

УСТРАНЕНИЕ СТРЕССОГЕННОГО ПОВЫШЕНИЯ ГРЕЛИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ *DANIO RERIO* БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫМИ ТРАНКВИЛИЗАТОРАМИ

УДК 616-092.9

DOI: <https://doi.org/10.7816/RCF184327-332>

© А.А. Блаженко¹, П.П. Хохлов¹, И.Ю. Тиссен¹, А.С. Девяшин¹, А.А. Лебедев¹, С.Н. Прошин², Е.Р. Бычков¹, П.Д. Шабанов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Блаженко А.А., Хохлов П.П., Тиссен И.Ю., Девяшин А.С., Лебедев А.А., Прошин С.Н., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Устранение стрессогенного повышения грелина в головном мозге *Danio rerio* бензодиазепиновыми транквилизаторами. – 2020. – Т. 18. – № 4. – С. 327–332. <https://doi.org/10.7816/RCF184327-332>

Поступила: 05.10.2020

Одобрена: 16.11.2020

Принята: 03.12.2020

В работе исследовано влияние стресса на выработку пептида грелина в головном мозге *Danio rerio*. Модель стресса построена с использованием хищника *Hypsophrys nicaraguensis* из семейства цихлид. Оценен эффект анксиолитика бензодиазепинового ряда феназепама на выработку грелина при воздействии хищника на *Danio rerio*. Установлено, что в контрольной группе частота выявляемости грелина в мозжечке была у $57,1 \pm 2,8$ %. При этом в ответ на стресс концентрация грелина, как показано методом иммуноферментного анализа, повышалась во всех исследованных отделах мозга (частота выявляемости 100 %): конечном мозге (лат. *telencephalon*), среднем мозге (анатомическая область, лат. *corpora bigemia*)

и мозжечке (лат. *cerebellum*). В эксперименте только с феназепамом, с феназепамом в присутствии хищника грелин не выявлялся, то есть препарат полностью подавлял выработку пептида. В связи с полученными результатами обсуждаются возможные механизмы повышения уровня грелина в ответ на стресс, и снижение грелина в головном мозге *Danio rerio* после воздействия феназепама. Сделан вывод, что пептид грелин может быть биомаркером стрессового воздействия, а феназепам посредством определенных молекулярных механизмов регулирует выработку грелина.

◆ **Ключевые слова:** *Danio rerio*; мозговой грелин; феназепам; транквилизаторы.

BENZODIAZEPINE TRANQUILIZERS ABOLISH THE STRESS-INDUCED INCREASE OF THE BRAIN GHRELIN LEVEL IN *DANIO RERIO*

© A.A. Blazhenko¹, P.P. Khokhlov¹, I.Yu. Tissen¹, A.S. Devyashin¹, A.A. Lebedev¹, S.N. Proshin², E.R. Bychkov¹, P.D. Shabanov^{1,2}

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Blazhenko AA, Khokhlov PP, Tissen IYu, Devyashin AS, Lebedev AA, Proshin SN, Bychkov ER, Shabanov PD. Benzodiazepine tranquilizers abolish the stress-induced increase of the brain ghrelin level in *Danio rerio*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2020;18(4):327-332. <https://doi.org/10.17816/RCF184327-332>

Received: 05.10.2020

Revised: 16.11.2020

Accepted: 03.12.2020

Danio rerio has firmly established itself as a successful model for research in many areas of biology and medicine, first of all for developing new medicines.

The aim of our study was to evaluate ghrelin level in zebrafish brain after stress and after phenazepam usage on stressed fish.

Methods. In our study 96 *Danio rerio*, predator *Cichlasoma nicaraguensis* have been used. The fish have been kept at a normal room temperature (22–23 °C) with standard feeding time (twice per day). The level of neuropeptides has been tested by ELISA test. During experiment a fish has been firstly placed in a beaker with a dissolved pharma-

cological substance, then has been transferred into a tank with predator. In the end of experiment, it has been put into a novel tank for 6 min. The decapitation has been made. The brain has been divided into three anatomical parts: *telencephalon* just behind the olfactory bulb, the middle part – *corpora bigemia* and *cerebellum*, which is situated behind the *corpora bigemia*. After that the material for ELISA test was made using GhrelinFISH, MyBioSource ELISA kit. **Results.** In the control group ghrelin has been determined only in the *cerebellum* in 57.14% of all fish. In the experiment with predator ghrelin has been found in all tested brain parts of fish, but in the *telencephalon* there

was the highest level. In the experiment with phenazepam usage only and phenazepam administration after predator stress, the ghrelin value has not been determined at all.

Conclusion. Thus we have found out that the ghrelin value increases after predator stress and the drug phenazepam

eliminated it completely after its administration. We may suppose that the administration of anxiolytics such as phenazepam can reduce the anxiety in *Danio rerio*.

◆ **Keywords:** *Danio rerio*; brain ghrelin; phenazepam; tranquilizers.

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразные факторы могут привести к нарушению психической деятельности человека в виде тревожного и/или депрессивного расстройства. При этом прогноз неутешителен: частота этой формы нарушений высшей психической деятельности в дальнейшем будет только возрастать [4, 12]. У некоторых людей коморбидность депрессии с тревожным расстройством может возникать в отсутствие какого-либо заметного стресса в повседневной жизни, тогда как у других лиц, кто подвержен хроническим стрессам, может никогда не развиться клиническая форма депрессивного расстройства [14]. Пытаясь понять механизмы, лежащие в основе тревожно-депрессивных расстройств у человека, были предложены различные модели на животных, прежде всего грызунах [15]. Были использованы различные тесты, которые измеряют стремление животных избежать неприятной ситуации [15], потерю способности получать удовольствие от деятельности, которая обычно вызывает удовольствие [18]. Также были разработаны генетически модифицированные модели животных, на которых показано, что депрессивно-тревожное поведение не появлялось, когда физиологический ответ на стресс снижался [18]. Очевидно, что имеется необходимость сравнения различных моделей стресса, чтобы получить более точную и исчерпывающую информацию о влиянии различных типов стресса на психику, и какие временные периоды этого воздействия являются критическими для развития тревожно-депрессивного состояния [17]. При этом приходит понимание, что, скорее всего, более подходящей моделью для исследования тревожных расстройств являются животные с менее комплексным когнитивным поведением, чем млекопитающие, например Zebrafish (*Danio rerio*) [7]. Кроме того, было убедительно доказано, что у *Danio rerio* эволюционно консервативная нервная система, и этот объект идеально подходит для генетического и молекулярного анализа механизмов, лежащих в основе эмоционального и мотивационного поведения, включая ответ не только на психоактивные субстанции, но и на стресс [8, 11]. Нейропептид грелин может быть потенциальным биомаркером стрессогенного воздействия, поскольку его повышение отмечено при состояниях, связанных с недостатком пищи, анорексии и кахексии [8, 9].

Целью работы было определение в головном мозге *Danio rerio* пептида грелина как возможного биомаркера стресса. Мы использовали модель «тест с хищником» с последующим воздействием анксиолитика бензодиазепинового ряда феназепам.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор животных. В работе использованы рыбы *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei) в возрасте 6–8 мес. (молодые половозрелые животные) фирмы «Аква Питер» и выращенные в ФГБНУ «ИЭМ», все *Danio rerio* дикого типа (wildtype). Для тестирования использовали интактных животных ($n = 96$, обоих полов). Объем аквариумов по 40 л (всего 3 аквариума), по 20–30 животных в каждом. Животных содержали в стандартных условиях светового режима (8.00–20.00) при температуре воды 22 ± 2 °С, кормили дважды в день стандартным кормом «Tetramin tropical flakes».

Модель стресса с хищником. Исследуемое животное помещали в мерный стакан объемом 200 мл с растворенным фармакологическим веществом или водой (контроль) на 5 мин, а затем в аквариум с водой (10 × 10 × 10 см) на 5 мин и далее в просмотровый аквариум на 6 мин с хищником *Hypsophrys nicaraguensis*.

Фармакологические вещества. Для фармакологического воздействия применяли препарат из группы анксиолитиков бензодиазепинового ряда феназепам в дозировке 1 мг/л [1, 2].

Для определения уровня пептидов в головном мозге рыб использовали высокочувствительный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Предварительно животные были введены в глубокий наркоз, после чего была произведена декапитация. Головной мозг *Danio rerio* разделяли хирургически под бинокулярной лупой МБС-1 на 3 анатомические части: в качестве переднего мозга выделяли анатомический *telencephalon*, образец среднего мозга включал *corpora bigemia*, отдельно выделяли мозжечок (лат. *cerebellum*) [5]. Затем готовили материал для ИФА, используя Ghrelin FISH, MyBioSource ELISA kit.

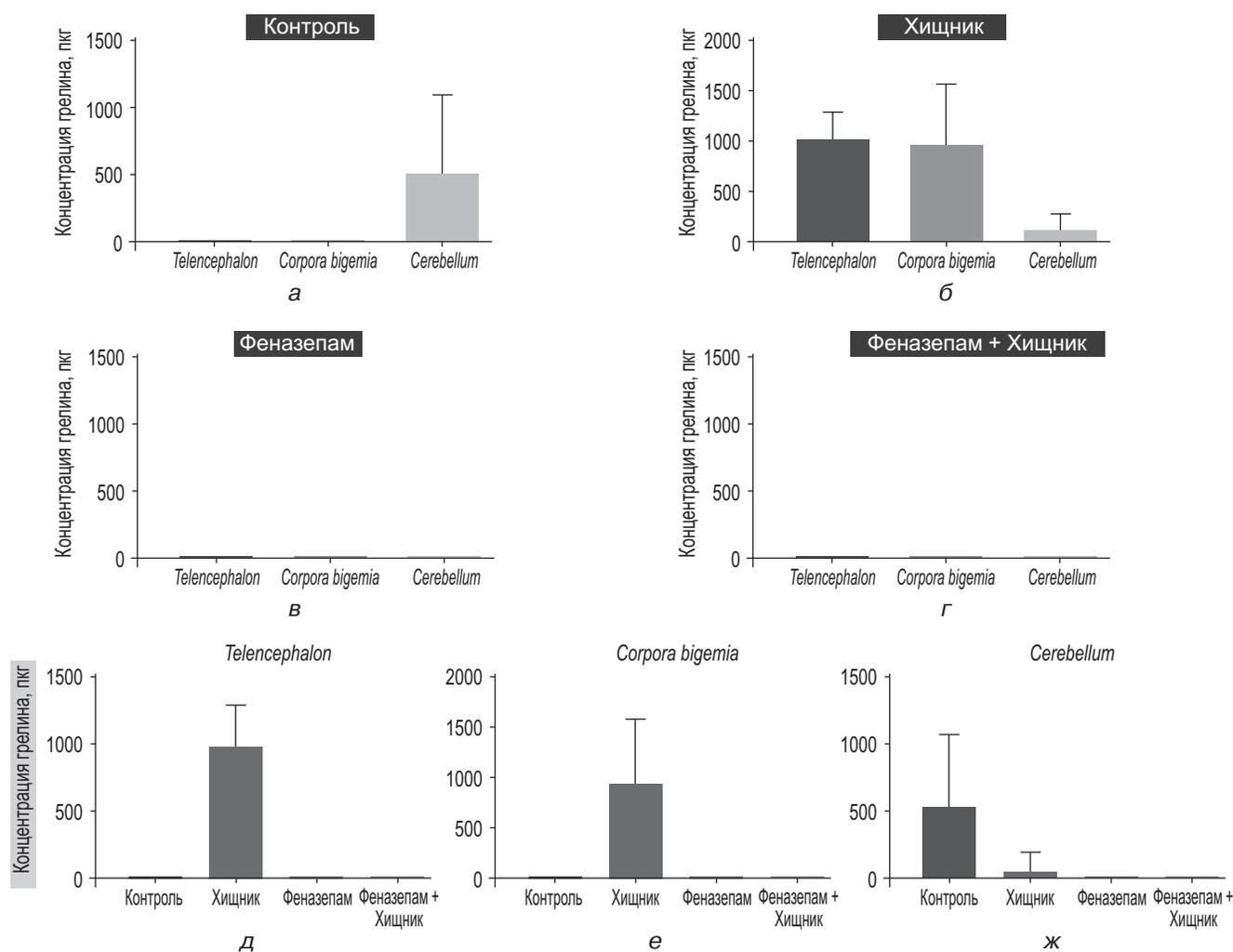
Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакетов Statistica v. 6 и Origin v. 7.5. Нормальность распределений оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова, значимость различий между группами — при помощи *t*-критерия Стьюдента, либо *U*-критерия Мана–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В эксперименте была использована модель стресса с хищником, которая чаще используется в опытах на млекопитающих. Такой эксперимент представляет собой модель острого стресса для животного. Мы использовали введение *Danio rerio* в глубокий наркоз сразу же после эксперимента и получение материала (ткани мозга) в первые минуты, что позволило более объективно оценивать полученные результаты.

У интактных особей *Danio rerio* грелин определяется только в мозжечке, наиболее древней и развитой структуре мозга рыб (см. рисунок, а). При экспозиции *Danio rerio* с хищником уровень грелина возрастает в переднем (*telencephalon*) и среднем (*corpora bigemia*) мозге и уменьшается в мозжечке (б). Феназепам 1 мг/л полностью устраняет повышенный уровень грелина во всех исследованных областях, как у интактных особей (в), так и животных, подвергнутых экспозиции с хищником (г).

Если рассматривать эффекты влияния экспозиции с хищником на уровень грелина в исследованных структурах, то обращает на себя внимание максимальная реакция переднего мозга, когда уровень грелина повышается до нанogramмовых концентраций (см. рисунок, д), и в меньшей степени, но значительно возрастает уровень грелина в среднем мозге (е). В мозжечке уровень грелина, напротив, снижается относительно базального, повышенного до 500 пг/мг общего белка у контрольных животных (ж). Феназепам нивелирует все повышенные экспозицией с хищником уровни грелина в исследованных областях мозга. То есть в исследовании было выявлено, что на воздействие хищника реагирует эволюционно более молодые структуры, и в первую очередь, передний мозг. Мозжечок, как самая эволюционно древняя и наиболее развитая у рыб структура, более инертна к воздействию стрессогенного фактора. И, наконец, транквилизатор феназепам устраняет все изменения, возникающие под воздействием хищника.



Влияние острого стресса и феназепама на содержание грелина (пг/мг общего белка) в разных отделах мозга *Danio rerio*: а — распределение уровней грелина в разных отделах мозга *Danio rerio*; б — влияние экспозиции с хищником на уровень грелина; в — влияние феназепама на уровень грелина у контрольных особей; г — влияние феназепама на уровень грелина у особей после экспозиции с хищником; д — содержание грелина в переднем мозге; е — содержание грелина в среднем мозге; ж — содержание грелина в мозжечке

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты иммуноферментного анализа показали, что в контрольной группе рыб грелин определялся только в мозжечке, наиболее филогенетически древней структуре мозга, при этом частота выявления составила лишь $57,1 \pm 2,8\%$. Стрессогенное воздействие в виде экспозиции с хищником повышает уровень грелина в эволюционно более молодых структурах — переднем и среднем мозге, но снижает его в мозжечке.

Из представленных данных возникает как минимум несколько вопросов. Во-первых, насколько адекватна модель острого стресса на рыбах *Danio rerio* для изучения молекулярных механизмов стресса? Во-вторых, можно ли рассматривать повышение уровня грелина на стрессогенное воздействие как некий маркер стресса? И, в-третьих, каковы механизмы воздействия феназепама на грелиновую пептидную систему? Ответ на первые два вопроса, без сомнения, положителен. *Danio rerio* можно использовать как объект для изучения стресса, поскольку рыба полностью повторяет закономерности реагирования на стрессогенные факторы, как и млекопитающие, в частности грызуны, наиболее часто привлекаемые в изучение стрессогенных реакций [1]. Более того, у рыб основным гормоном стресса, как и у человека, является кортизол, а у крыс — кортикостерон, у человека присутствующий лишь в следовых количествах [2]. Это сближает оба объекта исследования. Система грелина, состоящая, по меньшей мере, из трех структурных компонентов (ацилированный грелин, дезацилированный грелин и обестатин) и соответствующих рецепторов **GHSR-1A** и **GHSR-1B** в разных структурах организма, включая центральную нервную систему, является довольно чувствительной в плане реактивности на стрессогенные воздействия [3, 11]. Так, ранее на крысах нами было показано изменение уровня грелина у стрессированных животных, которое уменьшалось под влиянием антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6 [3]. В то же время вопрос о синтезе грелина в головном мозге *de novo* под влиянием стрессогенных факторов в этих опытах не решается, хотя скорость ответа в виде изменения концентрации грелина в отдельных структурах головного мозга говорит в пользу этого допущения.

Наконец, касательно механизмов возможного влияния феназепама на грелиновую пептидную систему. Бензодиазепины, включая феназепам, который является одним из самых сильных анксиолитиков, проявляют свойства непрямых агонистов тормозной системы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), взаимодействуя с двумя из пяти чувствительных к ним субъединиц ГАМК_A-рецепторов. ГАМК участвует в регуляции пищевого поведения, стрессовых реакций, опосредует поведение зависимости у млекопитающих [16], а с молекулярной точки

зрения взаимодействует со многими пептидными системами мозга, например с системой кортиколиберина, орексинов, грелина [3]. Как правило, ГАМК и грелиновая система находятся в антагонистических функциональных отношениях, отсюда понятны полученные результаты по уменьшению уровня грелина под влиянием феназепама, проявляющего свойства непрямого агониста ГАМК. В основе этого феномена, по-видимому, лежит подавление феназепамом экспрессии гена грелина в ответ на стресс, что проявляется снижением уровня пептида в изученных областях мозга рыб *Danio rerio*.

ВЫВОДЫ

1. Применение высокочувствительного иммуноферментного анализа позволяет идентифицировать пептид грелин в различных отделах головного мозга *Danio rerio*.
2. Состояние психоэмоционального воздействия (экспозиция рыб с хищником) значительно повышает содержание грелина главным образом в переднем и среднем мозге, но не в мозжечке.
3. Анксиолитик феназепам устраняет последствия стрессорного воздействия хищника на грелиновую систему у *Danio rerio*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев В.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Возможность использования поведенческих ответов *Danio rerio* в оценке дозозависимых эффектов феназепама // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 1. – С. 12–21. [Lebedev VA, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD. Probability of using the behavioral responses of *Danio rerio* in assessment of dose-dependent effects of phenazepam. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy*. 2018;(1):12-21 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-01-02>.
2. Шабанов П.Д., Лебедев В.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р. Влияние стресса новизны на поведенческие ответы *Danio rerio* и оценка дозозависимых эффектов анксиолитиков бензодиазепинового ряда на примере феназепама // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 57–63. [Shabanov PD, Lebedev VA, Lebedev AA, Bychkov ER. Effect of novelty stress on behavioral responses of *Danio rerio* and assessment of dose-dependent effects of anxiolytics of benzodiazepine structure with phenazepam as an example. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(3):57-63. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/RCF15357-63>.
3. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., и др. Нейрохимические механизмы и фармакология грелинов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 5–22.

- [Shabanov PD, Lebedev AA, Bychkov ER, et al. Neurochemical mechanisms and pharmacology of ghrelin. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2020;18(1):5-22. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/RCF1815-22>.
4. World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders. Global Health Estimates. WHO; 2017.
 5. Bovenkerk B, Kaldewaij F. The use of animal models in behavioural neuroscience research. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;19:17-46. https://doi.org/10.1007/7854_2014_329.
 6. de Abreu MS, Friend AJ, Demin KA, et al. Zebrafish models: do we have valid paradigms for depression? *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2018;94(Pt 2):16-22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.07.002>.
 7. Goldstein JL, Zhao TJ, Li RL, et al. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:121-127. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010447>.
 8. Gorwood P, Blanchet-Collet C, Chartrel N, et al. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci*. 2016;10:256. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00256>.
 9. Griffiths BB, Schoonheim PJ, Ziv L, et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. *Front Behav Neurosci*. 2012;6:68. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00068>.
 10. Guo S, Wagle M, Mathur P. Toward molecular genetic dissection of neural circuits for emotional and motivational behaviors. *Dev Neurobiol*. 2012;72(3):358-365. <https://doi.org/10.1002/dneu.20927>.
 11. Lebedev A, Khokhlov P, Tissen I, et al. Expression of gambling elements is connected with content of desacyl-ghrelin in the limbic structures and the brain receptors activity. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2019;29(Suppl 6):S109-S110. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.187>.
 12. Lux V, Kendler KS. Deconstructing major depression: a validation study of the DSM-IV symptomatic criteria. *Psychol Med*. 2010;40(10):1679-1690. <https://doi.org/10.1017/S0033291709992157>.
 13. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol*. 2011;39(5):759-775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>.
 14. Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med*. 2010;42(4):252-264. <https://doi.org/10.3109/07853891003769957>.
 15. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266(5604):730-732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>.
 16. Reynolds SM, Berridge KC. Fear and Feeding in the Nucleus Accumbens Shell: Rostrocaudal Segregation of GABA-Elicited Defensive Behavior Versus Eating Behavior. *J Neurosci*. 2001;21(9):3261-3270. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03261.2001>.
 17. Silverman JL, Yang M, Turner SM, et al. Low stress reactivity and neuroendocrine factors in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *Neuroscience*. 2010;171(4):1197-1208. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.059>.
 18. Willner P. Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1995;49:19-41.

♦ Информация об авторах

Александра Александровна Блаженко — аспирант отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: alexandrablazhenko@gmail.com.

Платон Платонович Хохлов — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: platonkh@list.ru.

Илья Юрьевич Тиссен — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: iljatis@mail.ru.

Александр Сергеевич Девяшин — аспирант отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: alexsanta93@mail.ru.

Андрей Андреевич Лебедев — д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией общей фармакологии отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Сергей Николаевич Прошин — д-р мед. наук, кафедра фармакологии, медицинский факультет. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

♦ Information about the authors

Aleksandra A. Blazhenko — Post-graduate Fellow, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: alexandrablazhenko@gmail.com.

Platon P. Khokhlov — PhD (Biochemistry), Senior Researcher, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: platonkh@list.ru.

Ilya Yu. Tissen — PhD, Senior Researcher, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: iljatis@mail.ru.

Aleksandr S. Devyashin — Post-graduate Fellow, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: alexsanta93@mail.ru.

Andrei A. Lebedev — Dr. Biol. Sci. (Pharmacology), Head of the Laboratory of General Pharmacology, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Sergey N. Proshin — Dr. Med. Sci., Department of Pharmacology, Medical Faculty. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

♦ Информация об авторах

Евгений Рудольфович Бычков — канд. мед. наук, заведующий лабораторией химии и фармакологии лекарственных средств отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург. E-mail: bychkov@mail.ru.

Петр Дмитриевич Шабанов — д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург; профессор, кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

♦ Information about the authors

Eugenii R. Bychkov — PhD (Pathophysiology), Head of the Laboratory of Chemistry and Pharmacology of Medicinal Compounds, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bychkov@mail.ru.

Petr D. Shabanov — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Professor, Dept. of Basic Problems of Medicine and Medical Technologies, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.