

*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

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, доцент

**Тарасов Вадим Владимирович**

**Научный консультант:**

кандидат химических наук

**Апполонова Светлана Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Воронина Татьяна Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория психофармакологии, заведующая лабораторией

**Маркин Сергей Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» июня 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Дроздов Владимир Николаевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

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 (Kaddurah-Daouk и др., 2008). 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 (Burt и Nandal, 2016).

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* (зебрафиш, данио рерио) как модельный организм ранее использовали при изучении биологии развития различных систем органов. Прозрачность эмбрионов позволила более глубоко исследовать процессы, происходящие при гастрюляции (Rohde и Heisenberg, 2007), развитии периферической и центральной нервной системы (ЦНС) (Lei и др., 2016). С помощью методов генетики и селекции были выведены линии рыб вида *Danio rerio*, моделирующие нейродегенеративные заболевания (Sosa и др., 2012), болезнь Паркинсона или тревожный синдром (Sarath Babu и др., 2016). Изучение поведенческой активности мальков *Danio rerio* используется для исследования действия химических веществ на ЦНС (Lee и Freeman, 2016). Рыбы вида *Danio rerio* обладают полностью функциональным гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) (Burgess и Granato, 2007), 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 и нейротоксикантов на ЦНС (Kokel и др., 2010; MacPhail и др., 2009).

В настоящее время с использованием данной биологической модели проводится изучение токсичности химических веществ с помощью определения полумлетальной концентрации (ЛК<sub>50</sub>) визуальными методами (Han и др., 2015; Liu и др., 2018; Stengel и др., 2018), однако метаболомные исследования могут дополнить знания о механизмах токсического и фармакологического действия ФАВ. Использование эмбрионов и мальков рыб вида *Danio rerio* также позволяет уменьшить использование животных в тестах на летальность и потенциально может дополнить данные исследований, полученных с помощью стандартных моделей.

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* в качестве биологической модели изначально использовались в тестах на токсичность химических веществ (определение выживаемости эмбрионов и мальков), 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 (Achenbach и др., 2018; Akhtar и др., 2016; Cassar и др., 2020; Ortiz-Villanueva и др., 2017). Данные исследования носят ситуационный характер, они не систематизированы, не существует единой методологии фармакометаболомных 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 фармакометаболомного 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 фармакометаболомного 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 метаболомного анализа образцов рыб вида *Danio rerio*.

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

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

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

5. Оценить взаимосвязь поведенческих эффектов с результатами целевого метаболомного 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, фармакометаболомными методами с помощью нецелевого метаболомного 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 метаболическим анализом.

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

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 метаболического и фармакометаболического анализа (Кукес В.Г., Сычёв Д.А., Раменская Г.В., Дедов И.И., Арчаков А.И., Маркин С.С., 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 в качестве биологической модели с целью описания действия химических веществ на морфологические характеристики, поведенческие реакции и профиль эндогенных метаболитов (Шабанов П.Д., Качанов Д.А., Калувев 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 ЕАЭС, FDA, ЕМА.

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 результатов**

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; использованием рыб вида *Danio rerio*, 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, Краснодарский край, 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 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.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В ходе изучения литературных данных обсуждены возможности использования метаболомного и фармакометаболомного анализа в клинической практике и доклинических исследованиях, описаны различные аналитические методики, применяемые в метаболомике, обсуждены их преимущества и недостатки. Также, приведено обоснование преимуществ *Danio rerio* как биологической модели, описаны примеры использования зебрафиш в доклинических исследованиях. Приведены основные методические и методологические основы применения фармакометаболомного подхода в исследовании фармакологических эффектов ФАВ с использованием мальков рыб вида *Danio rerio*.

### **Материалы и методы исследования**

В качестве исследуемых веществ нейротропного действия были использованы диазепам (7-хлоро-1-метил-5-фенил-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) и 5F-АПИНАК ((3s,5s,7s)-адамantan-1-ил-1-(5-фторпентил)-1Н-индазол-3-карбоксилат). Диазепам является фармакологическим веществом с четко описанными свойствами и механизмом действия; также, диазепам используется в качестве эталонного препарата при экспериментальном изучении и поиске новых лекарственных средств анксиолитического действия. В связи с этим, диазепам был выбран как препарат изучения комплексного воздействия на нейромедиаторные системы мальков рыб вида *Danio rerio*.

5F-АПИНАК по химической структуре и механизму действия относится к классу синтетических каннабиноидов. Реализация эффектов синтетических каннабиноидов происходит в основном за счет взаимодействия с каннабиноидными рецепторами первого типа (CB1). В связи с вышеизложенным, для изучения возможности применения мальков рыб вида *Danio rerio* для изучения эффектов синтетических каннабиноидов на ЦНС был выбран 5F-АПИНАК.

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 массспектрометрическим 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 16873xg 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). Чистота всех использованных реактивов и стандартных образцов была не ниже 99,0%.

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.

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.

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*. 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.

Для определения панели эндогенных метаболитов, необходимых для изучения фармакологических эффектов химических веществ нейротропного действия, проводился нецелевой метаболомный анализ образцов мальков зебрафиш, подвергавшихся воздействию диазепама, и группы сравнения, методом ГХ-МС. На основе полученных данных и анализа литературы была сформирована целевая панель эндогенных веществ – нейромедиаторов и их метаболитов. Для определения концентраций эндогенных метаболитов целевой панели была разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС. Далее, были проведены эксперименты по краткосрочному и длительному воздействиям диазепама и 5F-АПИНАК для установления изменения концентраций нейромедиаторов и их метаболитов целевыми фармакометаболомными методами. Также, с целью подтверждения влияния 5F-АПИНАК на ЦНС и для установления связи метаболомных изменений концентраций нейромедиаторов у рыб вида *Danio rerio* как ответа на введение вещества, действующего на ЦНС, были проведены поведенческие тесты на рыбах вида *Danio rerio* после воздействия 5F-АПИНАК.

Статистическая обработка и анализ экспериментальных данных проводились с помощью программ Statistica 10.0, SPSS 23.0, SIMCA 13.0 и онлайн-платформы Metaboanalyst 5.0.

### **Результаты исследования**

На первом этапе работы проводили нецелевое метаболомное профилирование методом ГХ-МС для идентификации целевой панели эндогенных метаболитов, необходимой для изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия фармакометаболомными методами, используя зебрафиш в качестве модельного организма. Для проведения нецелевого метаболомного профилирования были отобраны пробы зебрафиш, подвергавшихся воздействию раствора диазепама в концентрации 160 мкг/л, и группы сравнения.



Рисунок 1 – Схема плана исследования.

Воздействие диазепама на зебрафиш вызвало изменение концентраций метаболитов, связанных с множеством метаболических путей. 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.

Таким образом, с целью изучения фармакологических эффектов физиологически активных веществ нейротропного действия с использованием рыб вида *Danio rerio* как модельного организма, на основании нецелевого фармакометаболомного анализа в целевую панель метаболитов были включены метаболиты дофаминергической/адренергической и серотонинергической систем. Также в целевую панель были включены метаболиты основных систем нейрональной передачи: ГАМКергической, холинергической и системы аспартата. Помимо этого, в целевую метаболомную панель вошли эндогенные вещества сопутствующих метаболических путей, которые могут оказывать воздействие на метаболизм нейромедиаторов: кинурениновый путь метаболизма триптофана; индоловый (микробиомный) путь метаболизма триптофана; биоптерин и неоптерин, являющиеся производными кофактора фермента, ответственного за синтез нейромедиаторов-моноаминов; кортизол как один из главных эндогенных метаболитов-биомаркеров стресса.

На втором этапе исследования проводили разработку и валидацию методики количественного определения нейромедиаторов и эндогенных веществ, связанных с

нейротрансмиссией, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). 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, эффекта переноса, внутри- и межсерийной прецизионности и правильности, степени извлечения, матричного эффекта и стабильности.

Селективность разработанной методики была приемлема для дифференцированной оценки исследуемых аналитов в присутствии компонентов холостого образца, сигналы интерферирующих пиков составляли не более 20% от нижнего предела количественного определения (НПКО) методики.

Коэффициенты детерминации калибровочных кривых ( $R^2$ ) для всех исследуемых эндогенных соединений составляли не менее 0,99. Аналитический сигнал для каждого из исследуемых соединений для концентраций на уровне НПКО не менее, чем в пять раз превосходил величину сигнала холостого образца.

Исследования эффекта переноса показали отсутствие интерферирующих пиков на хроматограммах холостых образцов после анализа калибровочных стандартов. Величина эффекта матрицы и коэффициента экстракции, выраженные в относительных величинах (RSD) не превышали  $\pm 15\%$ .

Показатели внутри- и межсерийной правильности и прецизионности методики укладывались в диапазон от 85 до 115% для правильности и  $\pm 15\%$  для прецизионности, соответственно. Показатели стабильности, оцененные для рабочих растворов исследуемых аналитов, которые хранились 6 часов при комнатной температуре ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ ), биологических образцов, которые хранились 24 часа в автосамплере хромато-масс-спектрометрической системы при температуре  $10 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , биологических образцов, которые предварительно подвергали 3 циклам замораживания-размораживания и биологических образцов, которые предварительно подвергали хранению в течение 30 дней в условиях глубокой заморозки при температуре минус  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , укладывались в установленные диапазоны – средняя погрешность измеренных концентраций исследуемых аналитов в образцах контроля качества была в пределах  $\pm 15\%$ .

Далее, 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 основных нейромедиаторных систем после введения диазепама в

концентрациях 0,8, 1,6, 16 и 160 мкг/л (опытные группы №1-4) 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. Основные статистически значимые различия представлены на Рисунке 2.

Краткосрочное воздействие (2,5 ч) диазепама на рыб вида *Danio rerio*, не оказывало дозозависимого изменения в измеренных значениях концентраций ГАМК. Полученный результат можно объяснить тем фактом, что первичный механизм действия бензодиазепинов заключается в связывании с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором, и, тем самым, увеличении отклика на воздействие ГАМК. Полученные данные согласуются с исследованиями о механизме действия диазепама, которое предполагает модуляцию ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, при этом не влияя на синтез ГАМК.

Аспарагиновая кислота является агонистом рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA-рецепторы) и альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионой кислоты (AMPA-рецепторы). 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<sub>A</sub>. Также существуют исследования, показывающие, что зависимость от диазепама формируется, в частности, из-за стимуляции рецепторов NMDA. Таким образом, можно заключить, что увеличенные концентрации аспарагиновой кислоты, вызванные воздействием диазепама, могут быть связаны с формированием зависимости.

Примечательным является тот факт, что концентрации триптофана статистически значимо увеличивались после краткосрочного воздействия диазепама (2,5 ч) и уменьшались после длительного воздействия (96 ч). 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. Существуют исследования, доказывающие, что анксиолитическое действие диазепама реализуется, в том числе, с помощью

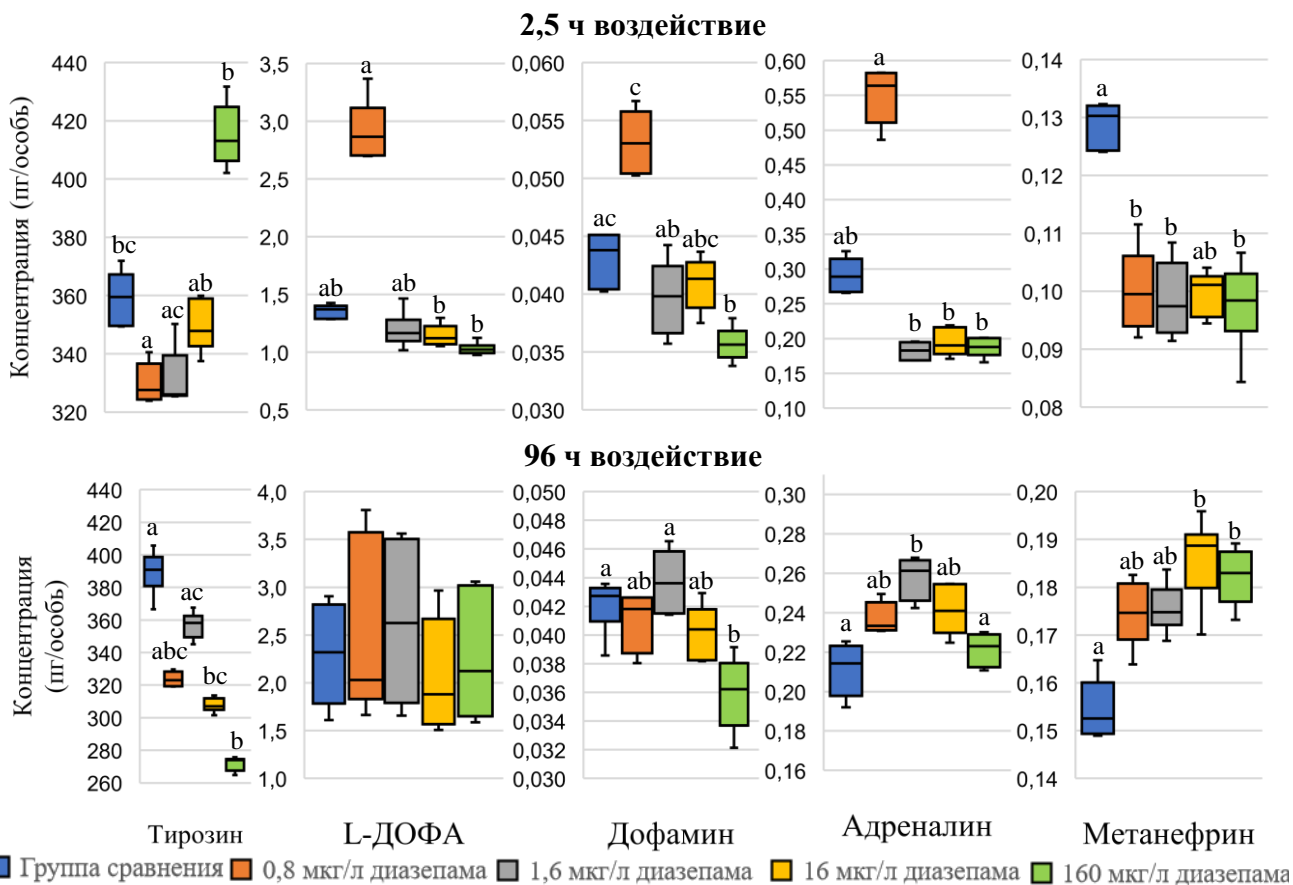
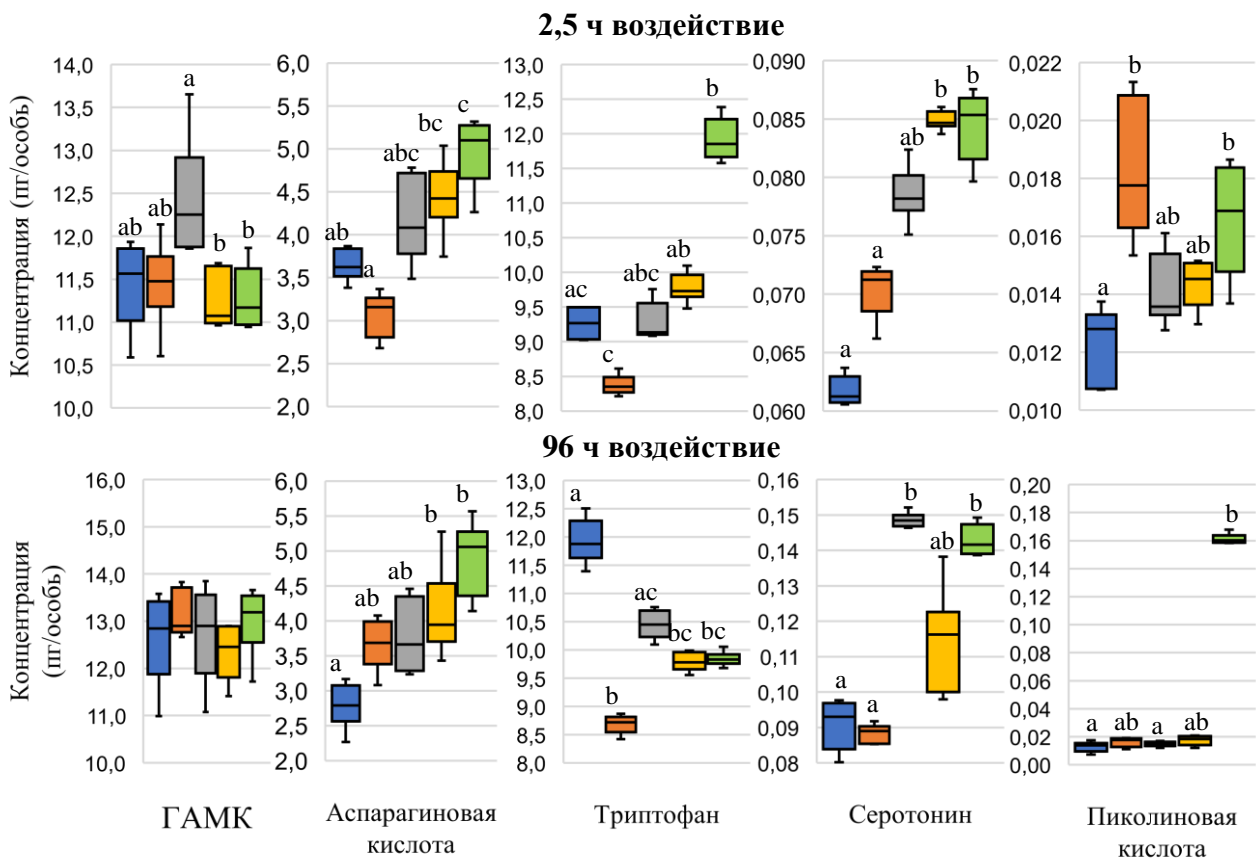


Рисунок 2 – Графики зависимости концентраций метаболитов от дозы диазепамы

\*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.

серотонинергической системы. Снижение нейронального выброса серотонина, а также увеличение его синтеза из триптофана, потенциально могут объяснить повышение его концентраций у мальков рыб вида *Danio rerio*.

Концентрации пиколиновой кислоты у групп рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию высшей дозы диазепама в течение длительного промежутка времени (96 ч), были повышены. Пиколиновая кислота является потенциальным антагонистом рецепторов NMDA, оказывая при этом нейропротективное действие. Повышение концентраций пиколиновой кислоты может указывать на реализацию компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение эксайтотоксического действия аспарагиновой кислоты.

Тирозин является аминокислотой-прекурсором для синтеза моноаминов семейства дофамина. Существующие исследования сообщают, что уровни экспрессии фермента тирозингидроксилазы, который катализирует реакцию превращения тирозина в L-ДОФА, повышаются после воздействия диазепама. Превращение тирозина в L-ДОФА и последующие метаболиты, а также уменьшение экспрессии тирозингидроксилазы потенциально может объяснить снижение уровней тирозина после длительного воздействия диазепама. Повышенные концентрации тирозина у группы, получавших наивысшую дозу диазепама в течение короткого промежутка времени (2,5 ч), могут быть связаны с уменьшением метаболизма тирозина, что подтверждается генеральной тенденцией к снижению концентраций моноаминов при увеличении дозы диазепама.

Интересным является факт увеличения концентраций L-ДОФА, дофамина 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. В связи с этим можно заключить, что результаты, полученные в ходе эксперимента, поддерживают гипотезу о воздействии диазепама на уровни дофамина, и доказывают, среди прочего, влияние на двигательную активность через дофаминергическую систему. Длительное воздействие (96 ч) диазепама в высших дозах привело к снижению концентраций L-ДОФА, дофамина и адреналина у рыб вида *Danio rerio*. Схожая тенденция изменения концентраций этих моноаминов может указывать на их возможный вклад в формирование поведенческого ответа на введение диазепама. Вышеописанные выводы подтверждаются видом тенденций концентраций метанефрина, которые уменьшались при краткосрочном воздействии (2,5 ч) диазепама и увеличивались при длительном воздействии (96 ч).



С целью установления рабочих концентраций растворов 5F-АПИНАК, было проведено определение полулетальной концентрации (ЛК<sub>50</sub>) 5F-АПИНАК для эмбрионов и мальков рыб вида *Danio rerio*. Исследование проводили в диапазоне концентраций 10-100 мкМ 5F-АПИНАК. По результатам пробит-регрессионного анализа была рассчитана ЛК<sub>50</sub> 5F-АПИНАК равная 55,0 мкМ (95% доверительный интервал – 44,3-68,7 мкМ).

Затем, было проведено фармакометаболическое 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 (опытные группы №1-5) в среду обитания рыб вида *Danio rerio*. Основные статистически значимые различия представлены на Рисунке 3.

Концентрации ГАМК были снижены у опытной группы №5, получавшей высшую дозу 5F-АПИНАК относительно группы сравнения. Было установлено, что каннабиноиды способны ингибировать выброс некоторых нейромедиаторов, в том числе ГАМК, а также уменьшать ГАМКергическую иннервацию. Было обнаружено, что рецепторы ГАМК модулируются с помощью эндоканнабиноидной системы; некоторые авторы сообщают, что введение эндоканнабиноидов усиливает стимуляцию ГАМКА-рецепторов при малых дозах ГАМК. Сниженные уровни ГАМК у опытной группы №5 рыб вида *Danio rerio*, получавших наивысшую дозу 5F-АПИНАК, 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.

После воздействия 5F-АПИНАК, концентрации триптофана и триптамина статистически значимо изменялись у опытных групп по сравнению с контрольной группой. Некоторые исследователи сообщают, что эндоканнабиноидная система участвует в регуляции настроения и формировании депрессии через серотонинергическую систему. Также было обнаружено, что при введении Δ<sup>9</sup>-ТГК и синтетического каннабиноида WIN 55,212-2 наблюдается ингибирование синтеза 5-гидрокситриптофана и серотонина с помощью действия на активность триптофангидроксилазы в различных регионах мозга крыс. 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.

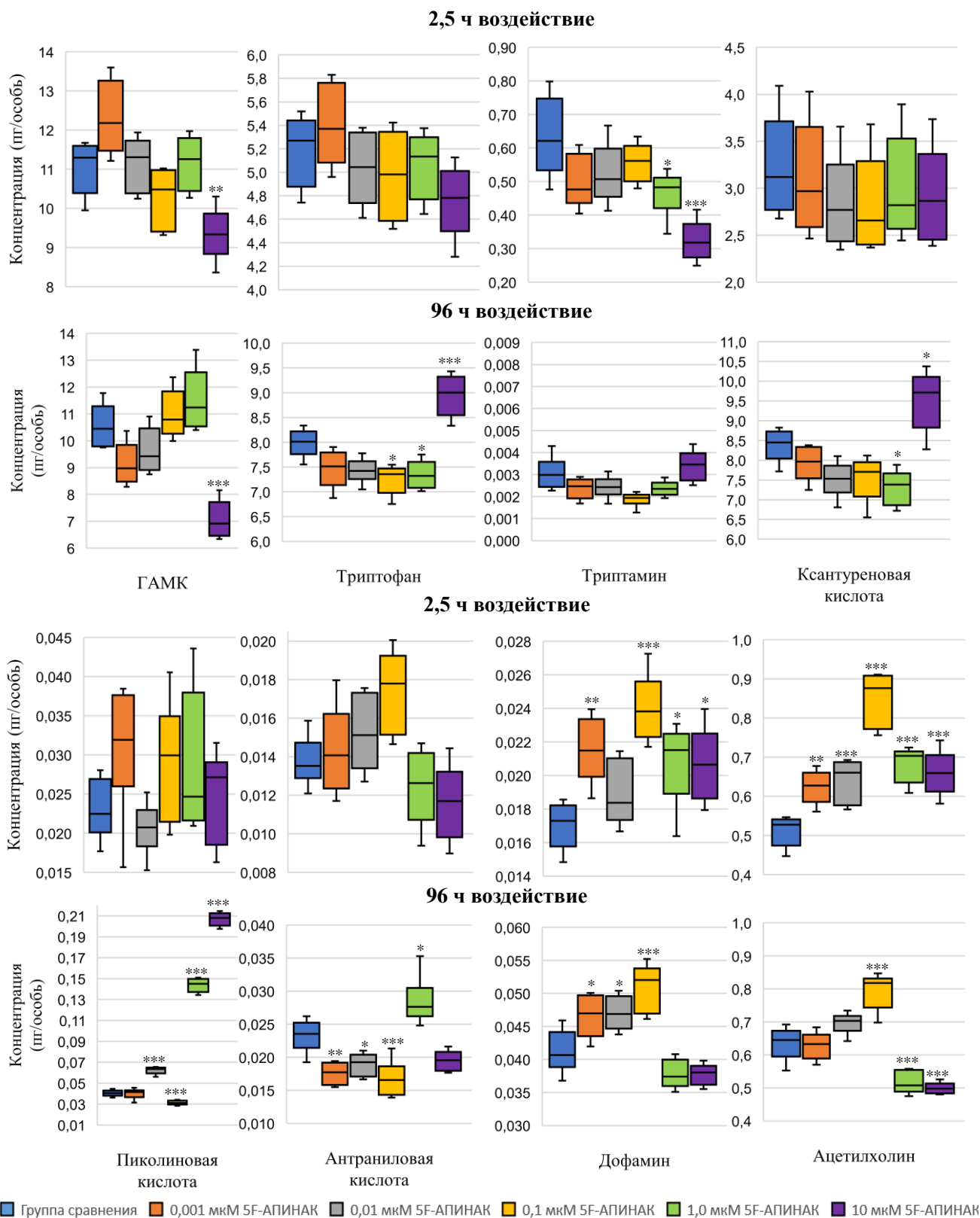


Рисунок 3 – Графики зависимости концентраций метаболитов от дозы 5F-АПИНАК

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (статистически значимые отличия между опытной группой и группой сравнения).

Триптамин относят к группе «следовых аминов» – соединений, которые структурно похожи на классические моноамины и подвергаются метаболическим превращениям по схожим

биохимическим путям. Следовые амины играют роль в регуляции количества моноаминов в синаптической щели, в частности, стимуляция рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами первого типа (TAAR1), приводит к выбросу нейромедиаторов и препятствует их обратному захвату. 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. Уровни ксантуреновой кислоты были повышены у рыб вида *Danio rerio*, подвергавшихся воздействию 5F-АПИНАК в течение длительного промежутка времени. Известно, что ксантуреновая кислота оказывает нейромодуляторные эффекты через усиление нейрональной передачи. Также считается, что анраниловая кислота и пиколиновая кислота уменьшают эксайтотоксические эффекты через гиперполяризацию мембран нервных клеток. 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. Известно, что активность дофаминовых рецепторов может регулироваться эндоканнабиноидной системой, при этом острое воздействие  $\Delta^9$ -ТГК ассоциировано с увеличением иннервации дофаминергических нейронов, увеличением синтеза дофамина и его выбросом в синаптическую щель. 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.

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. Введение  $\Delta^9$ -ТГК повышало концентрации ацетилхолина и холина практически во всех регионах мозга

мышей. Также было обнаружено ингибирование выброса ацетилхолина в синапсосамах гиппокампа каннабиноидом WIN 55,212-2. В связи с этим, 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.

Также, 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. Схожие морфологические изменения были зафиксированы в других экспериментах на рыбах вида *Danio rerio* при исследовании негативных эффектов каннабимиметиков. Например, воздействие  $\Delta^9$ -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. В эксперименте на рыбах вида *Danio rerio* было зарегистрировано, что 5F-АПИНАК проявляет тератогенные свойства.

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

Кратковременное воздействие (4 ч) 5F-АПИНАК на мальков рыб вида *Danio rerio* дозозависимо уменьшало общее пройденное расстояние. При длительном воздействии (48 ч) 5F-АПИНАК также наблюдалось снижение общих пройденных расстояний мальками зебрафиш. Воздействие самой высокой дозы 5F-АПИНАК (10 мкМ) вызывало резкое снижение двигательной активности сразу после введения, которое сохранялось вплоть до второго дня воздействия (Рисунок 4). Концентрации ГАМК, глутамина, триптофана и холина также показали статистически значимые корреляции с общими пройденными расстояниями мальками рыб вида *Danio rerio*.

Согласно литературным данным, двигательная активность мальков рыб вида *Danio rerio* подавляется при введении высоких доз агонистов каннабиноидных рецепторов. Данный вид эффекта на двигательную активность наблюдался при введении многих агонистов каннабиноидных рецепторов (анандамид,  $\Delta^9$  - ТГК, WIN 55,212-2, JWH-018, среди прочих), и предполагает, что данный вид ответа типичен для эндоканнабиноидной системы.

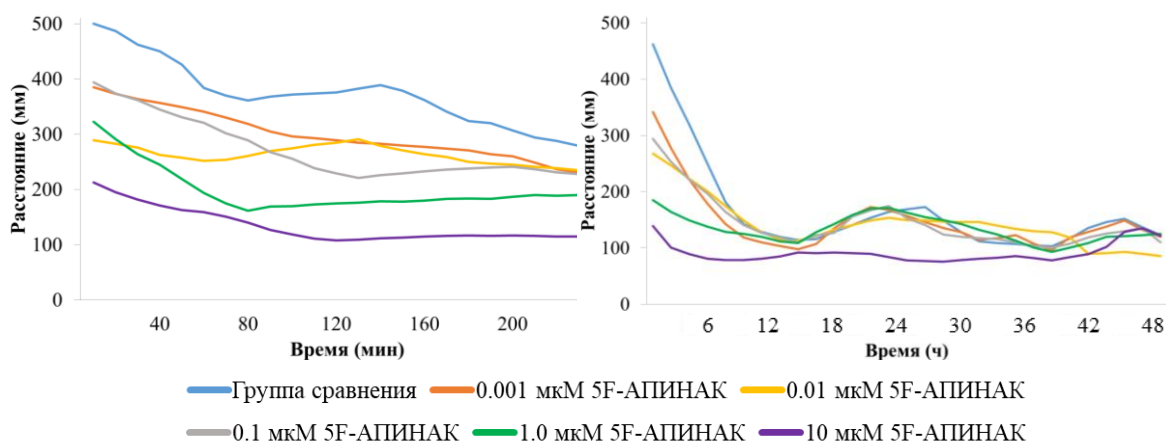


Рисунок 4 – Общее расстояние, пройденное мальками рыб вида *Danio rerio* на протяжении 4-х и 48-ми часового воздействия 5F-АПИНАК

Введение 5F-АПИНАК вызывало дозозависимое уменьшение общего пройденного расстояния как в течение первых 4-х часов после введения, так и во время длительного воздействия. Наличие данных эффектов традиционно принято считать проявлением тревожности. В некоторых исследованиях было доказано, что уменьшение концентраций ГАМК, глутамина, триптофана и холина связаны с тревожными расстройствами. В связи с этим, полученных данные согласуются с предложением о формировании тревожного состояния у мальков рыб вида *Danio rerio*.

## 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 ЕМА, 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

заклучить, что механизм действия диазепама реализуется только через модуляцию ГАМКА-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 мальков 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 фармакометаболических 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 метаболических панелей и проведение фармакометаболических 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 метаболических, транскриптомных и геномных данных.

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. **Маркин П.А.** Сравнительный анализ моделей поведения зебрафиш и мышей под воздействием нового психоактивного вещества APINAC / **П.А. Маркин**, В.В. Тарасов, С.А. Апполонова // Естествознание, техника, технологии: современные парадигмы и практические разработки: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 30 октября 2019г. : Белгород. 2019. С. 15–24. ISBN 978-5-6043497-2-4

2. Шестакова К.М. Изучение метаболизма нового синтетического каннабимиметика 5F-APINAC / К.М. Шестакова, **П.А. Маркин**, В.В. Тарасов, С.А. Савчук // Ценность естественно-научного и технического знания в условиях современной техногенной цивилизации: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 27 мая 2020г. : Белгород. 2020. С. 25–38. – ISBN 978-5-6044506-5-9

3. **Маркин П.** Анализ модели поведения зебрафиш под воздействием нового психоактивного вещества 5F-APINAC / **П.А. Маркин**, В.В. Тарасов, С.А. Апполонова // Перспективные научные исследования и инновационно-технологические разработки: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 27 августа 2020г. : Белгород. 2020. С. 15–24. – ISBN 978-5-6044822-4-7

4. **Маркин П.А.** Метаболическое профилирование как способ оценки безопасности и/или эффективности физиологически активных веществ / **П.А. Маркин**, В.В. Тарасов, Ф. Тальяро, С.А. Апполонова // IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и

капиллярный электрофорез” с международным участием 27 сентября - 03 октября 2020г. : Краснодар. 2020. – ISBN 978-5-9905792-9-3

5. Шестакова К.М. Изучение фармакокинетики нового синтетического каннабимиметика 5F-APINAC и его влияния на триптофановый метаболизм / К.М. Шестакова, **П.А. Маркин**, С.А. Савчук, С.А. Апполонова // IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” с международным участием 27 сентября - 03 октября 2020г. : Краснодар. 2020. – ISBN 978-5-9905792-9-3

6. **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, В.В. Тарасов, М.В. Савицкий, С.А. Апполонова // **International Journal of Medicine and Psychology**. – 2020. – Т. 3. – № 5. – С. 123-132. [**BAK**]

7. 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, A. Brito, R.M. Kuznetsov, **P.A. Markin**, N.L. Bochkareva, D. Burmykin, M. Ovcharov, G. Musile, F. Tagliaro, S.A. Savchuk // **Forensic Toxicology**. 2020. № 1 (38). С. 160–171. [**Scopus**]

8. **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, F. Tagliaro, M.R. La Frano, M.V. Savitskii, S.A. Appolonova // **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**. 2021. (243). [**Scopus**]

9. **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, F. Tagliaro, V.V. Tarasov, M.R. La Frano, M.V. Savitskii, S.A. Appolonova // **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**. 2021. (38). [**Scopus**]

10. **Markin P.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 / **P.A. Markin**, N.Ye. Moskaleva, S.A. Appolonova // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration. 2021. С. 73–78.



### Список сокращений и условных обозначений

ВЭЖХ-МС/МС	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
ФАВ	–	Физиологически активное вещество
ГАМК	–	Гамма-аминомасляная кислота
ГХ-МС	–	Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
NMDA	–	N-метил-D-аспартат
AMPA	–	$\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4- изоксазолпропионовая кислота
TAAR1	–	Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, первого типа
ЦНС	–	Центральная нервная система
ЛК <sub>50</sub>	–	Полулетальная концентрация