

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Волкова А.А.^{1,2}, Калёкин Р.А.^{1,2}, Орлова А.М.¹, Павлова А.З.^{1,3}, Асташкина О.Г.^{1,4}, Павлов А.Л.^{1,5}

Влияние залеплона на метаболические изменения нейротрансмиттеров и токсические эффекты у рыбок Данио

¹ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125284, Москва, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Российская Федерация;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Минобрнауки России, 117418, Москва, Российская Федерация;

⁴ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Департамента здравоохранения Москвы, 115516, Москва, Российская Федерация;

⁵ГБУ города Москвы «Центр реабилитации инвалидов "Царицыно"» Департамента труда и социальной защиты населения города Москвы, 117534, Москва, Российская Федерация

Введение. Z-препараты представляют собой группу “небензодиазепиновых” препаратов с основным способом действия, регулирующим поведение во сне у человека посредством воздействия на ГАМК-рецепторы. Имеются сообщения, указывающие на токсические последствия передозировки и злоупотребления залеплоном. Тем не менее, информация о влиянии Z-препаратов на уровни нейротрансмиттеров скудна.

Цель исследования – изучение влияния воздействия залеплона на уровни нейротрансмиттеров у личинок рыбок Данио с помощью целенаправленной метаболомики.

Материал и методы. 4-часовое воздействие залеплона в концентрациях 0, 1, 1,0, 10, 100 и 1000 мкг/л проводили на личинках рыбок Данио. Группы вмешательства сравнивались с контрольными группами. Каждая группа состояла из 20 личинок рыбок Данио. Нейромедиаторы и их метаболиты были измерены с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Результаты. Были количественно определены двадцать два метаболита, связанных с нейротрансмиссией. Значительно увеличенными метаболитами были триптофан, серотонин, 5-гидроксииндолуксусная кислота, ацетилсеротонин, адреналин и холин. Значительно сниженными метаболитами были 5-гидроксириптофан, 5-метокситриптамин, дофамин, норметанефрин, метанефрин, кинуренин, 3-гидроксикинуренин, антралиловая кислота и гамма-аминомасляная кислота.

Ограничение исследования. При изучении метаболических изменений нейротрансмиттеров и токсических эффектов у рыбок Данио были проанализированы результаты группы из 20 личинок, что представляет собой достаточную выборку для констатации полученных результатов.

Заключение. Воздействие Залеплона вызывало метаболические изменения в концентрациях нейромедиаторов, связанных с большинством основных нейромедиаторных систем.

Ключевые слова: Z-препараты; залеплон; метаболомика; рыбки Данио; токсичность; нейротрансмиссия

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов, так как исследование проводилось на эмбрионах рыб в соответствии с SIS 33774-2016 “Тестирование химических веществ, представляющих опасность для окружающей среды. Острая токсичность эмбрионов рыб (FET)”.

Для цитирования: Волкова А.А., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Павлова А.З., Асташкина О.Г., Павлов А.Л. Влияние залеплона на метаболические изменения нейротрансмиттеров и токсические эффекты у рыбок Данио. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(3): 192-203. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-3-192-203>

Для корреспонденции: Орлова Алевтина Михайловна, кандидат фарм. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы», Москва. E-mail: himija@rc-sme.ru

Участие авторов. Все соавторы внесли равнозначный вклад в исследование и подготовку статьи к публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 27 декабря 2022 / Принята в печать: 26 мая 2023 / Опубликовано: 30 июня 2023

Volkova A.A.^{1,2}, Kalekin R.A.^{1,2}, Orlova A.M.¹, Pavlova A.Z.^{1,3}, Astashkina O.G.^{1,4}, Pavlov A.L.^{1,5}

The effect of zaleplon on metabolic changes in neurotransmitters and toxic effects in Danio fish

¹FGBU "Russian Center of Forensic Medical Examination", 125284, Moscow, Russian Federation;

²FGAOU VO "Peoples' Friendship University of Russia", 117198, Moscow, Russian Federation;

³FGBNU "Scientific Research Institute of Human Morphology named after Academician A.P. Avtsyn" Ministry of Education and Science of Russia, 117418, Moscow, Russian Federation;

⁴GBUZ "Bureau of Forensic Medical Examination" of the Moscow Department of Health, 115516, Moscow, Russian Federation;

⁵GBU of Moscow Center for Rehabilitation of disabled people "Tsaritsyno", 117534, Moscow, Russian Federation

Introduction. Z-drugs are a group of "non-benzodiazepine" drugs with the main mode of action regulating sleep behavior in humans through exposure to GABA receptors. There are reports indicating the toxic effects of overdose and abuse of zaleplon. However, information on the effect of Z-drugs on neurotransmitter levels is scarce.

The aim of this study was to study the effect of zaleplon exposure on neurotransmitter levels in the larvae of Danio fish using targeted metabolomics.

Material and methods. 4-hour exposure to zaleplon in concentrations of 0.1, 1.0, 10, 100 and 1000 µg/l was carried out on the larvae of Danio fish. Intervention groups were compared with control groups. Each group consisted of 20 larvae of Danio fish. Neurotransmitters and their metabolites were measured using high-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Results. Twenty-two metabolites associated with neurotransmission were quantified. Significantly increased metabolites were tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid, acetylserotonin, epinephrine and choline. Significantly reduced metabolites were 5-hydroxytryptophan, 5-methoxytryptamine, dopamine, normetanephrine, metanephrine, kynurenine, 3-hydroxykinurenine, anthranilic acid and gamma-aminobutyric acid.

Limitation. When studying metabolic changes in neurotransmitters and toxic effects in Danio fish, the results of a group of 20 larvae were analyzed, which is a sufficient sample to state the results obtained.

Conclusion. Exposure to zaleplon caused metabolic changes in the concentrations of neurotransmitters associated with most major neurotransmitter systems.

Keywords: Z-drugs; zaleplon; metabolomics; Danio fish; toxicity; neurotransmission

Compliance with ethical standards. The study does not require the submission of a biomedical ethics committee opinion or other documents, as the study was conducted on fish embryos in accordance with SIS 33774-2016 "Testing chemicals that pose a danger to the environment. Acute toxicity of fish embryos (FET)".

For citation: Volkova A.A., Kalekin R.A., Orlova A.M., Pavlova A.Z., Astashkina O.G., Pavlov A.L. The effect of zaleplon on metabolic changes in neurotransmitters and toxic effects in Danio fish. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2023; 31(3): 192-203. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-3-192-203> (In Russian)

For correspondence: Alevtina M. Orlova, Ph.D. in Pharmaceutical Sciences, Leading Researcher of Russian Center of Forensic Medical Examination, Moscow. E-mail: himija@rc-sme.ru

Author contribution. All co-authors made an equal contribution to the research and preparation of the article for publication.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was not sponsored.

Received: December 27, 2022 / Accepted: May 26, 2023 / Published: June 30, 2023

Введение

Небензодиазепиновые снотворные препараты (или “Z-наркотики”) были разработаны в конце 80-х – начале 90-х годов в качестве альтернативы классическим бензодиазепинам [1]. Z-препараты имеют тот же механизм действия, что и классические бензодиазепиновые препараты, и используются для лечения бессонницы [2]. Потенциал использования небензодиазепиновых снотворных средств связан с более привлекательными клиническими свойствами по сравнению с классическими бензодиазепинами, включая меньшую продолжительность действия, меньшие побочные эффекты в дневное время и отсутствие нарушения архитектуры сна [3]. Хотя Z-препараты часто применяются в медицине, их также можно найти на нелегальном рынке; кроме того, существует множество сообщений о злоупотреблении Z-препаратами [4].

Бензодиазепины и Z-препараты объединяет то, что основным способом действия является связывание с рецепторами гамма-аминомасляной кислоты типа A (ГАМК-R), что аллостерически усиливает действие его медиатора ГАМК. Большая часть исследований, касающихся изучения эффектов бензодиазепинов и Z-препаратов, сосредоточена на ГАМК, поскольку она является основным медиатором, участвующим в выражении способа действия, но прогресс в области метаболизма потенциально может помочь получить обширные знания о влиянии этих препаратов на различные нейротрансмиттеры [5–7].

Исследования метаболизма могут быть оценены используя различные модели, и одной из моделей на животных, которая в настоящее время вызывает растущий интерес, является рыбка Данио. Рыбка Данио (*Danio rerio*) впервые была полностью охарактеризована в 1995 г. и использовалась в качестве модели для изучения биологии развития и различных заболеваний. С тех пор рыбки Данио широко используются в качестве модели на животных в различных научных областях, включая исследования биологических эффектов наркотиков и веществ, вызывающих злоупотребление [8, 9]. Рыбки Данио являются отличной моделью для исследований нейротропных препаратов, поскольку они демонстрируют очень быстрое развитие нейронов, имея все группы нейрональных клеток на 4-й день после оплодотворения [10].

В целом существует недостаток информации о влиянии Z-препаратов на нейротрансмиттеры и нейромедиаторные системы.

Цель исследования заключалась в устранении пробелов в знаниях о воздействии Z-препаратов на мозг с использованием залеплона в качестве экспериментального препарата и рыбок Данио в качестве экспериментального животного и целенаправленного метаболического анализа широкого спектра нейротрансмиттеров и связанных с ними метаболитов.

Материал и методы

Дизайн экспериментального исследования. Личинок рыбок Данио в возрасте пяти дней после оплодотворения (dpf) переносили в 12-луночные планшеты, по 20 эмбрионов на лунку, каждая лунка содержала 5 мл среды E3. В эксперименте было пять групп вмешательства, которые получали 0,1, 1,0, 10, 100 и 1000 мкг/л раствора залеплона в 0,1% ДМСО в течение 4 ч, и контрольная группа носителя (0,1% ДМСО в среде E3). Температура была установлена на уровне 26 ± 2 °C, чтобы имитировать нормальные условия жизни и уменьшить стресс.

Исследование проводилось в соответствии с SIS 33774-2016 “Тестирование химических веществ, представляющих опасность для окружающей среды. Острая токсичность эмбрионов рыб (FET)”, Директива ЕС 2010/63/EU и “Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей” CETS № 123.

Реагенты и растворы. Чистую воду ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) получали с использованием системы Millipore-Q. Ацетонитрил и метанол (градиентный сорт ВЭЖХ); NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, метиленовый синий и аскорбиновая кислота (чистый сорт); стандарты с изотопной маркировкой. Все остальные реагенты и химикаты имели класс ВЭЖХ или “чистый”. Среда E3 содержала 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ и 0,001% метиленового синего. 5F-APINAC растворяли в ДМСО в концентрации 10 mM, разбавляя в среде E3 до получения концентрации 10 мкM (конечная концентрация ДМСО составляла 0,1%). Для других рабочих растворов в качестве растворителя использовали 0,1% ДМСО в среде E3. В работе использовали стандартные образцы производителя Merck из собственной базы стандартов, предварительно проведя контроль качества методом ВЭЖХ.

Подготовка образцов. Пробоподготовку проводили, как описано ранее [6, 11, 12], с той лишь разницей, что в ходе настоящего исследования использовались изотопно меченные внутренние стандарты. Группу из 20 личинок переносили

в микротрубочки объемом 1,5 мл. Водную фазу удаляли, и к образцу добавляли 10 мкл 13 мм водного раствора метабисульфита натрия для предотвращения окисления метаболитов. Затем добавляли 10 мкл внутреннего стандартного раствора (10 мкг/мл раствора 2-гидроксиникотиновой кислоты), и образец перемешивали в течение 10 с. Затем добавляли 450 мкл холодного метанола, перемешивали в течение 20 с. Затем смесь обрабатывали ультразвуком на ледяной бане в течение 15 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 16,900 об/мин при 4 °С. Затем 200 мкл надосадочной жидкости переносили в новую микротрубочку и выпаривали досуха. Высушенный образец восстанавливали в 50 мкл 0,02% раствора аскорбиновой кислоты в соотношении 1:1 (в/в) вода: смесь метанола и 2 мкл раствора вводили в систему ВЭЖХ-МС/МС.

Высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия. Хроматографическое разделение проводили с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1290 Infinity II, подключенной к масс-спектрометру Agilent 6470 Triple Quad tandem, оснащенного источником ионизации электрораспылением. Жидкостный хроматограф был оснащен колонкой Discovery HS F5-3 PFP (150 мм × 2,1 мм × 3 мкм). Температура колонной печи была установлена на уровне 45 °С. Использовали градиентное элюирование (раствор элюента А, 100% вода, раствор элюента В, 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле), которое описано в табл. 1. Определение метаболитов проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) в режиме положительной ионизации. Параметры масс-спектрометра были следующими: капиллярное напряжение 1,5 кВ, температура источника 150 °С, испаряемый газ – азот, температура газа 300 °С, расход газа – 3 л/мин. Параметры MRM и время удерживания для всех метаболитов были оптимизированы отдельно.

Статистический анализ. Данные представлены в pg/fish. Для каждого образца было выполнено шесть последовательных инъекций для определения каждого метаболита. Эксперименты были повторены три раза в одних и тех же условиях с использованием разных животных. Данные из трех повторов были ранжированы и усреднены для каждой группы. Набор данных не содержал экстремальных значений. Экстремальные значения были определены как концентрации, превышающие 75-й перцентиль + 3 межквартильных диапазона (IQR). Нормальность данных проверялась с помощью теста Шапиро–Уилка. Большая часть данных была распростра-

Таблица 1 / Table 1

Градиент подвижной фазы, используемый для анализа ВЭЖХ-МС/МС
Mobile phase gradient used for LC-MS/MS analysis

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% подвижная фаза	
		А (100% вода)	В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле)
0	0.4	90	10
4	0.4	90	10
9	0.4	10	90
10	0.4	10	90
10.10	0.4	99	1
12	0.4	90	10

нена обычным образом. Данные преобразованы в журнал для целей сравнения. Односторонний тест ANOVA использовался для сравнения центральных тенденций между группами с последующей коррекцией HSD Tukey post hoc. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Statistica версии 10.0 (data analysis software system).

Результаты

В общей сложности было определено количественно двадцать два метаболита. В табл. 2 представлены основные различия между экспериментальными группами.

После воздействия у групп личинок, получавших самую высокую концентрацию залеplона (1000 мкг/л), наблюдалась гиперпигментация, реакция на внешние раздражители (постукивание) была изменена. Хотя смертность была незначительной во всех группах и составляла менее одной мертвой личинки на группу.

Межиндивидуальная изменчивость эмбрионов рыбок Данио была устранена при групповом скрещивании вместо парного разведения. Каждая группа содержала большое количество особей (20 личинок), эксперименты проводились в трех повторах, каждый образец анализировался шесть раз, чтобы увеличить мощность для обнаружения существенных различий. Одним из ограничений этого исследования является обширное обсуждение темы влияния бензодиазепинов на уровни метаболитов и отсутствие обсуждения влияния Z-препаратов на нейротрансмиссию. Это было связано с отсутствием исследований метаболомики в области влияния Z-препаратов на нейротрансмиссию. Наши данные представлены в пг / рыба вместо пг / сырой вес или / сухой вес.

Таблица 2 / Table 2

Различия между экспериментальными группами
Differences between experimental groups

Метаболит	Cont vs 2	Cont vs 3	Cont vs 4	Cont vs 5	Cont vs 6	2 vs 3	2 vs 4	2 vs 5	2 vs 6	3 vs 4	3 vs 5	3 vs 6	4 vs 5	4 vs 6	5 vs 6
Gamma-Aminobutyric acid	0.05	0.05	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Tryptophan	—	—	—	—	0.001	—	—	—	0.01	—	—	0.01	0.01	0.001	—
5-Hydroxytryptophan	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Serotonin	0.01	0.01	—	0.05	0.001	—	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	—	0.001	0.001
5-Hydroxyindole acetic acid (HIAA)	0.001	0.01	0.001	0.05	0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptamine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetylserotonin	0.001	0.001	—	—	0.05	—	0.001	0.01	0.05	0.001	0.01	0.05	—	—	—
5-methoxytryptamine	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	—	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	—	—	—
Dopamine	0.05	—	—	0.001	0.001	—	—	0.05	0.05	—	0.001	0.001	0.01	0.01	—
Norepinephrine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Normetanephrine	0.001	0.001	0.001	0.001	0.05	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.05
Epinephrine	—	—	—	0.01	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Metanephrine	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	—	—	0.01	—	—	—	0.01	—	0.01	0.001
Choline	0.001	—	0.01	0.001	0.001	0.001	0.05	0.001	0.001	—	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Kynurenine	0.001	0.001	0.01	0.001	—	—	—	—	0.05	—	—	0.05	—	—	0.01
Kynurenic acid	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	0.05	0.05	—	—	—	—
3-Hydroxykynurenine	—	—	—	0.001	0.001	—	—	0.001	0.001	—	0.01	0.001	—	0.01	—
Anthranilic acid	—	0.05	0.001	0.001	0.01	—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—
Xanthurenic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Quinolinic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indole-3-carboxaldehyde	0.05	0.01	0.001	0.001	0.05	—	0.001	0.05	—	0.01	—	—	—	0.001	—
Indole-3-acetic acid	—	—	—	0.001	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	—	—
Indole-3-butyric acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indole-3-lactic acid	0.001	0.001	0.001	0.01	0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indole-3-acrylic acid	—	0.001	0.001	0.01	0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indole-3-propionic acid	0.05	0.01	0.001	0.001	0.001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cortisol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Значения представляют собой р-значения ниже 0,05, 0,01 или 0,001.

Это было сделано для того, чтобы избежать потенциального окисления нейротрансмиттеров, которые, как известно, очень лабильны.

Серотониновый путь превращения триптофана. Концентрации триптофана были значительно ($p < 0,001$) выше в группе, которая получала залеплон в самой высокой концентрации.

Концентрация 5-гидрокситриптофана показала тенденцию к снижению со значительно ($p < 0,01$) более низкими концентрациями, по сравнению с контрольной группой ДМСО.

Концентрации серотонина были выше ($p < 0,01$) в группах, которые получали 0,1 и 1,0 мкг/л залеплона, в то время как в группах, которые получали 100 и 1000 мкг/л залеплона, наблюдались более низкие ($p < 0,05$) концентрации серотонина.

Концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты были выше ($p < 0,05$) во всех группах, которые получали раствор залеплона, но без четкой тенденции между группами.

Воздействие раствора залеплона не влияло на концентрацию триптамина.

Концентрации ацетилсеротонина были выше ($p < 0,05$) в группах, которые подвергались воздействию 0,1, 1,0 и 1000 мкг/л растворов залеплона, по сравнению с контрольной группой.

Концентрации 5-метокситриптамина были статистически ниже ($p < 0,001$) во всех группах, которые подвергались воздействию залеплона, по сравнению с контрольной группой.

Дофаминергическая/адренергическая система. Концентрация дофамина была значительно ($p < 0,05$) ниже в группах, которые подвергались воздействию 0,1, 100 и 1000 мкг/л залеплона.

Воздействие залеплона не влияло на концентрацию норэпинефрина.

Концентрации норметанефрина были ниже ($p < 0,05$) во всех группах, которые подвергались воздействию залеплона, по сравнению с контрольной группой.

Концентрации адреналина были выше ($p < 0,05$) в группах, которые подвергались воздействию 100 и 1000 мкг/л залеплона.

Концентрации метанефрина были ниже ($p < 0,001$) во всех группах, которые подвергались воздействию растворов залеплона.

Метаболиты кинуренинового пути. Концентрации кинуренина были ниже ($p < 0,01$) в группах, получавших 0,1, 1,0, 10 и 100 мкг/л залеплона.

Воздействие залеплона не влияло на концентрацию кинуреновой кислоты.

Концентрации 3-гидроксикинуренина имели тенденцию к снижению со статистически более низкими ($p < 0,001$) концентрациями в группах,

получавших 100 и 1000 мкг/л залеплона, по сравнению с контрольной группой.

Концентрации антраниловой кислоты были ниже ($p < 0,05$) в группах, получавших 1,0, 10, 100 и 1000 мкг/л растворов залеплона, по сравнению с контрольной группой.

Концентрации ксантуреновой кислоты и хинолиновой кислоты не отличались в группах, получавших залеплон, по сравнению с контрольной группой.

Другие метаболиты. Концентрации гамма-аминомасляной кислоты были ниже ($p < 0,05$) в группах, получавших залеплон, что свидетельствует о тенденции к снижению, за исключением группы, получавшей наименьшую дозу залеплона (0,1 мкг/л).

Концентрации холина были ниже ($p < 0,01$) в группах, которые подвергались воздействию 0,1, 10 и 100 мкг/л растворов залеплона, в то время как в группе, которая подвергалась воздействию 1000 мкг/л залеплона, наблюдались статистически ($p < 0,001$) более высокие концентрации по сравнению с контрольной группой.

Воздействие залеплона не влияло на концентрацию кортизола.

Обсуждение

Цель исследования — изучение влияния воздействия залеплона на уровни нейротрансмиттеров у личинок рыбок Данио с использованием целенаправленной метаболомики. Текущее исследование показало, что воздействие залеплона изменяет метаболиты, связанные с несколькими системами нейротрансмиттеров (рис. 1, 2, 3). Кроме того, самая высокая доза залеплона приводила к токсическим эффектам, которые проявлялись через гиперпигментацию и снижение реакции на острый стресс (tapping), что коррелирует с результатами, полученными при оценке метаболитов.

Воздействие залеплона привело к увеличению концентрации триптофана в группе, получившей самую высокую дозу. Известно, что триптофан является предшественником многих нейромедиаторов. Хотя информация о влиянии бензодиазепиновых препаратов на уровни триптофана скудна, есть несколько классических работ, предполагающих, что воздействие бензодиазепинов приводит к повышению концентрации триптофана в головном мозге. Поскольку триптофан является незаменимой альфа-аминокислотой, возможным объяснением повышенных уровней триптофана в группах, получавших самую высокую дозу залеплона, может быть снижение скорости превращения этой аминокислоты в организме.

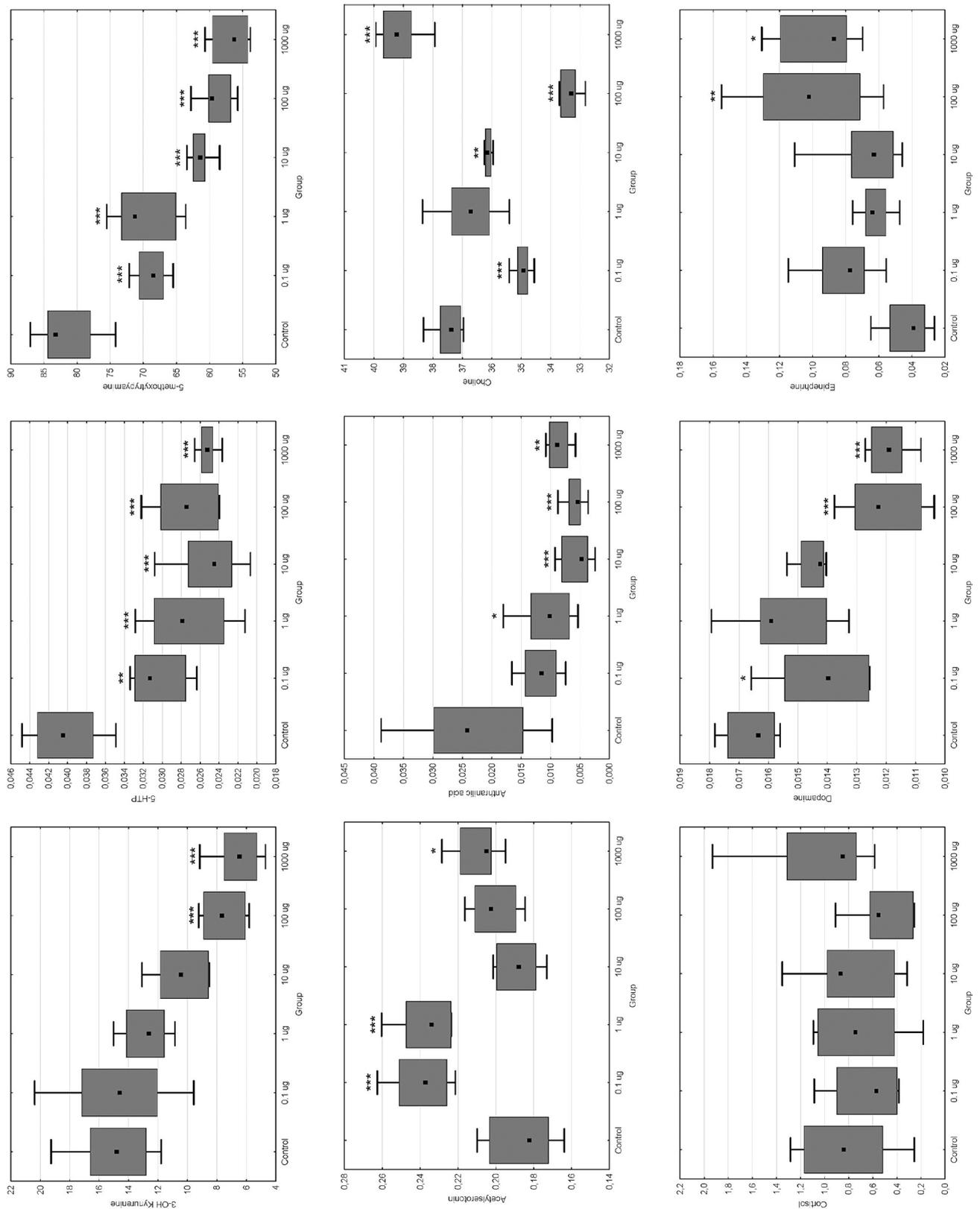


Рис. 1. Воздействие залеплона на изменение метаболитов. Часть 1. Уровень статистической значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
Fig. 1. Effect of zaleplon on metabolite change. Part 1. The level of statistical significance: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

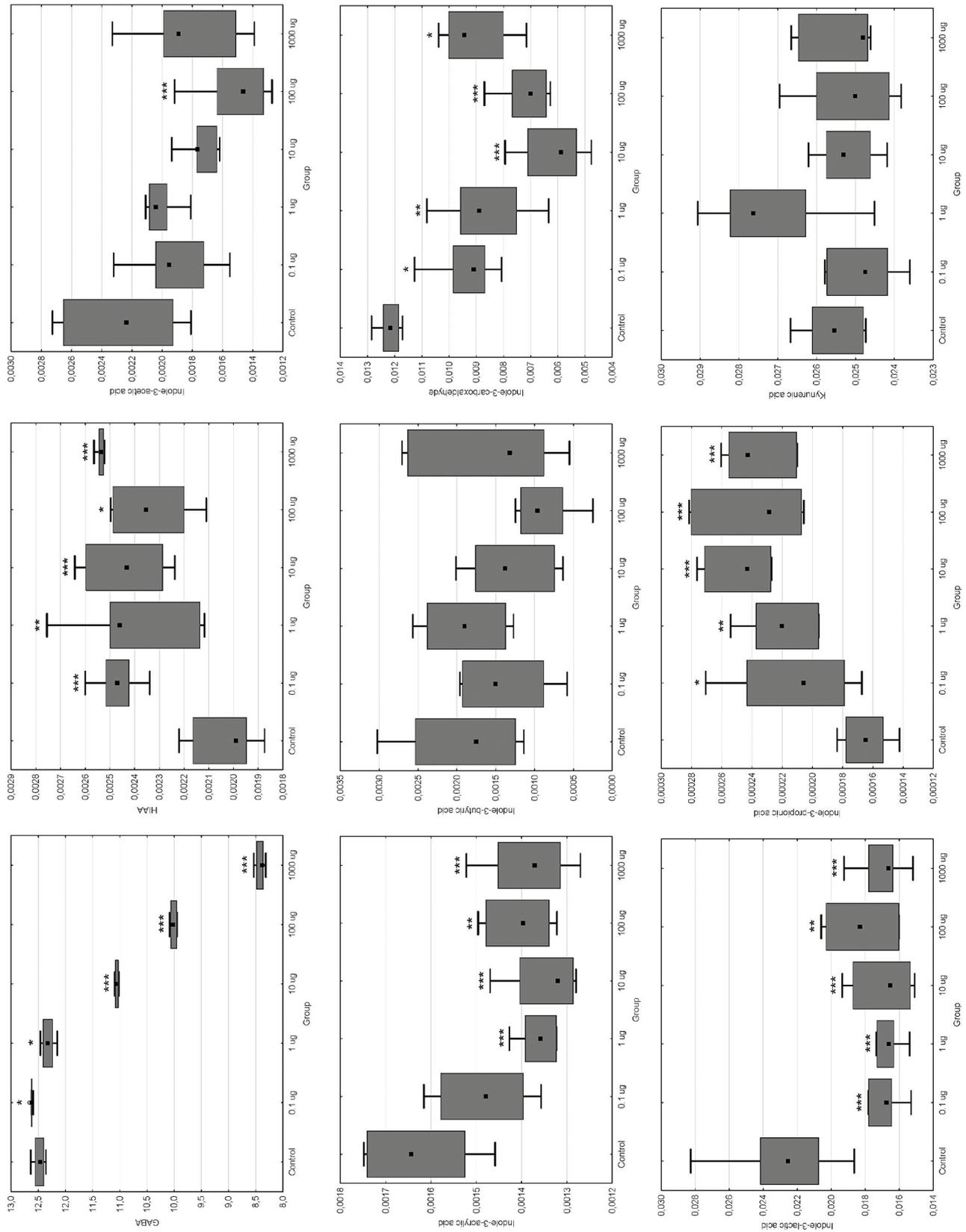


Рис. 2. Воздействие залеплона на изменение метаболитов. Часть 2. Уровень статистической значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
Fig. 2. Effect of zaleplon on metabolite change. Part 2. The level of statistical significance: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

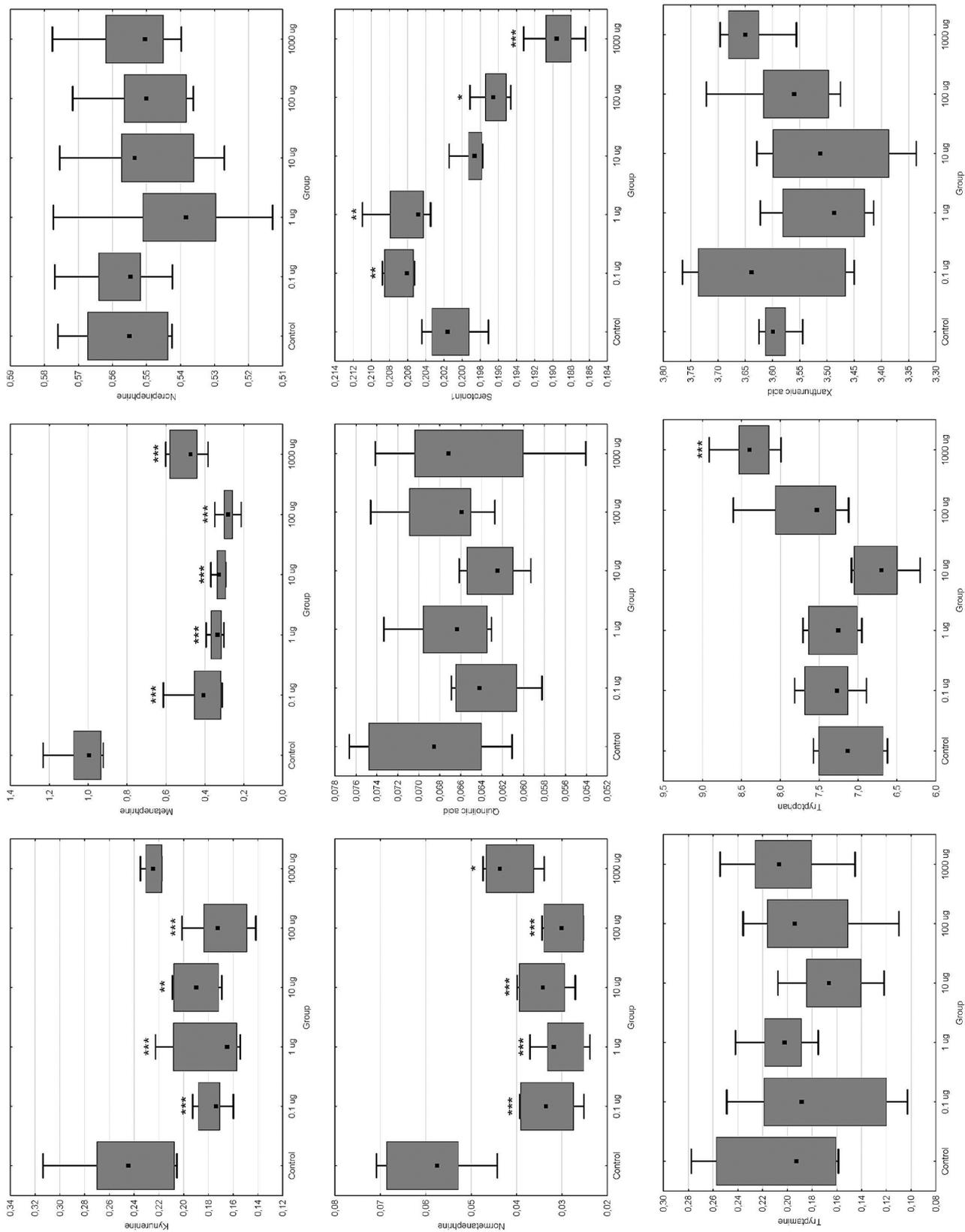


Рис. 3. Воздействие залеплона на изменение метаболитов. Часть 3. Уровень статистической значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
Fig. 3. Effect of zaleplon on metabolite change. Part 3. The level of statistical significance: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Концентрации 5-гидрокситриптофана медленно снизились во всех группах, подвергшихся воздействию. 5-гидрокситриптофан является прямым предшественником серотонина и отвечает за модуляцию центральной серотонинергической функции, включая внимание. Исследования, касающиеся влияния бензодиазепинов на уровни 5-гидрокситриптофана, показывают, что воздействие бензодиазепинов уменьшает накопление 5-гидрокситриптофана в головном мозге. Литература, касающаяся влияния бензодиазепинов на уровни 5-гидрокситриптофана, скудна, поэтому для интерпретации настоящих результатов необходимы будущие исследования.

Концентрация серотонина была снижена после воздействия залеплона. Серотонин является одним из наиболее важных нейромедиаторов в головном мозге, отвечающим за регуляцию настроения, уровня тревоги, депрессии, а также за частичное стимулирование бодрствования и торможение быстрого сна. В нескольких исследованиях сообщается о повышении уровня серотонина в головном мозге после воздействия бензодиазепинов [13], что согласуется с нашими результатами. Снижение концентрации серотонина в группах, получавших самые высокие дозы залеплона, может быть проявлением токсического действия этих доз.

5-гидроксииндолуксусная кислота является основным метаболитом серотонина. В нескольких исследованиях описано влияние воздействия бензодиазепинов на уровни 5-гидроксииндолуксусной кислоты. Например, воздействие диазепама и клоназепама приводит к повышению уровня 5-гидроксииндолуксусной кислоты в мозге мышей, а Haleem и Vatoool обнаружили, что воздействие диазепама приводит к повышению уровня 5-гидроксииндолуксусной кислоты в гиппокампе крыс после 4-дневных инъекций. Повышенные концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты при снижении концентрации серотонина, возможно, могут быть интерпретированы как увеличение конверсии серотонина.

Ацетилсеротонин и 5-метокситриптамин являются основными предшественниками мелатонина, основного гормона, регулирующего цикл сна-бодрствования. Существуют доказательства того, что бензодиазепины могут индуцировать высвобождение мелатонина, но они не оказывают никакого влияния на его метаболиты и предшественники. Другие авторы предполагают, что воздействие клобазама снижало уровень мелатонина в эпифизе при одновременном повышении концентрации ацетилсеротонина. Очевидно, что нет точных данных о влиянии бензодиазепинов

на уровни мелатонина и его метаболитов, и, действительно, требуются дополнительные исследования в этой области.

Известно, что дофамин является одним из наиболее важных нейромедиаторов в мозге, ответственных за формирование систем вознаграждения, поэтому большинство вызывающих привыкание веществ влияют на высвобождение или синтез дофамина. Считается, что бензодиазепины высвобождают свой аддиктивный потенциал, вызывая синаптическую пластичность дофаминергических нейронов, тем самым растормаживая их и формируя систему вознаграждения. Противоположные результаты были получены разными исследователями, предполагающими, что диазепам вызывал снижение высвобождения дофамина в прилежащем ядре, что оказывало противоположный эффект по сравнению с большинством вызывающих привыкание наркотиков. В некоторых исследованиях утверждается, что приём Z-препарата зопиклона перед сном приводил к нарушениям настроения у людей [14]. Снижение концентрации дофамина в головном мозге личинок рыбок Данио после воздействия залеплона, возможно, может быть связано с вышеупомянутыми результатами.

Концентрация адреналина была повышена после воздействия залеплона, в то время как норметанефрин и метанефрин были снижены. Основной способ действия катехоламинов связан со стрессом, хотя было обнаружено, что воздействие нейролептиков приводило к повышению уровня катехоламинов в плазме крови у крыс [15]. В другом исследовании было обнаружено, что острое воздействие алпразолама приводило к снижению уровня адреналина в плазме крови крыс [16]. Кроме того, было обнаружено, что воздействие лоразепама и алпразолама приводило к снижению концентраций адреналина и норадреналина в плазме крови крыс во время стресс-тестов. Возможное повышение концентрации адреналина, сопровождающееся снижением концентрации его метаболитов, возможно, может быть объяснено снижением скорости метаболизма адреналина, но требуются подтверждающие исследования.

Концентрация нескольких метаболитов кинуренинового пути, включая кинуренин, 3-гидроксикинуренин и антраниловую кислоту, была ниже в группах, которые подвергались воздействию залеплона. Метаболиты кинуренинового пути были описаны как оказывающие действие на центральную нервную систему в конце 1980-х годов, и до сих пор существуют работы, касающиеся действия метаболитов кинуренинового пути. Показано, что 3-гидроксикинуренин обладает

окислительно-восстановительной активностью, которая реализуется посредством регуляции окислительного статуса в тканях головного мозга [17]. Было показано, что антраниловая кислота оказывает благотворное действие при патологических процессах, связанных с воспалением [18]. Также стоит отметить, что воздействие залеплона не влияло на концентрации ни кинуреновой кислоты, ни ксантуреновой, ни хинолиновой кислоты. Известно, что эти эндогенные соединения обладают либо нейропротекторным, либо нейротоксическим действием. Что касается результатов воздействия залеплона, наше предыдущее исследование с использованием диазепама в качестве активного соединения показало несколько значительных повышений концентраций как нейропротекторных, так и нейротоксических метаболитов кинуренинового пути. Это приводит к предположению, что залеплон оказывает различное действие на центральную нервную систему, и требуются дальнейшие исследования в области вовлечения кинуренинового пути в действие бензодиазепинов.

Концентрации холина были неодинаковыми в группах, получавших залеплон. Существуют противоречивые результаты относительно влияния бензодиазепинов на уровень холина в головном мозге. Известно, что диазепам увеличивает эндогенные уровни холина, в то время как результаты некоторых авторов показывали, что воздействие бензодиазепинов не влияет на уровни холина. Наши результаты свидетельствуют о том, что воздействие залеплона приводило к двунаправленным эффектам, а повышенные уровни холина в группе, подвергшейся воздействию самой высокой дозы залеплона, указывают на реализацию токсического эффекта этой дозы.

Концентрации гамма-аминомасляной кислоты были ниже в группах, получавших залеплон. Информация об уровнях ГАМК в ответ на бензодиазепины скудна; известно, что основным способом действия бензодиазепама является связывание с ГАМК-рецепторами, что аллостерически усиливает их чувствительность к ГАМК (Pflanz и соавт., 2018). Некоторые исследователи предполагают, что Z-препараты обладают

несколько иным действием, чем “классические” бензодиазепины, реализующие своё действие через гамма-2- и гамма-3-содержащие рецепторы, и в этом случае их эффекты могут влиять на уровни ГАМК [19]. Исследования, касающиеся влияния Z-препаратов и других бензодиазепинов на уровни ГАМК, необходимы для понимания эффектов бензодиазепинов.

Самая высокая доза залеплона вызывала несколько токсических эффектов у личинок рыбок Данио. Время от времени сообщалось о передозировках залеплона [4,5]. Побочные эффекты передозировки Z-препаратов часто включают сонливость, галлюцинации, амнезию и парасомнию; в редких случаях имеются сообщения о смерти даже не при комбинированном применении этого препарата, а также после индивидуального приема Z-препаратов [4,6]. В нашем исследовании залеплон в концентрации 1000 мкг/л приводил к формированию эффектов, близких к описанным.

Использование растворителя в качестве контроля является стандартным подходом в токсикологии. Сильные стороны исследования включали использование контрольных групп, которые подвергались воздействию раствора растворителя-носителя.

Заключение

1. Впервые проведено метаболомическое исследование профиля нейротрансмиттеров у рыбок Данио после воздействия залеплона.

2. В исследовании установлена доза залеплона в концентрации 1000 мкг/л, которая приводила к токсическим эффектам, которые проявлялись через гиперпигментацию и снижение реакции на острый стресс, что коррелирует с результатами, полученными при оценке метаболитов.

3. Результаты исследования показали, что воздействие залеплона изменяют метаболиты, связанные с несколькими системами нейротрансмиттеров.

4. Полученные результаты, описанные в результатах исследования, и их оценка способствует знанию механизмов действия бензодиазепиноподобных Z-препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–4, 8–19 см. в References)

5. Волкова А.А., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Москалева Н.Е., Маркин П.А., Асташкина О.Г. Химико-токсикологическое исследование залеплона и его метаболитов в биологическом объекте мочы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022; 25(4): 15–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-03>
6. Калёкин Р.А., Москалева Н.Е., Волкова А.А., Орлова А.М., Маркин П.А., Невмятова С.Р., Апполонова С.А. Определение залеплона и клобазама методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии

- с высоким разрешением с использованием технологии Orbitrap. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2022; 65(2): 24–8. <https://doi.org/10.17116/sudmed20226502124>
7. Маркин П.А., Москалева Н.Е., Апполонова С.А., Волкова А.А., Орлова А.М., Калёкин Р.А., Невмятова С.Р. Разработка метода тонкослойной хроматографии для одновременного определения клобазама и залеплона в смеси. В сборнике: *Актуальные вопросы судебной медицины и права*. Сборник научно-практических статей. Казань: 2021; 158–61.

REFERENCES

1. Brandt J., Leong C. Benzodiazepines and Z-Drugs: An Updated Review of Major Adverse Outcomes Reported on in Epidemiologic Research. *Drugs in R and D*. 2017; 17(4). <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0207-7>
2. Gunja N. The Clinical and Forensic Toxicology of Z-drugs. *Journal of Medical Toxicology*. 2013; 9(2). <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0292-0>
3. Gunja N. In the Zzz Zone: The Effects of Z-Drugs on Human Performance and Driving. *Journal of Medical Toxicology*. 2013; 9(2). <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0294-y>
4. Schifano F., Chiappini S., Corkery J.M., Guirguis A. An Insight into Z-Drug Abuse and Dependence: An Examination of Reports to the European Medicines Agency Database of Suspected Adverse Drug Reactions. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2019; 22(4). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz007>
5. Volkova A.A., Kalekin R.A., Orlova A.M., Moskaleva N.E., Markin P.A., Astashkina O.G. Chemical and toxicological examination of zaleplon and its metabolites in the biological object urine. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii*. 2022; 25(4): 15–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-03> (in Russian)
6. Kalekin R.A., Moskaleva N.E., Volkova A.A., Orlova A.M., Markin P.A., Nevmyatova S.R., Appolonova S.A. Determination of zaleplon and klobazam by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with high resolution using Orbitrap technology. *Sudebno-medicinskaya ekspertiza*. 2022; 65(2): 24–8. <https://doi.org/10.17116/sudmed20226502124> (in Russian)
7. Markin P.A., Moskaleva N.E., Appolonova S.A., Volkova A.A., Orlova A.M., Kalekin R.A., Nevmyatova S.R. Development of a thin-layer chromatography method for simultaneous determination of klobazam and zaleplon in a mixture. In the collection: *Topical issues of forensic medicine and law. Collection of scientific and practical articles*. Kazan: 2021; 158–61. (in Russian)
8. Cassar S., Adatto I., Freeman J.L., Gamse J.T., Iturria I., Lawrence C., Muriana A., Peterson R.T., van Cruchten S., Zon L.I. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>
9. Robinson N.B., Krieger K., Khan F., Huffman W., Chang M., Naik A., Yongle R., Hameed I., Krieger K., Girardi L.N., Gaudino M. The current state of animal models in research: a review. *International Journal of Surgery*. 72:9–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2019.10.015>
10. Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. In *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014; 35(2): 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
11. Markin P.A., Brito A., Moskaleva N.E., Tagliaro F., la Frano M.R., Savitskii M.V., Appolonova S.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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2021; 243: 109000. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109000>
12. Markin Pavel A., Brito A., Moskaleva N.E., Tagliaro F., Tarasov V.V., la Frano M.R., Savitskii M.V., Appolonova S.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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2021; 38: 100816. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2021.100816>
13. Haleem D.J., Batool F. Regionally specific effects of diazepam on brain serotonin metabolism in rats: Sustained effects following repeated administration. *Life Sciences*. 1996; 59(15): PL239–46. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00452-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00452-3)
14. Mets M.A.J., de Vries J.M., de Senerpont Domis L.M., Volkerts E.R., Olivier B., Verster J.C. Next-day effects of ramelteon (8 mg), zopiclone (7.5 mg), and placebo on highway driving performance, memory functioning, psychomotor performance, and mood in healthy adult subjects. *Sleep*. 2011; 34(10): 1327–34. <https://doi.org/10.5665/SLEEP.1272>
15. Boyda H.N., Ho A.A., Tse L., Procyshyn R.M., Yuen J.W.Y., Kim D.D., Honer W.G., Barr A.M. Differential Effects of Acute Treatment With Antipsychotic Drugs on Peripheral Catecholamines. *Frontiers in Psychiatry*. 2020; 11: 617428. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.617428>
16. Roy-Byrne P., Fleishaker J., Arnett C., Dubach M., Stewart J., Radant A., Veith R., Graham M. Effects of acute and chronic Alprazolam treatment on cerebral blood flow, memory, sedation, and plasma catecholamines. *Neuropsychopharmacology*. 1993; 8(2): 161–9. <https://doi.org/10.1038/npp.1993.18>
17. Schwarcz R., Stone T.W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 2017; 112: 237–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>
18. Eissa A.A.H.M., Soliman G.A.E.H., Khataibeh M.H. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of structurally simple anthranilic acid congeners devoid of ulcerogenic side effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2012; 60(10): 1290–300. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00516>
19. Richter G., Liao V.W.Y., Ahring P.K., Chebib M. The Z-Drugs Zolpidem, Zaleplon, and Eszopiclone Have Varying Actions on Human GABAA Receptors Containing $\gamma 1$, $\gamma 2$, and $\gamma 3$ Subunits. *Frontiers in Neuroscience*. 2020; 14: 599812. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.599812>

ОБ АВТОРАХ:

Волкова Алла Андреевна (Volkova Alla Andreevna) – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, 125284, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

Калёкин Роман Анатольевич (Kalekin Roman Anatolievich) – доктор фармацевтических наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, 125284, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

Орлова Алевтина Михайловна (Orlova Alevtina Mikhailovna) – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, 125284, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

Павлова Альбина Захаровна (Pavlova Albina Zakharovna) – доктор биологических наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, 125284, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

Асташкина Ольга Генриховна (Astashkina Olga Genrikhovna) – доктор медицинских наук, научный сотрудник ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, 125284, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

Павлов Андрей Леонидович (Pavlov Andrey Leonidovich) – врач, ГБУ г. Москвы «Центр реабилитации инвалидов «Царицыно»» Департамента труда и социальной защиты населения города Москвы, 117534, Москва, Россия. E-mail: himija@rc-sme.ru

