



УДК 612.8+616.4

EDN XMLOOG

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78>

Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс

И. Б. Сухов^{✉1}, О. В. Чистякова¹, Л. В. Баюнова¹, Н. Н. Шестакова¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Сведения об авторах

Иван Борисович Сухов, SPIN-код: 8571-0190, Scopus AuthorID: 54396217500, ResearcherID: Q-1347-2016, ORCID: 0000-0003-2015-9601, e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Оксана Викторовна Чистякова, SPIN-код: 7399-4496, Scopus AuthorID: 15755360800, ResearcherID: AAA-9028-2020, ORCID: 0000-0002-2866-1017, e-mail: chiosana@yandex.ru

Любовь Владимировна Баюнова, SPIN-код: 2833-2978, Scopus AuthorID: 17344849200, ResearcherID: AAN-1066-2020, ORCID: 0000-0001-5543-8657, e-mail: bayunoval@mail.ru

Наталья Николаевна Шестакова, SPIN-код: 4744-7604, Scopus AuthorID: 7003457596, ResearcherID: AAQ-4366-2021, ORCID: 0000-0002-4555-1223, e-mail: n_shestakova@list.ru

Для цитирования: Сухов, И. Б., Чистякова, О. В., Баюнова, Л. В., Шестакова, Н. Н. (2023) Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс. *Интегративная физиология*, т. 4, № 1, с. 69–78. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78> EDN XMLOOG

Получена 19 января 2023; прошла рецензирование 6 февраля 2023; принята 7 февраля 2023.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00 с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

Права: © И. Б. Сухов, О. В. Чистякова, Л. В. Баюнова, Н. Н. Шестакова (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](#).

Аннотация. Работа посвящена исследованию побочных эффектов применения селективного блокатора натрий-кальциевого обменника KB-R7943 как противоболевого препарата у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом 1-го типа. Повреждение нейронов при диабетической нейропатии приводит к гиперактивации ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата. Активация NMDA-рецепторов вызывает развитие центральной сенситизации, которая в свою очередь приводит к появлению нейропатической боли. Прямое воздействие на указанные рецепторы связано с проявлением множества побочных эффектов, поэтому для безопасного лечения предпочтительно опосредованное воздействие, например, через блокирование натрий-кальциевого обменника (NCX). В этой связи применение селективного блокатора NCX KB-R7943 может быть перспективным при противоболевой терапии. Анализ ЭКГ не выявил негативного влияния KB-R7943 на состояние сердечно-сосудистой системы у контрольных и диабетических крыс. Тестирование в открытом поле показало, что после введения KB-R7943 поведение крыс (двигательная активность и признаки тревожности) не меняется. Проведен анализ уровня экспрессии гена потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.7 (*SCN9A*), $\alpha 2\delta$ -1 субъединицы потенциал-зависимых кальциевых каналов T-типа (*CACNA2D1*), *Vax* и *Vcl-2*, задействованных в патогенезе диабетической нейропатии, в тканях гиппокампа и гипоталамуса. Показано, что при введении KB-R7943 в гиппокампе у диабетических крыс экспрессия *CACNA2D1* возрастала, а *SCN9A* — снижалась; у животных контрольной группы под влиянием препарата повышался уровень мРНК Nav1.7. Экспрессия *Vax* и *Vcl-2* усиливалась в гиппокампе у контрольных животных после введения KB-R7943. У диабетических крыс терапия KB-R7943 приводила к снижению уровня мРНК *Vcl-2* в гипоталамусе и не влияла на уровень экспрессии *Vax*.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабетическая нейропатия, ЭКГ, KB-R7943, открытое поле, крыса

Evaluation of side effects of Na-Ca exchange inhibitor KB-R7943 used as an analgesic drug in diabetic neuropathy in rats

I. B. Sukhov^{✉1}, O. V. Chistyakova¹, L. V. Bayunova¹, N. N. Shestakova¹

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thorez Ave., Saint Petersburg 194223, Russia

Authors

Ivan B. Sukhov, SPIN: 8571-0190, Scopus AuthorID: 54396217500, ResearcherID: Q-1347-2016, ORCID: 0000-0003-2015-9601, e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Oxana V. Chistyakova, SPIN: 7399-4496, Scopus AuthorID: 15755360800, ResearcherID: AAA-9028-2020, ORCID: 0000-0002-2866-1017, e-mail: chiosana@yandex.ru

Liubov V. Bayunova, SPIN: 2833-2978, Scopus AuthorID: 17344849200, ResearcherID: AAN-1066-2020, ORCID: 0000-0001-5543-8657, e-mail: bayunoval@mail.ru

Natalia N. Shestakova, SPIN: 4744-7604, Scopus AuthorID: 7003457596, ResearcherID: AAQ-4366-2021, ORCID: 0000-0002-4555-1223, e-mail: n_shestakova@list.ru

For citation: Sukhov, I. B., Chistyakova, O. V., Bayunova, L. V., Shestakova, N. N. (2023) Evaluation of side effects of Na-Ca exchange inhibitor KB-R7943 used as an analgesic drug in diabetic neuropathy in rats. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 1, pp. 69–70. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-70> EDN XMLOOG

Received 19 January 2023; reviewed 6 February 2023; accepted 7 February 2023.

Funding: The work was supported by the IEPH Research Program 075-00967-23-00, IEPH Research Resource Center.

Copyright: © I. B. Sukhov, O. V. Chistyakova, L. V. Bayunova, N. N. Shestakova (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. This article reports the results of the study of side effects of selective sodium-calcium exchange blocker KB-R7943 used as an analgesic drug in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. ECG analysis showed no negative effect of KB-R7943 on the cardiovascular system of control rats and rats with type 1 diabetes mellitus. In open field testing, the behavior (motor activity and signs of anxiety) of rats did not change after the administration of KB-R7943. The tissues of the hippocampus and hypothalamus were analyzed for the level of the gene expression of the voltage-gated sodium channel Nav1.7 (*SCN9A*), the $\alpha 2\delta$ -1 subunit of voltage-gated T-type calcium channels (*CACNA2D1*), *Bax* and *Bcl-2* involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. It was shown that in the hippocampus of rats with DM1, the administration of KB-R7943 led to an increase in *CACNA2D1* expression and a decrease in *SCN9A* expression, while in the control group the level of Nav1.7 mRNA increased under the influence of the drug. The expression of both *Bax* and *Bcl-2* in the hippocampus of control animals after the administration of KB-R7943 increased. In the hypothalamus of the diabetic group, KB-R7943 therapy reduced the level of *Bcl-2* mRNA, leaving the level of *Bax* expression unchanged.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic neuropathy, ECG, KB-R7943, open field, rat

Введение

Одним из распространенных и наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета (СД) является диабетическая нейропатия (ДН), вызванная поражением соматических автономных или периферических нервных волокон. На основании данных эпидемиологических исследований распространенность диабетической нейропатии варьирует от 14% до 65% среди больных СД (Bouhassira 2019, Boulton et al. 2005). ДН нередко является причиной нарушения трудоспособности, ранней инвалидизации и смерти пациентов. Повреждение нейронов при ДН приводит к гиперактивации ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA-

рецепторы). Активация NMDA-рецепторов вызывает развитие центральной сенситизации, которая, в свою очередь, приводит к появлению нейропатической боли. Прямое воздействие на указанные рецепторы связано с проявлением множества побочных эффектов, поэтому для безопасного лечения предпочтительно опосредованное воздействие.

Одним из непрямых методов воздействия является кальций-зависимая десенситизация NMDA-рецепторов (Stepanenko et al. 2019). Ключевую роль в этом процессе играет натрий-кальциевый обменник (NCX). На мембране нейронов белка NMDA-рецептора и NCX расположены на одном липидном плотике (рафте) и функционально взаимосвязаны таким образом,

что ингибирование обменника усиливает кальций-зависимую десенситизацию NMDA-рецепторов (Sibarov, Antonov 2018; Sibarov et al. 2018). Одним из селективных блокаторов натрий-кальциевого обменника является KB-R7943. Было высказано предположение, что KB-R7943 может обладать анальгетической активностью для облегчения нейропатической боли, поскольку NCX косвенно влияет на ионную проводимость ионотропных NMDA-рецепторов, участвующих в патогенезе нейропатического болевого синдрома (Shestakova et al. 2019; Sibarov et al. 2015). Накоплены данные о том, что ингибиторы NCX могут использоваться в клинике как регуляторы кальция в клетке, в том числе для снятия синдромов нейропатической боли и для нейропротекции (Huang et al. 2019; Jaggi, Singh 2011; Sibarov, Antonov 2018; Sibarov et al. 2018). Для разработки противоболевой терапии на основе KB-R7943 необходимо изучить возможные побочные эффекты данного препарата на животной модели.

Диабетические больные представляют группу риска по формированию нарушений сердечного ритма и проводимости (Inanir et al. 2020, Kittnar et al. 2015), в связи с чем важно минимизировать негативный эффект применяемой терапии на сердечную мышцу. Высокая вероятность побочного действия KB-R7943 на сердечно-сосудистую систему рассматривается в связи с высокой экспрессией NCX в миокарде. Другим возможным эффектом KB-R7943 является влияние на экспрессию генов белков, функционально важных в развитии ДН, включая белки ионных каналов, задействованных в патогенезе ДН, апоптоза, в отделах головного мозга, отвечающих за формирование болевого ощущения. Кроме того, оценка возможных побочных эффектов KB-R7943 должна включать тестирование «Открытое поле», являющееся обязательным при исследовании фармакологических препаратов.

Целью данной работы является изучение эффективности применения селективного блокатора натрий-кальциевого обменника KB-R7943 как противоболевого препарата у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа (СД1) и выявление его возможных побочных эффектов на сердечно-сосудистую систему.

Материалы и методы

Животные

Исследования проводили на самцах крыс породы *Wistar* в возрасте 4–4,5 месяцев.

Животных содержали в виварии по 5 особей в клетке при 12/12 ч режиме дня, со свободным доступом к пище (сухому корму ЛБК-120, ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Ленинградская область) и воде.

В возрасте 4 – 4,5 месяцев у части животных производили индукцию СД1. Через четыре недели после индукции выполняли введение KB-R7943 и плацебо ежедневно в течение недели в дозе 10 мг на кг веса перорально с помощью ветеринарных питательных зондов длиной 80 мм, диаметром 1,6 мм (Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co., Ltd, China).

Во время исследования животных разделяли на четыре группы: С — контрольная группа, получавшая раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (2,5%) в качестве плацебо (n = 9); С+KBR — контрольная группа, получавшая KB-R7943 в растворе КМЦ (2,5%) (n = 10); D — диабетическая группа, получавшая раствор КМЦ (2,5%) в качестве плацебо (n = 10); D+KBR — диабетическая группа, получавшая KB-R7943 в растворе КМЦ (2,5%) (n = 10).

После 7-дневной терапии препаратами крыс выводили из эксперимента путем декапитации после предварительной анестезии ингаляционным изофлураном (в течение двух мин, две у. е. объема подачи на аппарате Zoom med, Medical supplies & services Int. Ltd, UK). Далее проводили отбор образцов тканей мозга.

Препараты

KB-R7943 — CAS 182004-65-5, метилсульфонат 2-[2-[4-(4-нитробензилокси)фенил]этил]изотиомочевина (Taizhou Crene Biotechnology Co., Ltd, China).

Модель сахарного диабета 1-го типа

Сахарный диабет 1-го типа индуцировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (СТЗ), растворенного в 0,1 М цитратном буфере (рН 4,5), в дозе 32 мг на кг веса. Животным контрольных групп вводили цитратный буфер в эквивалентном объеме. В процессе развития СД1 осуществляли контроль массы тела животных, уровня глюкозы в крови животных на 3-й и 14-й дни после введения СТЗ и при выведении из эксперимента. Уровень глюкозы определяли с помощью глюкометра и тест-полосок Select plus (One Touch, Johnson & Johnson, Дания). В конце исследований определяли уровень инсулина в крови с помощью набора для иммуноферментного анализа Rat Insulin ELISA («Mercodia AB», Швеция).

Тестирование поведения

Установка для проведения теста «Открытое поле» представляла собой круглую арену из поливинилхлорида с черными стенками и дном (ООО «НПК Открытая Наука», г. Красногорск, МО, Россия). Высота стенок 40 см, диаметр арены 100 см. Освещение в центре арены составляло 300 люкс. Арену устанавливали на тележке на высоте один метр от пола. В начале тестирования животное помещали в центр арены. Перед каждым тестированием арену обрабатывали 3%-м раствором перекиси водорода с помощью вискозной салфетки. Нахождение животного в арене фиксировали видеокамерой в течение пяти мин, и результаты тестирования обрабатывали в программе EthoVision XT (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Арену при видеотрекинге делили на центральную и периферическую зоны. Центральная зона была представлена двумя вариантами — большим и узким.

В соответствии с литературными данными (Sestakova et al. 2013) параметры тестирования были разделены на два основных типа активности экспериментальных животных: локомоторная активность и активность, отражающая тревожность животного.

Параметры локомоторной активности:

- 1) общее расстояние, пройденное за период тестирования;
- 2) скорость передвижения;
- 3) средняя активность движения в %;
- 4) частота вращения головой.

Параметры тревожности:

- 1) частота пересечения центральной зоны;
- 2) общая продолжительность пребывания в центральной зоне;
- 3) время первого выхода в центральную зону.

Регистрация электрокардиограммы

В долгосрочных экспериментах снятие ЭКГ выполняли до индукции СД1 и после введения KB-R7943 соответствующим группам. Запись ЭКГ проводили с помощью четырех электродов по методу стандартных отведений по Эйнтховену с помощью оборудования и программного обеспечения Поли-Спектр Ветеринария (ООО «Нейрософт», Россия). Результаты усредняли с помощью специально разработанного пакета программ на MatLab (Ю. А. Филиппов, Е. В. Новикова, М. Г. Добрецов, ИЭФБ РАН).

По 5-минутным фрагментам ЭКГ рассчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС),

параметры variability ритма сердца (BPC) во временном домене, характеризующие: 1) общую BPC по SDRR; 2) влияние парасимпатического отдела вегетативной нервной системы (пВНС) по RMSSD (квадратный корень из среднего квадрата разностей величин длительности смежных RR-интервалов синусового происхождения) и pNN3 (процент RR-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущего более чем на три мс); 3) вклад симпатического отдела ВНС (сВНС) по SDAvgRR (стандартное отклонение среднего значения RR-интервалов, вычисленного по 1-минутным сегментам записи), SDAvgHR (стандартное отклонение среднего значения RR-интервалов, вычисленного по 1-минутным сегментам записи); и параметры ЭКГ: амплитуды зубцов P, T, Q, R, S, длительность комплекса QRS, интервалов RR, PQ, RT, QT и их скорректированные значения по следующим формулам (Morozova et al. 2019):

$$RTc = \frac{RT}{\sqrt[3]{RR}}$$

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt[3]{RR}}$$

Для более детального изучения изменений зубца T были рассчитаны дополнительные параметры: SdoT — площадь под зубцом T до пика, SpoleT — площадь под зубцом T после пика, SdoT/SpoleT — отношение площадей под зубцом T до и после пика, SsumT — полная площадь под зубцом T, T50 — длительность зубца T, измеренная при 50% пиковой амплитуды, выражающая ширину этого зубца.

Определение уровня экспрессии генов

Для исследования влияния перорального введения KB-R7943 были выбраны гены, кодирующие белки ионных каналов, участвующих в патогенезе диабетической нейропатии (SCN9A (натриевый ионный канал VGSC Nav1.7), CACNA1H ($\alpha 1$ субъединица кальциевого ионного канала VGCCs T-типа), CACNA2D1 ($\alpha 2\delta$ -1 субъединица кальциевого ионного канала VGCCs T-типа)), и белки, регулирующие апоптоз (Bcl-2 и Bax). Оценку уровня экспрессии генов проводили в образцах тканей гипоталамуса и гиппокампа с помощью ПЦР в реальном времени (амплификатор 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)) по методике, описанной ранее (Romanova et al. 2018).

Результаты и обсуждение

Метаболические характеристики

После введения СТЗ развитие СД1 было подтверждено у всех животных диабетических групп. В долгосрочном эксперименте через пять недель после индукции наблюдали формирование СД1: уменьшение массы тела на 9,2% ($p < 0,0001$), возрастание среднего уровня случайной глюкозы до $25,1 \pm 1,7$ ммоль/л против контрольной группы $6,7 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$) и снижение среднего уровня инсулина в крови до $0,4 \pm 0,1$ нг/мл против контрольной группы $1,2 \pm 0,1$ нг/мл ($p = 0,012$).

Тестирование поведения

Анализ результатов тестирования в тесте «Открытое поле» контрольных и диабетических животных, получавших KB-R7943 в течение недели, не обнаружил статистически значимых отличий в сравнении с контрольной и диабетической группами (рис. 1).

Тестирование экспериментальных животных в «Открытом поле» не выявило статистически значимых изменений локомоторной активности. Однако по литературным данным этот метод позволяет определять изменения уровня тревоги при СД1 (Seibenhener, Wooten 2015), что часто сопровождается развитием ДН (Guan et al. 2019).

Вероятно, для выявления нейропатической боли на уровне локомоторной активности и тревожности требуется более выраженное развитие СД1 у крыс (более восьми недель).

Анализ ЭКГ

Сравнительный анализ ЭКГ у животных до и после (в конце исследования) индукции СД1 выявил ряд изменений оцениваемых параметров. Выявленные статистически значимое снижение средней ЧСС на 14%, увеличение RR-интервала и амплитуды R-зубца на 17% и 14% могут свидетельствовать о развитии брадикардии. При этом не отмечено ожидаемого снижения показателей ВРС, таких как SDRR, характеризующего общую ВРС, а также SDavgRR и SDavgHR, отражающих вклад сВНС в вегетативную регуляцию сердца и медленные изменения сердечного ритма (Mogozova et al. 2019). Напротив, параметры SDRR и SDavgRR статистически значимо возрастали на 29% и 79%, и имелась тенденция к увеличению SDavgHR. Это позволяет заключить, что в иннервацию сердца у диабетических крыс возрастает вклад симпатической регуляции.

Также у диабетических животных выявлены статистически значимые изменения характеристик как самого T-зубца — увеличение амплитуды, ширины (T50) и площади ($S_{\text{sum}} T$) на 38%, 42% и 81% соответственно, так и параметров,

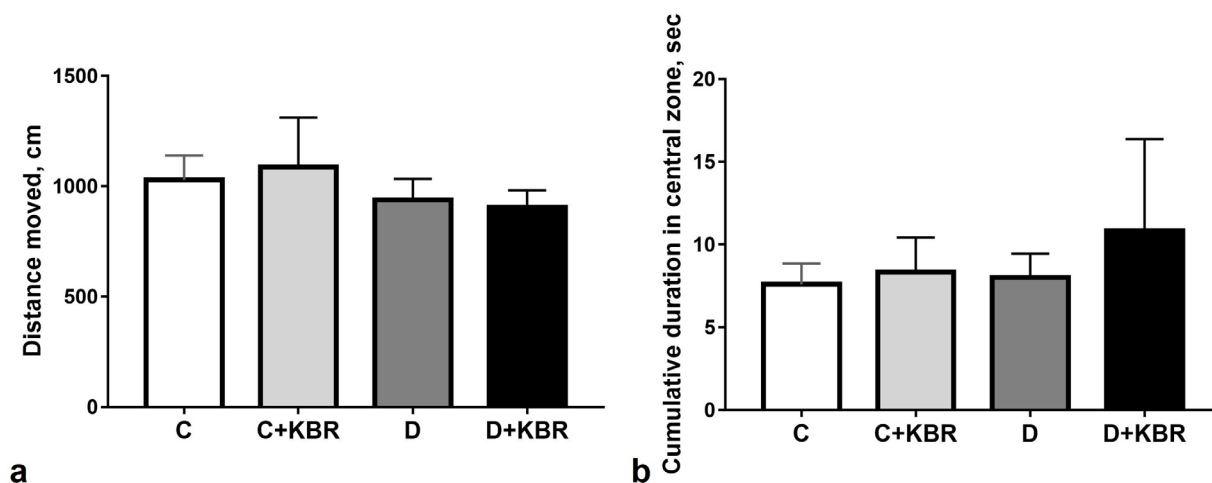


Рис. 1. Параметры теста «Открытое поле» в эксперименте с недельным введением KB-R7943 контрольным и диабетическим животным: а — общее расстояние, пройденное за время тестирования, б — общая продолжительность пребывания в узкой центральной зоне

Fig. 1. Parameters of the open field test in the experiment with a week-long administration of KB-R7943 to control and diabetic animals: a—total distance traveled during the test, b—total duration of stay in the narrow central zone

связанных с T-зубцом — увеличение длительности RT-интервала и значения RTc на 23% и 17%. Увеличение параметров T-зубца является признаком нарушения синхронизации и замедления реполяризации желудочков сердца при СД1 (di Bernardo et al. 2000). Обнаруженное у диабетических крыс статистически значимое возрастание QT-интервала и значения QTc на 23% и 11% согласуется с данными литературы (Amione et al. 2017; Esina et al. 2016; Inanir et al. 2020) и свидетельствует об увеличении общей продолжительности реполяризации миокарда желудочков у диабетических животных (Kittnar 2015).

В целом, выявленные у диабетических животных особенности ЭКГ — увеличение зубцов T и R, увеличение интервалов QT и RT и их скорректированных значений (QTc и RTc), брадикардия — подтверждают развитие нарушений сердечной деятельности.

У контрольных животных после недельного введения KB-R7943 (группа C+KBR) амплитуда зубца R статистически значимо возросла на 8%. Однако значимых различий параметров ЭКГ между животными из групп C и C+KBR не было обнаружено. Вредным побочным

действием фармакологических препаратов можно рассматривать не увеличение, выявленное в настоящей работе, а снижение параметров ВРС, поскольку именно это усиливает электрическую нестабильность миокарда и тем самым создает условия для возникновения злокачественных желудочковых аритмий (Mogozova et al. 2019).

У диабетических животных, получавших KB-R7943 в течение недели (группа D+KBR), не выявлено статистически значимых отличий параметров ЭКГ от таковых у диабетических животных без терапии (группа D).

Проведенный анализ ЭКГ позволяет заключить, что недельная терапия препаратом KB-R7943 не влияет на сердечную активность как у контрольных, так и у диабетических животных.

Анализ уровня экспрессии исследуемых генов

Анализ уровня экспрессии исследуемых генов в гипоталамусе выявил статистически значимые изменения только для гена *Bax*: уровень экспрессии гена статистически значимо снижался в группе D+KBR по сравнению с группой D ($p = 0,038$) (рис. 2). Кроме того, обнаружено ожидаемое снижение уровня экспрессии гена

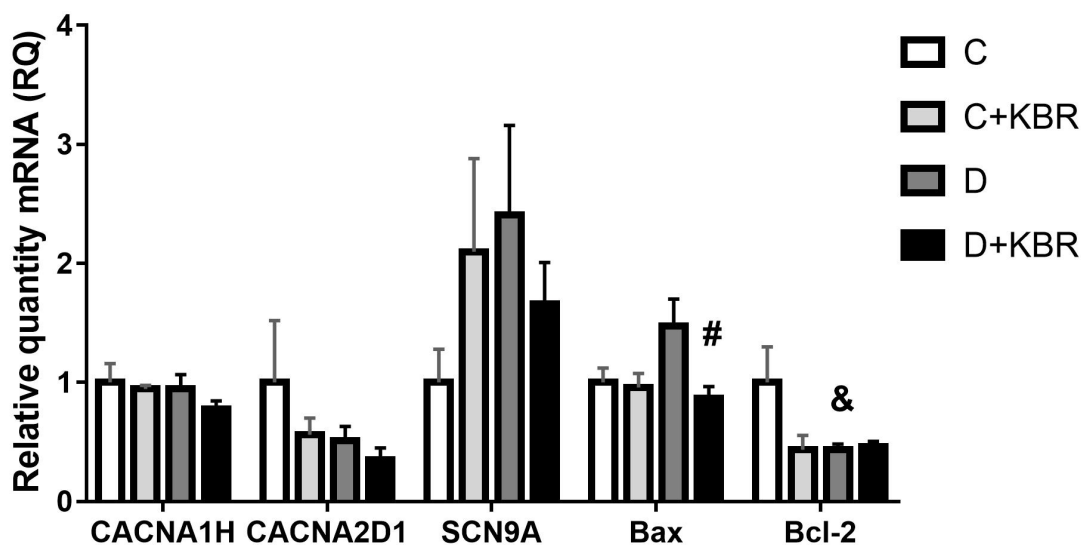


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих белки, участвующие в сигнальной трансдукции при диабетической нейропатии и апоптозе в гипоталамусе крыс в сравнении с этим показателем у контрольных животных. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе. Уровень экспрессии мРНК генов нормирован по Rn18S (рРНК 18S-субъединицы) в гипоталамусе крыс по данным ПЦР в реальном времени. Данные представлены как $M \pm SEM$. Различия между группами C и C+KBR (*), между группами D и D+KBR (#), а также между группами C и D (&) статистически значимы при $p < 0,05$

Fig. 2. The level of mRNA expression of genes encoding proteins involved in signal transduction in diabetic neuropathy and apoptosis in the hypothalamus of rats in comparison with this indicator in control animals. RQ values are calculated relative to the control group. The level of gene mRNA expression was normalized by Rn18S (18S subunit rRNA) in the hypothalamus of rats according to real-time PCR data. Data are presented as $M \pm SEM$. Differences between groups C and C+KBR (*), between groups D and D+KBR (#), and between groups C and D (&) are significant at $p < 0.05$

Bcl-2 в диабетической группе D по сравнению с контрольной группой C ($p = 0,026$).

Оценка экспрессии исследуемых генов в гиппокампе крыс показала значительное, в два раза, увеличение уровня экспрессии гена *CACNA2D1*, кодирующего $\alpha 2\delta$ -1-субъединицу потенциал-зависимых кальциевых каналов, у диабетических животных группы D+KB-R7943 по сравнению с группой D, получавших плацебо в течение такого же срока ($p = 0,021$) (рис. 3). Анализ результатов ПЦР для гена *SCN9A*, кодирующего потенциал-зависимый натриевый канал $Na_v1.7$, обнаружил увеличение экспрессии у группы C+KBR ($p = 0,041$), а также у диабетической группы D ($p = 0,021$) в сравнении с контрольной группой C. У группы D+KBR зафиксировано статистически значимое снижение экспрессии гена *SCN9A* по сравнению с группой D ($p = 0,008$) (рис. 3).

Полученные результаты можно объяснить тем, что при диабетическом повреждении повышается экспрессия генов и, как следствие, усиливается активность потенциал-зависимых натриевых каналов *Nav1.7* (Alles, Smith 2021).

Однако в случае потенциал-зависимых кальциевых каналов не наблюдался ожидаемый результат. Так, ранее показано, что при ДН экспрессия генов не меняется (Alles, Smith 2021), а KB-R7943 вызывает двукратное увеличение экспрессии *CACNA2D1*. Выявленные в работе изменения экспрессии генов ионных каналов могут свидетельствовать о неоднозначном влиянии KB-R7943 на распространение болевого сигнала и гипервозбудимости нейронов в отделах головного мозга, участвующих в обработке болевой информации, поскольку повышенная экспрессия $\alpha 2\delta$ -1 субъединицы VGCCs T-типа и увеличение активности *Nav1.7* ассоциированы с развитием болевой гиперчувствительности при ДН.

Уровень экспрессии генов *Vax* и *Bcl-2* увеличился в группе C+KBR в сравнении с контрольной группой C ($p = 0,0007$ и $p = 0,004$, соответственно). В группе D+KBR отмечено снижение экспрессии *Bcl-2* относительно группы D ($p = 0,0004$). Кроме того, уровень экспрессии *Bcl-2* увеличился в диабетической группе D по сравнению с контрольной C ($p = 0,0007$) (рис. 3).

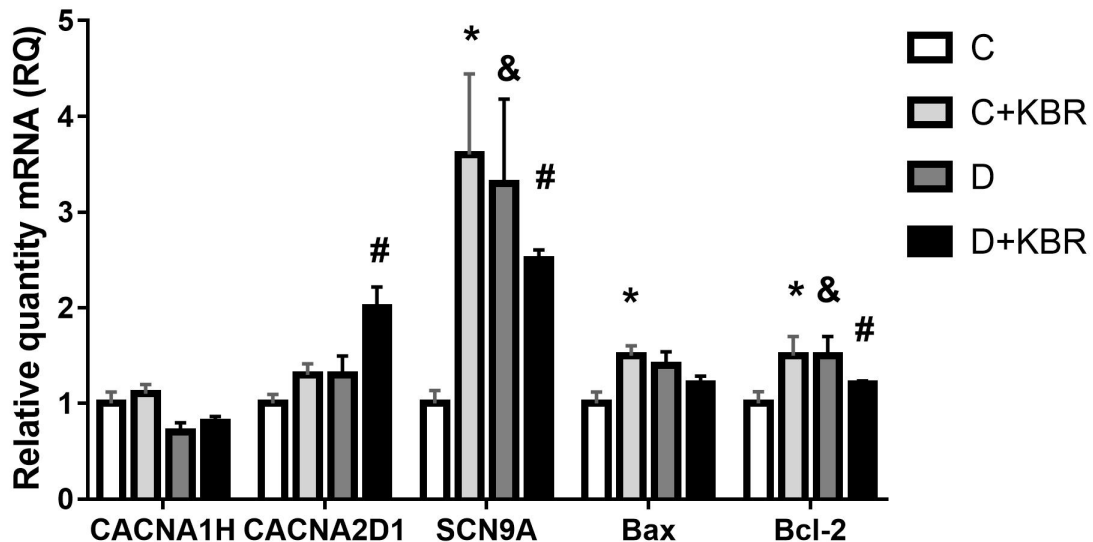


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих белки, участвующие в сигнальной трансдукции при диабетической нейропатии и апоптозе в гиппокампе крыс в сравнении с этим показателем у контрольных животных. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе. Уровень экспрессии мРНК генов нормирован по *Rn18S* (рРНК 18S-субъединицы) в гиппокампе крыс по данным ПЦР в реальном времени. Данные представлены как $M \pm SEM$. Различия между группами C и C+KBR (*), между группами D и D+KBR (#), а также между группами C и D (&) статистически значимы при $p < 0,05$

Fig. 3. The level of mRNA expression of genes encoding proteins involved in signal transduction in diabetic neuropathy and apoptosis in the hippocampus of rats in comparison with this indicator in control animals. RQ values are calculated relative to the control group. The level of gene mRNA expression was normalized by *Rn18S* (18S subunit rRNA) in the hippocampus of rats according to real-time PCR data. Data are presented as $M \pm SEM$. Differences between groups C and C+KBR (*), between groups D and D+KBR (#), and between groups C and D (&) are significant at $p < 0.05$

Обнаруженные в работе повышение уровня экспрессии гена *Vax* и снижение экспрессии гена *Vcl-2* в отделах мозга у диабетических крыс согласуются с литературными данными (Soleymaninejad et al. 2017).

Выводы

Введение KB-R7943 в течение недели как контрольным, так и диабетическим крысам не оказывает воздействия на работу сердца по данным ЭКГ.

Введение KB-R7943 в течение недели как контрольным, так и диабетическим крысам не оказывает негативного влияния на поведение, что выражается в одинаковом прохождении теста «Открытое поле» животными, как получавшими, так и не получавшими препарат.

Введение KB-R7943 в течение недели контрольным крысам приводит к повышению уровня мРНК *Nav1.7*, возрастанию экспрессии генов *Vax*, *Vcl-2* в гиппокампе. В диабетической группе в гипоталамусе терапия KB-R7943 снижает уровень мРНК *Vax*. Введение KB-R7943 в течение недели диабетическим крысам приводит к увеличению экспрессии гена *CACNA2D1*, снижению экспрессии гена *SCN9A*, *Vcl-2* и не влияет на уровень экспрессии *Vax* в гиппокампе.

KB-R7943 можно рассматривать как потенциального кандидата для дальнейшего исследования в качестве противоболевого препарата.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Работа на животных была проведена с соблюдением принципов гуманности (Директивы Совета Европейских сообществ 1986 г. 86/609/ЕЕС).

Ethics Approval

Animal experiments were carried out in accordance with the ethical standards of the European Union Directive 86/609/ЕЕС.

Вклад авторов

а. Сухов Иван Борисович — концепция и постановка экспериментов, редактирование рукописи;

б. Чистякова Оксана Викторовна — постановка экспериментов, редактирование рукописи;

в. Баюнова Любовь Владимировна — постановка экспериментов, редактирование рукописи;

г. Шестакова Наталья Николаевна — концепция экспериментов, редактирование рукописи.

Author Contributions

a. Ivan B. Sukhov developed the concept, conducted experiments, and edited the manuscript;

b. Oxana V. Chistyakova conducted experiments and edited the manuscript;

c. Lyubov V. Bayunova conducted experiments and edited the manuscript;

d. Natalia N. Shestakova developed the concept and edited the manuscript.

Благодарности

Эксперименты выполнены на базе ЦКП научного оборудования для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований ИЭФБ РАН.

Acknowledgements

The authors are thankful to the staff of the Research Resource Center for Physiological, Biochemical and Molecular-Biological Research (Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences).

Список сокращений

ДН — диабетическая нейропатия; КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза; СД — сахарный диабет; СД1 — сахарный диабет 1-го типа; СТЗ — стрептозотоцин; С — контрольная группа, получавшая раствор КМЦ (2,5%) в качестве плацебо; С+KBR — контрольная группа, получавшая KB-R7943 в растворе КМЦ (2,5%); D — диабетическая группа, получавшая раствор КМЦ (2,5%) в качестве плацебо; D+KBR — диабетическая группа, получавшая KB-R7943 в растворе КМЦ (2,5%).

List of Abbreviations

C — control group treated with CMC solution (2.5%) as placebo; C+KBR — control group treated with KB-R7943 in CMC solution (2.5%); CMC — carboxymethylcellulose; D — diabetic group treated with CMC solution (2.5%) as placebo; D+KBR — diabetic group treated with KB-R7943 in CMC solution (2.5%); DM—diabetes mellitus; DM1 — type 1 diabetes mellitus; DN — diabetic neuropathy; STZ — streptozotocin.

References

- Alles, S. R. A., Smith, P. A. (2021) Peripheral voltage-gated cation channels in neuropathic pain and their potential as therapeutic targets. *Frontiers in Pain Research*, vol. 2, article 750583. <https://doi.org/10.3389/fpain.2021.750583> (In English)
- Amione, C., Giunti, S., Fornengo, P. et al. (2017) Incidence of prolonged QTc and severe hypoglycemia in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetologica*, vol. 54, no. 9, pp. 871–876. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1018-6> (In English)
- Bouhassira, D. (2019) Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Revue Neurologique*, vol. 175, no. 1-2, pp. 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016> (In English)
- Boulton, A. J. M., Vinik, A. I., Arezzo, J. C. et al. (2005) Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, vol. 28, no. 4, pp. 956–962. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.4.956> (In English)
- Di Bernardo, D., Murray, A. (2000) Explaining the T-wave shape in the ECG. *Nature*, vol. 403, no. 6765, article 40. <https://doi.org/10.1038/47409> (In English)
- Esina, M. V., Efremova, O. N., Yamashkina, E. I. et al. (2016) Izuchenie prodolzhitel'nosti intervala QT pri sakharnom diabete 1 tipa [Study prolonged QT interval of patients with diabetes mellitus type 1]. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke — Health and Education Millennium*, vol. 18, no. 9, pp. 27–30. (In Russian)
- Guan, S., Shen, Y., Ge, H. et al. (2019) Dihydropyridine alleviates diabetic neuropathic pain and depression comorbidity symptoms by inhibiting P2X7 receptor. *Frontiers in Psychiatry*, vol. 10, article 770. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00770> (In English)
- Huang, Y., Wen, L.-L., Xie, J.-D. et al. (2019) Antinociceptive effectiveness of the inhibition of NCX reverse-mode action in rodent neuropathic pain model. *Molecular Pain*, vol. 15. [Online]. Available at: <https://doi.org/10.1177/1744806919864511> (accessed 12.02.2023). (In English)
- Inanır, M., Gunes, Y., Sincer, I., Erdal, E. (2020) Evaluation of electrocardiographic ventricular depolarization and repolarization variables in type 1 diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 114, no. 2, pp. 275–280. <https://doi.org/10.36660/abc.20180343> (In English)
- Jaggi, A. S., Singh, N. (2011) Therapeutic targets for the management of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *CNS & Neurological Disorders—Drug Targets*, vol. 10, no. 5, pp. 589–609. <https://doi.org/10.2174/187152711796235041> (In English)
- Kittnar, O. (2015) Electrocardiographic changes in diabetes mellitus. *Physiological Research*, vol. 64, no. 5, pp. S559–S566. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933230> (In English)
- Morozova, M. P., Gavrilova, S. A., Ivanov, E. V. et al. (2019) Dinamika variabel'nosti ritma serdtsa u krysov streptozototsinovym sakharnym diabetom [Dynamics of heart rate variability in rats with streptozotocin-induced diabetes]. *Sakharnyj diabet — Diabetes Mellitus*, vol. 22, no. 1, pp. 44–52. (In Russian)
- Romanova, I. V., Derkach, K. V., Mikhrina, A. L. et al. (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochemical Research*, vol. 43, no. 4, pp. 821–837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z> (In English)
- Seibenhener, M. L., Wooten, M. C. (2015) Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 96, article e52434. <https://doi.org/10.3791/52434> (In English)
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., Bernatova, I. (2013) Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 6, no. 3, pp. 126–135. (In English)
- Shestakova, N. N., Belinskaya, D. A., Bojkov, S. I. et al. (2019) NMDA retseptor i natrij-kal'tsievij obmennik (NCX) — molekulyarnye misheni protivobolevogo i protivozudnogo dejstviya antidepressantov [NMDA receptor and sodium-calcium exchanger (NCX) — molecular targets of antidepressant antinociceptive and antibacterial effects]. *Rossijskij zhurnal boli — Russian Journal of Pain*, vol. 17, no. S1, pp. 27–28. (In Russian)
- Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Poguzhelskaya, E. E. et al. (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 355, no. 3, pp. 484–495. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173> (In English)
- Sibarov, D. A., Antonov, S. M. (2018) Mekhanizmy kal'tsij-zavisimoj desensitizatsii NMDA retseptorov [Calcium-dependent desensitization of NMDA receptors]. *Biokhimiya — Biochemistry*, vol. 83, no. 10, pp. 1464–1475. <http://dx.doi.org/10.1134/S0320972518100032> (In Russian)
- Sibarov, D. A., Poguzhelskaya, E. E., Antonov, S. M. (2018) Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: A role of membrane cholesterol. *BMC Neuroscience*, vol. 19, article 73. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0475-3> (In English)

- Soleymaninejad, M., Joursaraei, S. G., Feizi, F., Anarkooli, I. J. (2017) The effects of lycopene and insulin on histological changes and the expression level of Bcl-2 family genes in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017, article 4650939. <https://doi.org/10.1155/2017/4650939> (In English)
- Stepanenko, Y. D., Boikov, S. I., Sibarov, D. A. et al. (2019) Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: Enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block. *Scientific Reports*, vol. 9, article 19454. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z> (In English)