

УДК 57.044

## НОВЫЙ МЕТОД ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦНС ВЗРОСЛЫМ ZEBRAFISH

Чахлова С.С. (СПбГУ)

Научный руководитель – младший научный сотрудник Галстян Д.С. (СПбГУ)

**Введение.** Зебраданио (*Danio rerio* - Zebrafish) в настоящее время является одним из наиболее важных видов лабораторных животных в биомедицинских исследованиях. Существует ряд способов введения лекарственных препаратов зебраданио, включая водную иммерсию, внутрибрюшинные инъекции, интрацеребральное введение и доставку через пищу. Каждый из этих методов обладает своими преимуществами, однако наряду с ними имеет и определенные ограничения. Интраназальное введение широко используется у различных лабораторных животных, позволяя лекарствам проникать непосредственно в мозг, минуя ГЭБ, и заметно снижать вводимые дозы. В данном исследовании изучалась возможность интраназальной доставки лекарств взрослым рыбкам данио-рерио с использованием никотина, в качестве доказательства концепции и сравнения интраназальной доставки с традиционным введением с помощью погружения в воду.

**Основная часть.** Никотин является мощным нейроактивным алкалоидом N-холинергического действия, обладающим стимулирующим и анксиолитическим действием, проявляющим активность в отношении людей, грызунов и зебраданио. В эксперименте сравнивали интраназальное введение 5 и 10 мг/мл никотина тартрата с его введением путем 20-минутного погружения в воду при стандартной поведенчески активной концентрации 10 мг/л в 250-миллилитровых пробирках. Контрольная рыба подвергалась такому же обращению в воде, не содержащей лекарств, с последующим тестированием в новом аквариуме. Введение препарата осуществлялось за 5 минут до поведенческого тестирования, для этого рыб по отдельности вылавливали сачком из их аквариумов, а затем перекладывали во влажную губку, смоченную водой, и быстро закрепляли в ней. В губке предварительно был сделан надрез, чтобы поместить внутрь все тело рыбы (кроме головы). После иммобилизации в губке по 1 мкл раствора никотина тартрата в дозе 5 или 10 мг/мл или воды, не содержащей лекарств, быстро закапывали в каждую ноздрю с помощью микропипетки регулируемого объема. Чтобы сравнить методы интраназального введения препарата и погружения в воду, мы также подвергли рыбок данио-рерио воздействию этого препарата в дозе 30 мг/л путем погружения в воду, а также подтвердили доставку препарата в мозг с помощью масс-спектрометрических анализов рыб, получавших никотин тартрата, и рыб, обработанных водой (контрольных). Чтобы подтвердить, что препараты, вводимые интраназально, достигают головного мозга и оказывают свое центральное действие, был проведен масс-спектрометрический анализ образцов цельного мозга, взятых у рыбок данио-рерио, получавших лечение, и у контрольной группы. После интраназального введения препаратов или погружения в воду рыб подвергали эвтаназии в ледяной воде с последующим обезглавливанием, а их мозг извлекали на льду. Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась с использованием 0,1 М хлорной кислоты из расчета 10 мкл на 1 мг образца. Затем образцы гомогенизировали путем обработки ультразвуком в течение 10 с при 50% мощности, центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин при 4°C, а надосадочные жидкости фильтровали с помощью центробежного фильтра. Чтобы оценить потенциальную потерю вещества во время подготовки образцов, мы также протестировали "стандарты", содержащие чистые образцы мозга рыбок данио, смешанные со 100 нг/мл никотина тартрата в 0,1 М растворе хлорной кислоты, которые прошли те же процедуры подготовки образцов. Подвижными фазами были 5 мм формиата аммония в воде (раствор А) и ацетонитрил (раствор В). Градиент элюирования проводили в течение 7 мин (0,00–1 мин, 5% В; 1,00–1,20 мин, 5–60% В; 1,20–3,20 мин, 60–80% В; 3,20–4,50 мин, 80% В; 4,50–4,70 мин, 80–5% В; 4,70–7,00 мин, 5% Б). Все протестированные образцы были депротенинизированы путем добавления трехкратного объема холодного ацетонитрила и

центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость высушивали в потоке азота и восстанавливали в воде. Объем инъекции составлял 5 мкл. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации с положительным электрораспылением. Исходные растворы битартрата никотина готовили в виде водного раствора из расчета 1 мг/мл. Рабочие растворы для калибровки готовили из исходного раствора в воде с концентрацией 10-500 нг/мл для соли, соответствующей содержанию никотина 4-175 нг/мл. Режим мониторинга множественных реакций также использовался для анализа никотина с использованием ионно-массовых переходов  $m/z$  163,12→130,06, энергия столкновения - 30 эВ; газ столкновения – N<sub>2</sub>. Поведенческие данные были проанализированы с использованием теста Краскела — Уоллиса, за которым последовал специальный тест Данна для парных сравнений в группах. Данные масс-спектрометрии были проанализированы с использованием критерия Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) с поправкой Йейтса. Для всех тестов значение P было установлено как <0,05.

Эффект от лечения тартратом никотина не отразился на общем пройденном расстоянии (H (3,56) = 7,19,  $p > 0,05$ , NS), наблюдался значительный эффект на продолжительность времени, проведенного в верхней части аквариума (H (3,56) = 20,47,  $p < 0,01$ ) после погружения в воду в дозе 10 мг/л и интраназального введения в дозе 10 мг/мл в обеих группах, получавших лекарственные препараты, наблюдалась более высокая концентрация в верхней части аквариума, чем в контрольной группе ( $p < 0,01$  и  $0,05$  соответственно). Не было выявлено влияния препарата на частоту попадания в верхнюю часть аквариума (H (3, 56) = 7,67,  $p > 0,05$ , NS). Данные масс-спектрометрии подтверждают отсутствие тартрата никотина во всех контрольных образцах мозга рыбок данио-рерио и наличие его видимых пиков во всех образцах мозга, обработанных лекарственными препаратами.

**Выводы.** Анализируя поведенческие эффекты препарата, вводимого интраназально взрослым рыбам данио-рерио, были обнаружены устойчивые анксиолитические поведенческие фенотипы (с характерным плаванием у поверхности), аналогичные эффектам после погружения в воду в более высоких концентрациях. Это подтверждает эффективность интраназального введения определенных препаратов для лечения ЦНС взрослым рыбам данио-рерио.

#### **Список использованных источников:**

1. Kalueff, A.V., A.M. Stewart, and R. Gerlai, *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(2): p. 63-75.
2. de Abreu, M.S., et al., *Unconventional anxiety pharmacology in zebrafish: Drugs beyond traditional anxiogenic and anxiolytic spectra*. Pharmacol Biochem Behav, 2021. **207**: p. 173205.
3. Sackerman, J., et al., *Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of Danio rerio Line*. Int J Comp Psychol, 2010. **23**(1): p. 43-61.
4. Turner, P.V., et al., *Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011. **50**(5): p. 600-13.
5. Migliore, M.M., et al., *Brain delivery of proteins by the intranasal route of administration: a comparison of cationic liposomes versus aqueous solution formulations*. J Pharm Sci, 2010. **99**(4): p. 1745-61.
6. Stewart, A.M., et al., *Building Zebrafish Neurobehavioral Phenomics: Effects of Common Environmental Factors on Anxiety and Locomotor Activity*. Zebrafish, 2015. **12**(5): p. 339-48.