. 30. – № 8. – P. 1865-1872.

247. Vasilopoulou, C.G. Metabolomic analysis in brain research: Opportunities and challenges / C.G. Vasilopoulou, M. Margarity, M.I. Klapa // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 183.
248. Walker, G.S. Biosynthesis of drug metabolites and quantitation using NMR spectroscopy for use in pharmacologic and drug metabolism studies / G.S. Walker, J.N. Bauman, T.F. Ryder, et al. // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2014. – Vol. 42. – № 10. – P. 1627-1639.
249. Wang, P. The Opportunities of Metabolomics in Drug Safety Evaluation / P. Wang, A.I. Shehu, X. Ma // *Current Pharmacology Reports*. – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. 10-15.
250. Wang, Z. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease / Z. Wang, E. Klipfell, B.J. Bennett, et al. // *Nature*. – 2011. – Vol. 472. – P. 57-63.
251. Ward, P.S. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate / P.S. Ward, J. Patel, D.R. Wise, et al. // *Cancer Cell*. – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 225-234.
252. Watson, F.L. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis* / F.L. Watson, H. Schmidt, Z.K. Turman, et al. // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2014. – Vol. 33. – № 6. – P. 1337-1345.
253. Wermuth C. G. [и др.]. *Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses* 2015.
254. Wishart, D.S. HMDB: The human metabolome database / D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – P. D521-D526.

255. Wishart, D.S. Applications of metabolomics in drug discovery and development / D.S. Wishart // *Drugs in R and D*. – 2008. – Vol. 9. – № 5. – P. 307-322.
256. Wishart, D.S. Quantitative metabolomics using NMR / D.S. Wishart // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – Vol. 27. – № 3. – P. 228-237.
257. Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine / D.S. Wishart // *Drugs in R and D*. – 2016. – Vol. 15. – № 7. – P. 473-484.
258. Wishart, D.S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes / D.S. Wishart // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99. – № 4. – P. 1819-1875.
259. Xia, J. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial / J. Xia, D.I. Broadhurst, M. Wilson, D.S. Wishart // *Metabolomics*. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. 280-299.
260. Yan, L. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil / L. Yan, C. Gong, X. Zhang, et al. // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2016. – Vol. 48. – P. 39-45.
261. Yen, K. AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic IDH2 mutations / K. Yen, J. Travins, F. Wang, et al. // *Cancer Discovery*. – 2017. – Vol. 7. – № 5. – P. 478-493.
262. Yerges-Armstrong, L.M. Purine pathway implicated in mechanism of resistance to aspirin therapy: Pharmacometabolomics-informed pharmacogenomics / L.M. Yerges-Armstrong, S. Ellero-Simatos, A. Giorgiades, et al. // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2013. – Vol. 94. – № 4. – P. 525-532.
263. Young, H.S. α -Bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle x-ray diffraction / H.S. Young, L.G. Herbette, V. Skita // *Biophysical Journal*. – 2003. – Vol. 85. – № 2. – P. 943-953.

264. Zhang, N. Effect of single-use versus combined-use moschus and diazepam on expression of amino acid neurotransmitters in the rat corpus striatum / N. Zhang, P. Liu, X. He // *Neural Regeneration Research*. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. 182-186.
265. Zheng, T. Metabolic phenotype of rats exposed to heroin and potential markers of heroin abuse / T. Zheng, L. Liu, J. Aa, et al. // *Drug and Alcohol Dependence*. – 2013. – Vol. 127. – № 1-3. – P. 177-186.
266. Zhu, H. Pharmacometabolomics of Response to Sertraline and to Placebo in Major Depressive Disorder - Possible Role for Methoxyindole Pathway / H. Zhu, M.B. Bogdanov, S.H. Boyle, et al. // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e68283.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А 1 – Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного воздействия диазепама

Метаболит	*Контр. **пр. 1	Контр. пр. 2	Контр. пр. 3	Контр. пр. 4	1 пр. 2	1 пр. 3	1 пр. 4	2 пр. 3	2 пр. 4	3 пр. 4
Гамма-аминомасляная кислота	-	-	-	-	-	-	-	<0,05 ↓	<0,05 ↓	-
Глутаминовая кислота	-	-	-	-	-	-	<0,01 ↑	-	-	-
Глутамин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Триптофан	-	-	-	<0,05 ↑	-	<0,01 ↑	<0,001 ↑	-	-	-
5-гидрокситриптофан	<0,05 ↓	-	-	-	-	-	<0,001 ↑	-	-	-
Серотонин	-	-	<0,001 ↑	<0,001 ↑	-	<0,05 ↑	<0,05 ↑	-	-	-
5-гидроксииндолуксусная кислота	-	<0,001 ↓	-	-	-	-	-	-	<0,001 ↑	-
Триптамин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Фенилаланин	-	-	-	-	-	-	<0,01 ↑	-	<0,01 ↑	-
Тирозин	<0,05 ↓	-	-	-	-	-	<0,001 ↑	-	<0,01 ↑	-
L-ДОФА	-	-	-	-	-	<0,05 ↓	<0,01 ↓	-	-	-
Дофамин	-	-	-	<0,05 ↓	<0,05 ↓	-	<0,001 ↓	-	-	-
Норадреналин	<0,05 ↑	-	-	-	<0,001 ↓	-	-	-	-	-
Норметанефрин	-	<0,05 ↓	-	-	<0,001 ↓	<0,01 ↓	-	-	-	-

Продолжение таблицы А 1.

Кортизол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитруллин	-	-	-	<0,01 ↑	-	-	<0,05 ↑	-	-	-
Биоптерин	-	<0,001 ↓	<0,01 ↓	-	-	-	-	-	<0,05 ↑	-
Неоптерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Значения измеренных концентраций метаболитов во всех исследуемых группах сравнивали поочередно: опытные группы №1-4 с группой сравнения, опытную группу №1 с группами №2-4, опытную группу №2 с группами №3-4 и опытную группу №3 с группой №4. Контрольная группа — группа сравнения, опытная группа №1 — 0,8 мкг/л диазепама, опытная группа №2 — 1,6 мкг/л диазепама, опытная группа №3 — 16 мкг/л диазепама, опытная группа №4 — 160 мкг/л диазепама. Значения в ячейках – *p*-уровень значимости. *Контр. – группа сравнения; **пр. – против группы № X (где X номер опытной группы).

Таблица А 2 – Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после длительного воздействия диазепама

Метаболит	*Контр. **пр. 1	Контр. пр. 2	Контр. пр. 3	Контр. пр. 4	1 пр. 2	1 пр. 3	1 пр. 4	2 пр. 3	2 пр. 4	3 пр. 4
Гамма-аминомасляная кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глутаминовая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глутамин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Триптофан	<0,001 ↓	-	<0,05 ↓	<0,05 ↓	<0,01 ↑	-	-	-	-	-
5-гидрокситриптофан	<0,001 ↓	-	<0,01 ↓	<0,05 ↓	-	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы А 2.

Серотонин	-	0,01 ↑	-	<0,05 ↑	<0,001 ↑	-	<0,01 ↑	-	-	-
5-гидроксииндолуксусная кислота	<0,01 ↓	-	-	<0,001 ↓	-	-	-	-	<0,01 ↓	-
Триптамин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Фенилаланин	<0,05 ↑	-	<0,05 ↑	<0,001 ↑	-	-	-	-	-	-
Тирозин	-	-	<0,01 ↓	<0,001 ↓	-	-	-	-	<0,01 ↓	-
L-ДОФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Дофамин	-	-	-	<0,05 ↓	-	-	-	-	<0,01 ↓	-
Норадреналин	-	-	-	<0,05 ↑	-	-	<0,05 ↑	-	-	-
Норметанефрин	-	-	-	-	<0,05 ↑	-	-	-	-	-
Адреналин	-	<0,001 ↑	-	-	-	-	-	-	<0,01 ↓	-
Метанефрин	-	-	<0,01 ↑	<0,05 ↑	-	-	-	-	-	-
Аспарагиновая кислота	-	-	<0,05 ↑	<0,001 ↑	-	-	-	-	-	-
Аспарагин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ацетилхолин	<0,05 ↓	-	-	<0,001 ↓	-	-	-	-	<0,01 ↓	<0,05 ↓
Холин	-	<0,05 ↑	-	-	<0,01 ↑	-	-	-	-	-
Кинуренин	-	<0,01 ↓	-	<0,001 ↓	-	-	-	-	-	<0,05 ↓
Кинуреновая кислота	-	-	<0,05 ↑	-	-	-	-	<0,05 ↑	-	-
Антралиловая кислота	-	-	-	-	-	<0,05 ↓	-	-	-	-

Продолжение Таблицы А 2.

Хинолиновая кислота	<0,05 ↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ксантуреновая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пиколиновая кислота	-	-	-	<0,01 ↑	-	-	-	-	<0,01 ↑	-
Индол-3-карбоксальдегид	<0,01 ↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Индол-3-уксусная кислота	<0,001 ↓	-	<0,001 ↓	-	<0,05 ↑	-	-	-	-	-
Индол-3-масляная кислота	<0,05 ↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Индол-3-молочная кислота	<0,001 ↓	-	<0,05 ↓	<0,05 ↓	<0,01 ↑	-	-	-	-	-
Индол-3-акриловая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Индол-3-пропионовая кислота	-	-	-	-	<0,01 ↓	-	-	-	-	-
Кортизол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитруллин	<0,01 ↑	-	-	<0,01 ↑	-	-	-	-	-	-
Биоптерин	<0,05 ↓	-	-	-	<0,001 ↑	-	-	-	-	-
Неоптерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Значения измеренных концентраций метаболитов во всех исследуемых группах сравнивали поочередно: опытные группы №1-4 с группой сравнения, опытную группу №1 с группами №2-4, опытную группу №2 с группами №3-4 и опытную группу №3 с группой №4. Контрольная группа — группа сравнения, опытная группа №1 — 0,8 мкг/л диазепам, опытная группа №2 — 1,6 мкг/л диазепам, опытная группа №3 — 16 мкг/л диазепам, опытная группа №4 — 160 мкг/л диазепам. Значения в ячейках – *p*-уровень значимости. *Контр. – группа сравнения; **пр. – против группы № X (где X номер опытной группы).

Таблица А 3 – Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после краткосрочного воздействия 5F-АПИНАК

Метаболит	*Контр. **пр. 1	Контр. пр. 2	Контр. пр. 3	Контр. пр. 4	Контр. пр. 5	1 пр. 2	1 пр. 3	1 пр. 4	1 пр. 5	2 пр. 3	2 пр. 4	2 пр. 5	3 пр. 4	3 пр. 5	4 пр. 5
Гамма-аминомасляная кислота	-	-	-	-	<0,01 ↓	-	<0,01 ↓	-	<0,001 ↓	-	-	<0,01 ↓	-	-	<0,01 ↓
Глутаминовая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глутамин	-	-	-	-	<0,001 ↓	-	-	-	<0,001 ↓	-	-	<0,01 ↓	-	<0,05 ↓	<0,05 ↓
Триптофан	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,05 ↓	-	-	-	-	-	-
5-гидроксириптофан	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Серотонин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-гидроксииндолуксусная кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Триптамин	-	-	-	<0,05 ↓	<0,001 ↓	-	-	-	<0,001 ↓	-	-	<0,001 ↓	-	<0,001 ↓	<0,01 ↓
Фенилаланин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Тирозин	-	-	-	-	<0,05 ↓	-	-	-	<0,01 ↓	-	-	-	-	-	<0,05 ↓
L-ДОФА	-	-	<0,05 ↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Дофамин	<0,01 ↑	-	<0,001 ↑	<0,05 ↑	<0,05 ↑	-	-	-	-	<0,01 ↑	-	-	-	-	-
Норадреналин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Норметанефрин	-	-	-	-	<0,01 ↓	-	-	-	<0,001 ↓	-	-	<0,05 ↓	-	-	<0,001 ↓

Продолжение Таблицы А 3.

Индол-3-акриловая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Индол-3-пропионовая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кортизол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитруллин	<0,05 ↓	<0,01 ↓	<0,001 ↓	<0,001 ↓	<0,001 ↓	-	<0,001 ↓	-	<0,001 ↓	<0,01 ↓	-	<0,001 ↓	<0,05 ↑	-	<0,01 ↓
Биоптерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Неоптерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Значения измеренных концентраций метаболитов во всех исследуемых группах сравнивали поочередно: опытные группы №1-5 с группой сравнения, опытную группу №1 с группами №2-5, опытную группу №2 с группами №3-5, опытную группу №3 с группами №4-5 и опытную группу №4 с группой №5. Контрольная группа — группа сравнения, опытная группа №1 — 0,001 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №2 — 0,01 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №3 — 0,1 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №4 — 1,0 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №5 — 10 мкМ 5F-АПИНАК. Значения в ячейках – *p*-уровень значимости. *Контр. – группа сравнения; **пр. – против группы № X (где X номер опытной группы).

Таблица А 4 – Основные статистические различия в концентрациях метаболитов у рыб вида *Danio rerio* после длительного воздействия 5F-АПИНАК

Метаболит	*Контр **пр. 1	Контр. пр. 2	Контр. пр. 3	Контр. пр. 4	Контр. пр. 5	1 пр. 2	1 пр. 3	1 пр. 4	1 пр. 5	2 пр. 3	2 пр. 4	2 пр. 5	3 пр. 4	3 пр. 5	4 пр. 5
Гамма-аминомасляная кислота	-	-	-	-	<0,001 ↓	-	<0,05 ↑	<0,001 ↑	<0,001 ↓	-	<0,05 ↑	<0,001 ↓	-	<0,001 ↓	<0,001 ↓
Глутаминовая кислота	-	-	-	<0,05 ↑	-	-	-	<0,001 ↑	-	-	<0,01 ↑	-	<0,01 ↑	-	<0,05 ↑

Продолжение Таблицы А 4.

Кортизол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитруллин	-	-	-	-	<0,001 ↑	-	-	<0,001 ↑	<0,001 ↑	-	-	<0,001 ↑	<0,001 ↑	<0,001 ↑	-
Биоптерин	<0,01 ↑	-	<0,001 ↑	<0,001 ↑	<0,001 ↑	-	-	<0,01 ↑	-	<0,001 ↑	<0,001 ↑	<0,05 ↑	-	-	-
Неоптерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Значения измеренных концентраций метаболитов во всех исследуемых группах сравнивали поочередно: опытные группы №1-5 с группой сравнения, опытную группу №1 с группами №2-5, опытную группу №2 с группами №3-5, опытную группу №3 с группами №4-5 и опытную группу №4 с группой №5. Контрольная группа – группа сравнения, опытная группа №1 – 0,001 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №2 – 0,01 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №3 – 0,1 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №4 – 1,0 мкМ 5F-АПИНАК, опытная группа №5 – 10 мкМ 5F-АПИНАК. Значения в ячейках – *p*-уровень значимости. *Контр. – группа сравнения; **пр. – против группы № X (где X номер опытной группы).