

Изучение эффектов диазепама на асцитную карциному Эрлиха и тревожные реакции у мышей самцов популяции SHK

Калинина Т. С.¹, Шимширт А. А.¹, Лисицкая К. В.², Волкова А. В.¹, Кудряшов Н. В.^{1,3}

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

² – Института биохимии имени А.Н. Баха Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация. Актуальной проблемой является коморбидность злокачественных опухолей и аффективных расстройств. Известно о неблагоприятном влиянии некоторых психотропных лекарственных средств на злокачественные опухоли и метастазирование, в эксперименте установлена связь нейромедиаторов с опухолями. Известно свойство диазепама стимулировать рост асцитной карциномы Эрлиха в эксперименте на мышах. Целью настоящего исследования явилось изучение роли бензодиазепиновых рецепторных сайтов разной локализации в стимулирующем влиянии диазепама на карциному Эрлиха. При использовании фармакологических анализаторов бензодиазепинового сайта центрального ГАМК_A рецептора флумазенила (5 мг/кг, подкожно) и блокатора митохондриального транспортного белка 18 кДа соединения PK11195 (5 мг/кг, подкожно) были изучены эффекты диазепама (0,03 и 3,0 мг/кг, интрагастрально) на развитие асцитной карциномы Эрлиха и ориентировочно-исследовательскую реакцию в тесте «открытое поле» на мышах самцах популяции SHK. Установлено, что диазепам в дозе 0,03 мг/кг, но не в дозе 3 мг/кг, увеличивает клеточность опухолевого выпота. Вместе с тем, диазепам в обеих изученных дозах вызывает увеличение периферической двигательной активности у мышей, что указывает на усиление тревожных реакций. Установлено, что флумазенил, но не PK11195, ослабляет стимулирующий эффект диазепама на асцитную карциному Эрлиха и ингибирует про-анксиогенное действие малой дозы диазепама. Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии ассоциативной связи между проопухолевым действием диазепама и его влиянием на тревожные реакции, но при этом не исключать участие центральных механизмов в стимулирующем эффекте низких доз бензодиазепина на опухоль.

Ключевые слова: бензодиазепины; ГАМК_A рецептор; карцинома Эрлиха; мышь; тревожные реакции

Для цитирования:

Калинина Т. С., Шимширт А. А., Лисицкая К. В., Волкова А. В., Кудряшов Н. В. Изучение эффектов диазепама на асцитную карциному Эрлиха и тревожные реакции у мышей самцов популяции SHK. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):20–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-20-29>
Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 января 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Study of diazepam effects on Ehrlich ascites carcinoma and anxiety responses in male SHK mice

Kalinina TS¹, Shimshirt AA¹, Lisitskaya KV², Volkova AV¹, Kudryashov NV^{1,3}

¹ – FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

² – Bach Institute of Biochemistry RAS the Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences Moscow, Russia

³ – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Abstract. Comorbidity of malignant tumors and affective disorders is an urgent problem. It is known that some psychotropic drugs may adversely influence the growth of malignant tumors and metastasis; in the experiment, a connection between neurotransmitters and tumors was established. Earlier, in experiments on mice, the ability of diazepam to stimulate the growth of Ehrlich's ascites carcinoma was demonstrated. The aim of this study was to assess the role of central and peripheral benzodiazepine receptor sites in the stimulating effect of diazepam on Ehrlich's carcinoma. The effects of diazepam (0.03 and 3.0 mg / kg, intragastric) on the development of Ehrlich's ascites carcinoma and an orientation-exploratory response in the "open field" test on male SHK mice were studied. It was found that diazepam at a dose of 0.03 mg / kg, but not at a dose of 3 mg / kg, increases the cellularity of the malignant ascites. At the same time, diazepam in both doses studied causes an increase in the peripheral motor activity of mice, which indicates an increase in anxiety reactions. It was found that flumazenil, but not PK11195, attenuates the stimulating effect of diazepam on Ehrlich's ascites carcinoma and inhibits the pro-anxiogenic effect of a small dose of diazepam. The results obtained allow us to conclude that there is no associative relationship between the pro-tumor effect of diazepam and its effect on anxiety responses, but at the same time, the participation of central mechanisms in the stimulating effect of benzodiazepine on the tumor cannot be ruled out.

Keywords: benzodiazepines GABAA receptor; Ehrlich carcinoma; mouse; anxiety responses

For citations:

Kalinina TS, Shimshirt AA, Lisitskaya KV, Volkova AV, Kudryashov NV. Study of diazepam effects on Ehrlich ascites carcinoma and anxiety responses in male SHK mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):20–29. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-20-29>
Received: December 01, 2021. **Accepted:** January 15, 2022. **Published:** March 30, 2022

Введение / Introduction

По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer), в 2012 году в мире было зарегистрировано 14,1 млн новых случаев злокачественных заболеваний, рак стал основной причиной смерти в 8,2 млн случаев в 2012 году. При сохранении существующих тенденций заболеваемости к 2030 злокачественные онкологические заболевания достигнут 68 % прироста в сравнении с 2012 годом [1]. Несмотря на существенный прогресс в разработке новых методик хирургического, радиационного лечения и иммунотерапии, а также внедрения эффективных средств таргетной терапии, многие проблемы лечения онкологических больных остаются нерешёнными.

Известно о коморбидности злокачественных опухолей и аффективных расстройств, в частности тревожно-депрессивных [2–4]. Однако вопрос о первичности этих процессов остаётся открытым. Но тем не менее, в последнее время всё больше данных указывают на непосредственную роль нервной системы на течение опухолевого процесса. Через гипоталамо-гипофизарно-адреналовую ось, а также благодаря симпатическому и парасимпатическому влиянию, нервная система, в том числе и её центральные отделы, участвуют в формировании оптимального микроокружения в тканях позвоночных, регулируя гомеостаз и воздействуя на течение многих патологических процессов, в том числе и опухолевых. Полагают, что на тканевом уровне периневральное пространство создаёт для опухолевых клеток микроокружение и антиапоптотические условия, необходимые для их выживания и распространения [5, 6]. Ряд злокачественных опухолей могут реагировать на факторы роста, вырабатываемые нервными волокнами периферических нервов, а также способны вырабатывать аксон-стимулирующие факторы [7]. Подобно неопластическому, при раке предстательной железы, прямой кишки, мочевого пузыря и пищевода наблюдается увеличение количества, протяжённости аксонов и внедрение нервных волокон в опухолевую ткань [8–10]. Ряд опухолей и клеточных линий продуцируют нейротрофические факторы (нейрональный фактор роста, нейротрофический фактор мозга и нейротрофический глиальный фактор), стимулирующие внедрение в ткани опухоли симпатических и парасимпатических нервных волокон [11, 12]. При раке предстательной железы у пациентов наблюдается повышенная плотность нервных окончаний в опухолевых очагах, тогда как *in vitro* показана повышенная выработка РС-3 клетками рака предстательной железы семафорина 4F, молекулы аксонального сигнального наведения [8, 13].

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что хронический стресс, депрессия, неблагоприятные социальные условия являются существенными факторами риска развития и прогрессирования злокачественных опухолевых процессов [3, 4].

Экспериментальные исследования также выявили существенный вклад стресса в развитие злокачественных процессов. Показано, что иммобилизационный стресс на фоне введения гепатотоксичного канцерогена диэтилнитрозамина повышает инцидентность и скорость роста опухолей печени у крыс [14]. Вынужденное плавание, гипотермия, хирургическое вмешательство, социальный конфликт вызывают 2–5-кратное повышение скорости и количества метастатических очагов в лёгких у крыс, экспериментально зараженных опухолью молочной железы MADB106 [15]. При хроническом стрессе выброс катехоламинов и глюкокортикоидных гормонов угнетает механизмы противоопухолевой активности иммунной системы [16].

Эксперименты на мышах с трансплантируемыми сингенными опухолями выявили, что норадреналин и адреналин ингибируют образование противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт воздействия на β -адренергические сигнальные механизмы [17]. Положительные психоэмоциональные факторы, такие как социальная поддержка и забота, ассоциируются с повышением уровней НК-киллеров в крови и опухолевом микроокружении, указывая на возможное позитивное влияние положительного когнитивного психологического стимула на функции иммунной системы и её противоопухолевую активность [18]. Стресс запускает выброс катехоламинов, которые стимулируют пролиферацию опухолевых клеток и усиливают их метастатическую активность непосредственно через β -адренорецепторы и циклоаденозинмонофосфат-протеинкиназа А-зависимый путь, что было выявлено на моделях рака молочной железы, лёгкого, предстательной железы и прямой кишки [19, 20].

Известно влияние нейромедиаторов на динамику как опухолевого роста, так и метастазирования [21–24]. В клинической научной литературе обсуждаются наблюдения о возможном влиянии психотропных лекарственных средств на течение злокачественных опухолевых процессов [25, 26].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), основной тормозной медиатор центральной нервной системы, оказывает существенное влияние на пролиферацию злокачественных клеток и распространение опухолевого процесса [23]. Бензодиазепиновые соединения широко применяются в настоящее время в клинической практике как анксиолитические, седативные, снотворные лекарственные средства. В качестве основной центральной фармакологической мишени бензодиазепина диазепам рассматривается бензодиазепиновый модуляторный сайт ГАМК_A рецептора, периферической – митохондриальный транспортный белок 18кДа («периферический бензодиазепиновый рецептор, TSPO18), присутствие которого установлено в периферических тканях (как нормальных, так и с признаками воспаления, опухолях) и в ЦНС (глиоцитах, нервных стволовых клетках и в постмитотических нейрональных предшественниках) [27].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* продемонстрирована способность диазепама влиять на развитие злокачественной опухоли, оказывать ингибирующее действие на активность натуральных киллеров [28–30]. Установлено, что диазепам (3 мг/кг при введении внутрь) стимулирует рост карциномы Эрлиха (асцитной формы) у мышей, что проявляется в увеличении числа опухолевых клеток в асцитной жидкости и объёма асцитной жидкости [28]. Этот эффект не наблюдался в меньших дозах препарата (0,3 или 1 мг/кг, внутрь) [29]. Вместе с тем, исследования *in vitro* показали, что низкие (наномолярные) концентрации лигандов TSPO18 увеличивают пролиферацию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [31] и глиомы C6 [32], а высокие дозы (микромолярные концентрации) лигандов TSPO18 вызывают гибель клеток опухолевых культур [33].

Эффекты диазепама на экспериментальную карциному Эрлиха объясняются исключительно периферическими механизмами, вполне обосновано опираясь на данные о наличии в асцитной жидкости определённой концентрации диазепама при его введении внутрь, способности диазепама индуцировать активные формы кислорода в тканях опухоли, связываться с TSPO18 опухолевых клеток и ряд других фактов [28]. В доступной научной литературе мы не нашли экспериментальных работ, которые рассматривали бы потенциальную возможность участия центральных структур регуляции эмоций млекопитающих в проопухолевых эффектах диазепама на модели карциномы Эрлиха *in vivo*.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли функциональной активности бензодиазепинового сайта центрального ГАМК_A рецептора и митохондриального транспортного белка 18кДа («периферического бензодиазепинового рецептора», TSPO) в механизме стимулирующего влияния диазепама на рост карциномы Эрлиха.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. В исследовании использованы мыши самцы популяции SHK массой 20–25 г, полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России (Московская область). Животных содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утверждёнными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского

Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Вещества. В качестве препарата исследования использовали субстанцию диазепама гидрохлорида (сибазон). Для селективной фармакологической блокады бензодиазепинового сайта ГАМК_A рецептора использовали флумазенил (5 мг/кг, Sigma/Merck). Для селективной блокады митохондриального транспортного белка использовали соединение PK11195 (5 мг/кг, Sigma/Merck). Диазепам, флумазенил и PK11195 вводили в виде эмульсии, приготовленной с использованием Twin-80 и 0,9 % раствора натрия хлорида. Эмульсию Twin-80 и 0,9 % раствора натрия хлорида (растворитель) использовали в качестве контроля. Вещества вводили в объёме 0,1 мл на 10 г один раз в сутки 7 дней подряд. Флумазенил вводили подкожно или интрагастрально, PK11195 — подкожно, диазепам — интрагастрально.

Опухоль. В качестве модели опухоли использовали перевиваемую асцитную карциному Эрлиха диплоидной формы (АОЭд), полученную из ФГБНУ «Научно-исследовательский Институт морфологии человека». В течение эксперимента АОЭд поддерживали перевивкой мышам внутрибрюшинно по 0,2 мл разведённой асцитной жидкости в соотношении 0,3 мл асцитной жидкости, полученной непосредственно от мыши-донора, и 0,7 мл физиологического раствора. Перевивку осуществляли 1 раз в 9 дней. Первоначальная прививка (первый пассаж) была осуществлена путём внутрибрюшинного введения 0,25 мл неразведённого асцитного препарата после предварительного размораживания. При прививке опухоли мышам экспериментальных групп в брюшную полость вводили 0,2 мл суспензии отмытых опухолевых клеток с содержанием приблизительно 3×10^6 клеток (концентрация суспензии 15×10^6 клеток /мл с 80–90 % содержанием жизнеспособных опухолевых клеток).

Методика подсчёта цитоза клеток карциномы Эрлиха в асцитной (выпотной) жидкости. Цитоз полученной после аспирации из брюшной полости перитонеальной жидкости оценивали с помощью гемацитометра (камера Горяева). Камеру готовили по общепринятой методике, притирали покровное стекло до появления колец Ньютона. С целью гемолиза эритроцитов выпот смешивали с жидкостью Тюрка в соотношении 10 мкл выпота и 990 мкл разбавителя, тщательно перемешивали и оставляли на 15 мин. После окончания инкубации аликвоту жидкости вносили в счётную камеру, инкубировали в течение 1–2 минут для оседания клеток и производили подсчёт клеток суммарно в 100 больших квадратах камеры. Для подсчёта клеток опухоли использовали микроскоп Nikon Eclipse Ci-L с увеличением 1×10 .

Подсчёт цитоза клеточной суспензии в 1 мкл выпота проводили по формуле:

$$X = A \times B / B \times G,$$

где: А – количество опухолевых клеток, подсчитанное в 100 больших квадратах;

Б – степень разведения выпота (100);

В – количество маленьких квадратиков в 100 больших квадратах (1600);

Г – объём счётной камеры над маленьким квадратиком ($1/4000 \text{ мм}^3$). После пересчёта, формула имеет вид: X (клеток в мкл выпота) = $A \times 250$. Рост опухоли оценивали по объёму выпота брюшной опухоли, концентрации опухолевых клеток в 1 мкл и суммарному количеству опухолевых клеток, определяемых в объёме выпота.

Тест «открытое поле». Для оценки тревожных реакций мышей использовали тест «открытое поле» с выделением ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) и индекса тревожности [34]. В течение 2 мин после помещения животного в установку регистрировали горизонтальную двигательную активность у стенок площадки и в её центральной части, вертикальную активность и число обследованных отверстий в полу установки. При суммировании перечисленных выше параметров определяли коэффициент ОИР (Коир), индекс тревожности определяли по изменению соотношения перемещений мыши в центральной части установки к сумме активности в центре и на периферии и фиксировали число животных, осуществлявших полный переход в центральные квадраты [34].

Дизайн эксперимента. *Эксперимент 1.* При изучении влияния диазепама на рост опухоли в сочетании с оценкой его поведенческих эффектов мыши были рандомизированы на 3 группы: 1) растворитель (р-р NaCl 0,9 % + Twin-80); 2) диазепам (0,03 мг/кг); 3) диазепам (3 мг/кг). Части мышей через 1 ч после первого введения контрольного раствора или диазепама вводили приготовленную асцитную суспензию. В течение последующих 6 дней мышам вводили контрольный раствор или растворы диазепама 1 раз в сутки. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) привитых опухолью животных подвергали эвтаназии и собирали асцитную жидкость, что было аналогично дизайну [32]. Животных, предназначенных для поведенческих экспериментов, не подвергали опухолевой прививке. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) мышей тестировали в установке «открытое поле».

Эксперимент 2. Второй этап был посвящён изучению роли ГАМК_A рецептора и TSPO в механизме действия диазепама на рост асцитной карциномы Эрлиха и на поведенческие реакции мышей при использовании фармакологических блокаторов. Животные были распределены по следующим группам: 1) растворитель – подкожно и интрагастрально с интервалом 30 мин; 2) растворитель – подкожно и через 30 мин диазепам (0,03 мг/кг); 3) флумазенил и диазепам (0,03 мг/кг) с интервалом 15 мин; 4) РК11195 и диазепам (0,03 мг/кг) с интервалом 30 мин. Через 1 ч после первого введения комбинации веществ мышам вводили приготовленную

асцитную суспензию, и затем в течение последующих 6 дней вводили комбинации веществ 1 раз в сутки. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) мышей подвергали эвтаназии и собирали асцитную жидкость. Животные, предназначенные для поведенческих экспериментов, получали комбинацию веществ однократно, после чего через 1 ч их использовали в поведенческом тесте.

Эксперимент 3. Третий этап исследования был посвящён изучению влияния интверсного агониста ГАМК_A рецептора флумазенила на развитие карциномы Эрлиха и на ориентировочно-исследовательскую реакцию мышей. Для этого мыши были распределены на две группы: 1) растворитель интрагастрально; 2) флумазенил интрагастрально. Экспериментальная процедура была аналогична таковой на первом этапе работы.

Статистическая обработка. Экспериментальные группы состояли из 6–10 мышей. Для статистической обработки применяли программу Prism (версия 8.0.1. (244)). После проверки гипотезы о нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка данные были представлены или в виде медианы с указанием межквартильного интервала или в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения. Для статистической обработки использовали непарный критерий Стьюдента, однофакторный критерий ANOVA с последующим применением критерия множественных сравнений Ньюмена–Кейлса, критерий Крускала–Уолеса с последующим сравнением по критерию Данна при множественном сравнении, критерий Манна–Уитни при сравнении двух выборок. Результаты, выраженные в %, обрабатывали по методу оценки выборочных долей вариант. Различия между группами полагали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

По результатам первой и второй серий экспериментов установлено, что диазепам при субхроническом интрагастральном введении в дозе 0,03 мг/кг усиливает рост асцитной карциномы, увеличивая общее количество опухолевых клеток в 1,5–2 раза по сравнению с группой мышей, получающих растворитель ($p \leq 0,05$; критерий Дана) (рис. 1В и 2В). Результаты, полученные на мышах самцах популяции SHK, согласуются с известными в научной литературе экспериментальными данными о стимулирующем влиянии диазепама на рост асцитной карциномы Эрлиха у мышей [29] и результатами клинических метаанализов, указывающих на бензодиазепины как фактор риска злокачественных опухолей [26, 35]. Вместе с тем, в нашем исследовании диазепам оказывает эффект на опухоль в дозе на два порядка меньшей, нежели в работе Sakai M et al. [29]. Доза диазепама (3 мг/кг), активная в работе зарубежных коллег,

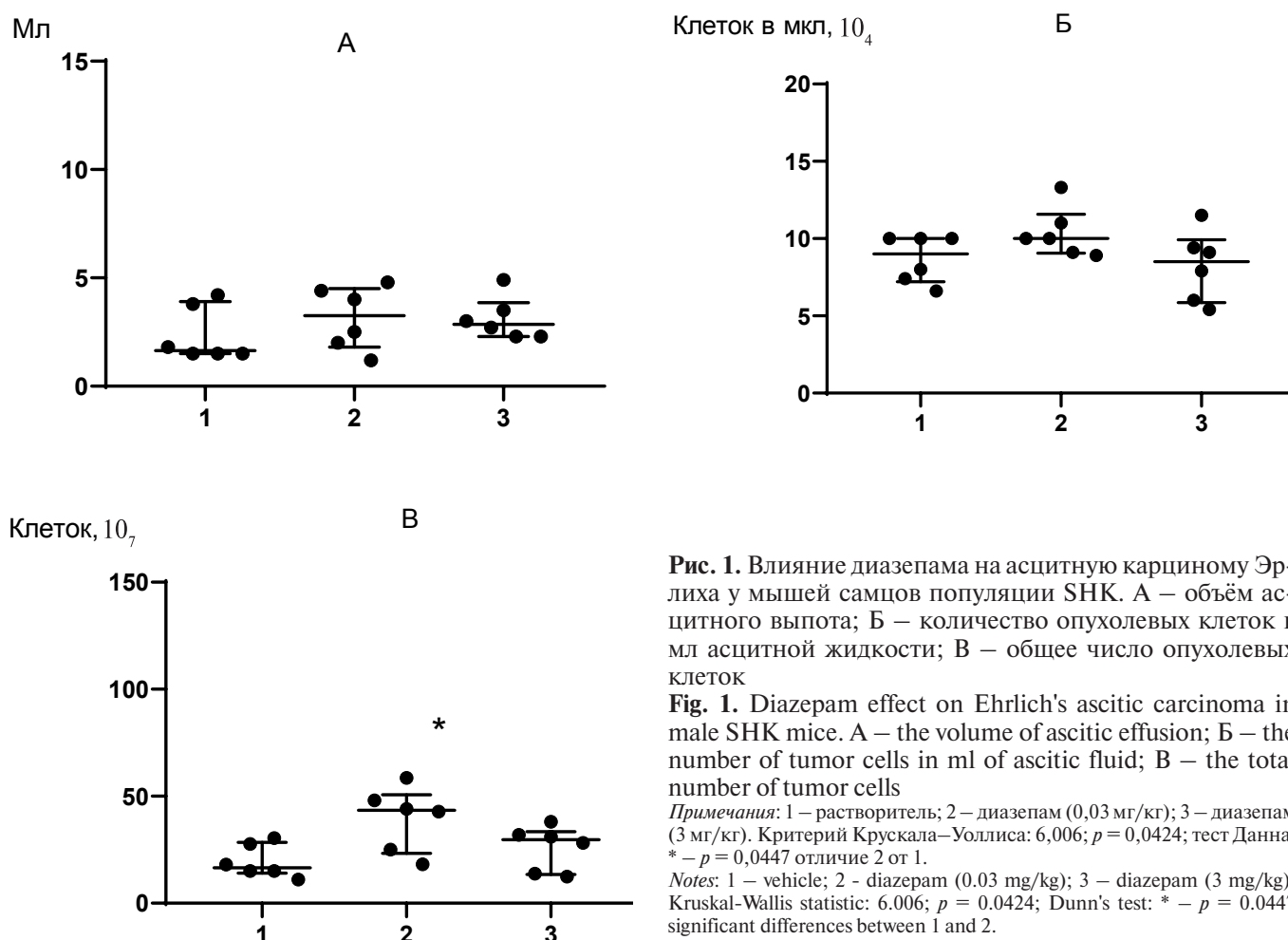


Таблица 1

Эффекты диазепама при субхроническом итрагастральном введении на ориентировочно-исследовательскую реакцию у мышей SHK в тесте «открытое поле»

Table 1

Diazepam per os sub-chronic administration effects on the orienting-exploratory responses in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(Ц+П) × 100, %				
Растворитель 7 введений (n = 20)						
10,6 ± 2,2	34,5 ± 4,1	23,4 % (211/900)	8,1 ± 1,8	7,9 ± 1,0	58,1 ± 7,2	85 % (17/20)
Диазепам 0,03 мг/кг 7 введений (n = 16)						
13,3 ± 2,8	54,9 ± 6,2*	19,5 %* (213/1091)	9,1 ± 2,3	6,3 ± 1,9	83,4 ± 9,6	87,5 (14/16)
Диазепам 3 мг/кг 7 введений (n = 15)						
14,6 ± 2,3	63,3 ± 6,8**	18,8 %* (219/1168)	6,9 ± 1,3	4,1 ± 0,8	88,8 ± 7,3*	93,3 (14/15)

Примечания: n – количество мышей в группе; *,** – отличие диазепама от растворителя при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; Ц – суммарная горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизонтальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%). Уменьшение индекса указывает на усиление тревожных реакций.

Notes: n – number of mice in the group; *,** – differences between diazepam and vehicle with value $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$; Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц+П is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%). The index decrease indicates an anxiety increase.

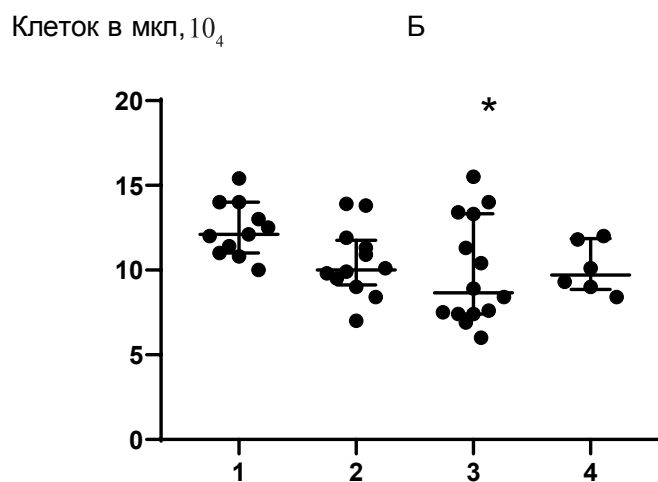
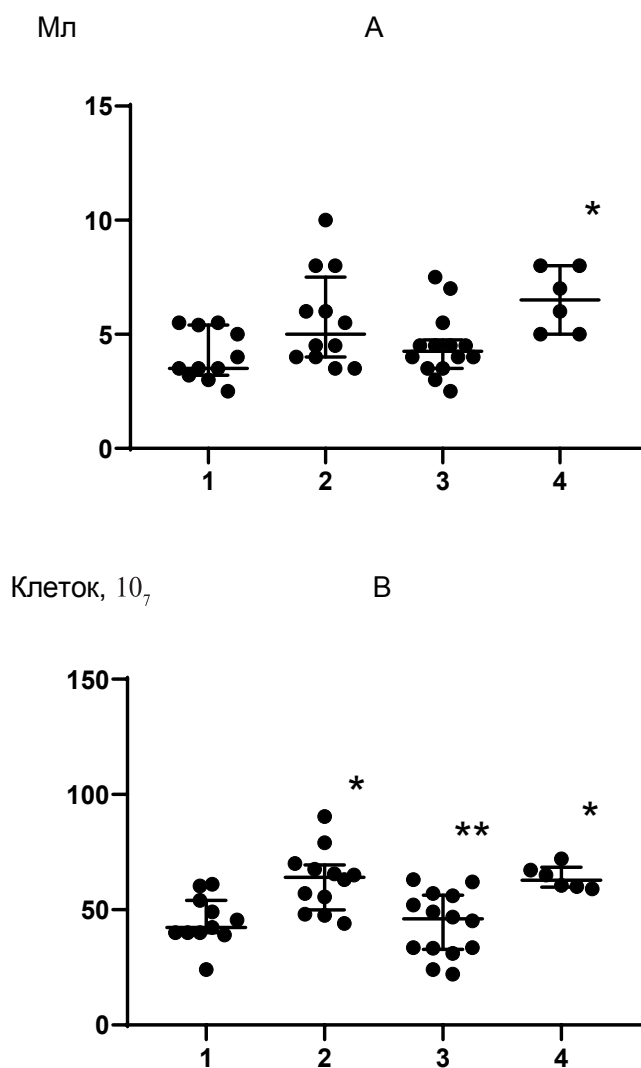


Рис. 2. Флумазенил, но не РК11195, ослабляет эффект диазепама на асцитную карциному Эрлиха на мышцах SHK (самцы). А – объём асцитного выпота; Б – количество опухолевых клеток в мл асцитной жидкости; В – общее число опухолевых клеток

Fig. 2. Flumazenil, but not PK11195, decreases the diazepam effect on Ehrlich's ascitic carcinoma in SHK mice (male). А – the volume of ascitic fluid; Б – the number of tumor cells in ml of ascitic fluid; В is the total number of tumor cells

Примечания: 1 – растворитель (эквивалентный объём, 7 введений *per os*, 1 введение в сутки); 2 – диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений); 3 – диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений) + флумазенил (5 мг/кг, 7 введений подкожно за 15 мин до диазепама); 4 – диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений) + РК11195 (5 мг/кг, 7 введений подкожно за 30 мин до диазепама); на рис. 2Б – критерий Крускала-Уоллиса: 7,598; $p = 0,055$; тест Данна: $*p = 0,0492$ отличие 3 от 1; на рис. 2В – критерий Крускала-Уоллиса тест: 12,70; $p = 0,0053$; тест Данна $*p = 0,0328$ отличие 2 от 1; $**p = 0,0129$ отличие 3 от 2; $*p = 0,0288$ отличие 4 от 1.

Notes: 1 – vehicle (equivalent volume, 7 *per os* treatments, 1 per day); 2 – diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments); 3 – diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments) + flumazenil (5 mg/kg, 7 treatments) subcutaneously 15 minutes before diazepam); 4 – diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments) + PK11195 (5 mg/kg, 7 treatments) subcutaneously 30 minutes before diazepam); in fig. 2B – Kruskal-Wallis statistic: 7.598; $p = 0.055$; Dunn's test: $*p = 0.0492$ differences between 3 and 1; in fig. 2B – Kruskal-Wallis statistic: 12.70; $p = 0.0053$; Dunn test $*p = 0.0328$ differences 2 from 1; $**p = 0.0129$ differences between 3 and 2, $*p = 0.0288$ differences 4 from 1.

в нашем исследовании не вызывала каких-либо изменений по сравнению с растворителем, возможно, по причине неконтролируемых методических причин (особенности популяции животных, штамм опухоли).

В тесте «открытое поле» показано, что диазепам в обеих изученных дозах при субхроническом интрагастральном введении вызывает увеличение двигательной активности самцов в периферической части установки (отличие от растворителя при $p \leq 0,05$), что свидетельствует об усилении тревожных реакций у мышей данной популяции (табл. 1).

Таким образом, на мышцах самцах SHK установлено, что стимулирующее действие на рост карциномы Эрлиха малой дозы диазепама (0,03 мг/кг) сочетается с усилением тревожных реакций у животных. Однако усиление тревожных реакций наблюдается в обеих изученных дозах, что свидетельствует об отсутствии ассоциативной связи между проопухолевым действием

диазепама и его проанксиогенными свойствами.

В группе мышей, получавших комбинацию флумазенила и диазепама, наблюдается уменьшение концентрации опухолевых клеток в 1,3 раза (при $p \leq 0,05$) по сравнению с группой животных, которым вводили только растворитель (рис. 2Б), и уменьшение общего количества опухолевых клеток в 1,4 раза по сравнению с группой, получавшей только диазепам (рис. 2В). Комбинированное применение селективного блокатора TSP0 соединения РК11195 и диазепама увеличивает объём асцита и клеточность карциномы по сравнению с растворителем (при $p \leq 0,05$) (рис. 2А, 2В), в то время как диазепам увеличивает только клеточность опухоли.

Как представлено в табл. 2, в тесте «открытое поле» мыши самцы SHK, получавшие однократно комбинацию «растворитель–диазепам 0,03 мг/кг», демонстрируют селективное усиление тревожных реакций без изменения общей двигательной актив-

Таблица 2

Влияние флумазенила и соединения РК11195 на эффекты диазепама (0,03 мг/кг) в тесте «открытое поле» у мышей SHK

Table 2

Effect of flumazenil and compound PK11195 on the effects of diazepam (0.03 mg/kg) in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(Ц+П) × 100, %				
Растворитель – растворитель, (n = 9)						
2,7±1,2	31,0± 4,7	7,9 % (24/303)	0,8 ± 0,4	1,8±1,2	36,2±5,5	66,7 % (6/9)
Растворитель – Диазепам 0,03 мг/кг, (n = 8)						
1,0±0,6	29,8±3,5	3,3 %* (8/244)	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,4	32,9±4,1	25,0 % (2/8)
Флумазенил 5 мг/кг – диазепам 0,03 мг/кг, (n = 9)						
4,2± 1,6	43,0±5,0	8,9 %** (38/425)	1,4±0,7	1,7±0,4	50,3±6,2	66,7 % (6/9)
РК11195 5 мг/кг – диазепам 0,03 мг/кг, самцы (n = 9)						
0,8±0,4	31,8±6,0	2,4 %**. (7/293)	1,3±0,3	2,2±0,5	36,1±6,3	44,4 % (4/9)

Примечания: n – количество мышей в группе; * – отличие от растворителя при $p \leq 0,05$; ** – отличие от диазепама при $p \leq 0,01$; *** – отличие от растворителя и группы флумазенил+диазепам при $p \leq 0,01$ (метод сравнения выборочных долей вариантов); Ц – горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизонтальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%). Уменьшение индекса указывает на усиление тревожных реакций.

Notes: n – number of mice in the group; * – differences compare to vehicle with value $p \leq 0,05$; ** – differences compare to diazepam with value $p \leq 0,01$; *** – differences compare to vehicle or “flumazenil+diazepam” group with value $p \leq 0,01$ (exact Fisher’s test); Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц+П is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%). The index decrease indicates an anxiety increase.

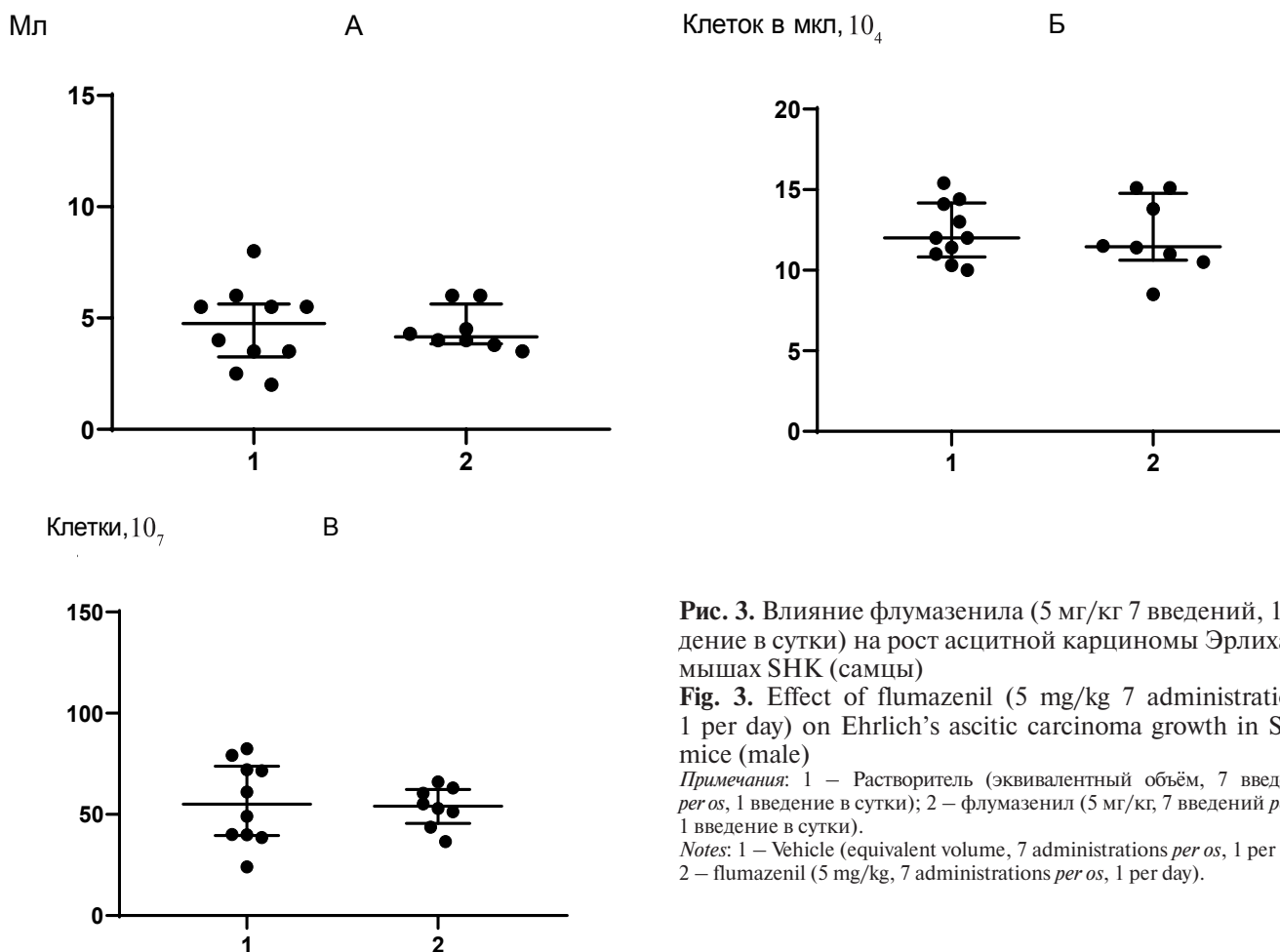


Рис. 3. Влияние флумазенила (5 мг/кг 7 введений, 1 введение в сутки) на рост асцитной карциномы Эрлиха на мышах SHK (самцы)

Fig. 3. Effect of flumazenil (5 mg/kg 7 administrations, 1 per day) on Ehrlich’s ascitic carcinoma growth in SHK mice (male)

Примечания: 1 – Растворитель (эквивалентный объём, 7 введений per os, 1 введение в сутки); 2 – флумазенил (5 мг/кг, 7 введений per os, 1 введение в сутки).

Notes: 1 – Vehicle (equivalent volume, 7 administrations per os, 1 per day); 2 – flumazenil (5 mg/kg, 7 administrations per os, 1 per day).

Таблица 3

Влияние флумазенила (5 мг/кг, интрагастрально) на ориентировочно-исследовательскую реакцию у мышей SHK в тесте «открытое поле»

Table 3

Effect of flumazenil (5 mg/kg, per os) on the orienting-exploratory responses in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(Ц+П) x 100, %				
Растворитель per os, мыши SHK, самцы (n = 9)						
1,8 ± 0,8	30,8±6,9	5,4 % (14/260)	0,8±0,4	2,0±0,5	35,4±7,9	44,4 % (4/9)
Флумазенил 5 мг/кг per os, мыши SHK, самцы (n = 10)						
2,2 ± 0,9	27,7±5,0	7,4 % (22/299)	0,9±0,4	2,2±0,6	32,9±6,1	60,0 % (6/10)

Примечания: n – количество мышей в группе; Ц – горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизонтальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%).
Notes: n – number of mice in the group; Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц/(Ц+П)×100 is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%).

ности по сравнению с мышами из группы «растворитель–растворитель» (при $p \leq 0,05$), что согласуется с ранее полученными данными об усилении тревожных реакций у мышей этой популяции при субхроническом введении диазепама (0,03 мг/кг). В группе мышей, которым вводили комбинацию флумазенила и диазепама, регистрируется восстановление соотношения центральной и периферической двигательной активности до контрольных значений, что свидетельствует об ингибировании вызванного диазепамом в дозе 0,03 мг/кг усиления тревожных реакций. Как представлено в табл. 2, комбинация РК11195 с диазепамом аналогично диазепаму вызывает селективное усиление тревожных реакций в тесте «открытое поле».

Таким образом, было установлено, что селективный инверсный агонист центрального ГАМК_A рецептора флумазенил ингибирует и поведенческие эффекты диазепама, и его стимулирующее влияние на развитие асцитной карциномы Эрлиха. Эффекты диазепама при его комбинации с блокатором митохондриального транспортера 18 кДа не отличаются ни по способности стимулировать рост опухоли, ни по влиянию на ориентировочно-исследовательскую реакцию мышей. Полученные данные не противоречат экспериментальным данным, свидетельствующим о стимулирующем эффекте РК11195 (3 мг/кг при интрагастральном введении) на развитие асцитной карциномы Эрлиха на мышцах самцах популяции Swiss [29].

При изучении влияния интрагастрального применения флумазенила (5 мг/кг) на рост асцитной карциномы Эрлиха установлено отсутствие изменений и объема асцитной жидкости, и концентрации опухо-

левых клеток, и их общего числа по сравнению с растворителем (рис. 3). Применение одного флумазенила (5 мг/кг, интрагастрально) не оказывает влияние на поведение мышей в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что диазепам при субхроническом интрагастральном введении обладает свойством усиливать рост асцитной карциномы Эрлиха избирательно в меньшей изученной дозе. Большая доза диазепама не оказывает влияния на развитие опухоли, но обе дозы вызывают усиление тревожных реакций у мышей, что даёт основания скорее всего для отрицательного ответа на вопрос о наличии ассоциативной связи между проопухолевыми и психотропными свойствами диазепама, по крайней мере влиянием на тревожность. В пользу наличия такой взаимосвязи могут свидетельствовать экспериментальные результаты об ослаблении эффектов диазепама (0,03 мг/кг) и на опухоль, и на тревожное поведение при блокаде бензодиазепинового сайта ГАМК_A рецептора. Данные о том, что флумазенил способен ослаблять проопухоловое действие диазепама, могут указывать на участие центральных ГАМК_A рецептора в данном эффекте. Вопрос о том, в какой степени можно проводить ассоциацию между центральными эффектами диазепама и его способностью влиять на рост карциномы Эрлиха, требует дальнейшего исследования, и в первую очередь, необходимо провести сравнительные исследования эффектов диазепама на рост карциномы у животных с альтернативным фенотипом эмоциональной реакции на стресс.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Калинина Т.С. — экспериментальный дизайн, разработка модели, постановка задачи, написание текста, интерпретация результатов; Шимширт А.А. — разработка модели, выполнение экспериментов, статистическая обработка, интерпретация результатов, редакция текста; Лисицкая К.В. — экспериментальная работа, статистическая обработка, интерпретация результатов; Волкова А.В. — экспериментальная работа (опухоль, поведение); Кудряшов Н.В. — экспериментальная работа (поведение), статистическая обработка.

Conflict of interests. Kalinina TS — experimental design, model development, problem statement, text (original draft), interpretation of results; Shimshirt AA — model development, experiments, statistical processing, interpretation of results, text editing; Lisitskaya KV — experimental work, statistical processing, interpretation of results; Volkova AV — experiment performing (tumor, behavior); Kudryashov NV — experiment performing (behavior), statistical processing.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00298.

Financing. The investigation is supported by RFBR grant N 19-015-00298.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Калинина Татьяна Сергеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0178-3567>

д. б. н., в. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kalinina Tatiana S.

Corresponding author

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0178-3567>

Dr. Sci. (Biol.), Leading researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Шимширт Александр Александрович

e-mail: spring05-79@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3248>

к. б. н., н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Shimshirt Alexandr A.

e-mail: spring05-79@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3248>

PhD Biological Sci., Researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Лисицкая Ксения Валерьевна

e-mail: lisksenia@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3922-5253>

к. б. н., н. с. лаборатории биомедицинских исследований Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Lisitskaya Ksenia V.

e-mail: lisksenia@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3922-5253>

PhD Biological Sci., Researcher Laboratory of biomedical research Bach Institute of Biochemistry RAS FSI «Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Russia

Волкова Анна Валерьевна

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Volkova Anna V.

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

Researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кудряшов Никита Викторович

e-mail: kunvi@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1819-1867>

к. б. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Kudryashov Nikita V.

e-mail: kunvi@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1819-1867>

PhD Biological Sci., Senior researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia; FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uiversity), Moscow, Russia

Список литературы / References

- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global Cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):790–801. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- Mehnert A, Brahler E, Faller H, et al. Four-week prevalence of mental disorders in patients with cancer across major tumor entities. *J Clin Oncol*. 2014;32(31):3540–3546. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.0086.
- Prasad SM, Eggener SE, Lipsitz SR, Irwin MR, Ganz PA, Hu JU. Effect of depression on diagnosis, treatment, and mortality of men with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(23):2471–2478. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.1048
- Capo-Ramos DE, Gao Y, Check DP, Goldin LR et al. Mood disorders and risk of lung cancer in the EAGLE case-control study and in the U.S. veterans affairs inpatient cohort. *PLoS One*. 2012;7(8):e42945. DOI: 10.1371/journal.pone.0042945.
- Cole SW. Nervous system regulation of the cancer genome. *Brain Behav Immun*. 2013; 30 Suppl(Suppl):S10–8. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.11.008.
- Lutgendorf SK, Sood AK. Biobehavioral factor and cancer progression: physiological pathways and mechanisms. *Psychosom Med*. 2011;73(9):724–730. DOI: 10.1097/PSY.0b013e318235be76.
- Chen SH, Zhang BY, Zhou B, Zhu CZ, Sun LQ, Feng YJ. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am J Cancer Res*. 2019;9(1):1–21.
- Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science*. 2013;341(6142):1236361. DOI: 10.1126/science.1236361.
- Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7593–7603. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1164.
- Liebig C, Ayala G, Wilrs JA, Berger DH et al. Perineural invasion in cancer. *Cancer*. 2009;115(15):3379–33791. DOI: 10.1002/cncr.24396.
- Kowalski PJ, Paulino AF. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: Its causation/promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol*. 2002;33(9):933–936. DOI: 10.1053/hupa.2002.128249.
- Okada Y, Takeyama H, Sato M, Morikawa M et al. Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor(GDNF). *Int J Cancer*. 1999; 81(1):67–73. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990331)81:1<67::aid-ijc13>3.0.co;2-v
- Dewi TJ, Verhaagen J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol*. 2003;71(2-3):249–267. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2003.06.001.
- Laconi E et al. Early exposure to restraint stress enhances chemical carcinogenesis in rat liver. *Cancer Lett*. 2000;161(2):215–220. DOI: 10.1016/s0304-3835(00)00621-2.
- Melamed R, Rosenne E, Shakhar K, Schwartz Y, Abudarham N, Ben-Eliyahu S. Marginating pulmonary-NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a beta-adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor. *Brain Behav Immun*. 2005;19(2):114–126. DOI: 10.1016/j.bbi.2004.07.004.
- Dhabhar FS, McEwen BS. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol*. 1996;156(7):2608–2615.
- Kalinichenko VV, Mokyry MB, Graf LH Jr, Coh1991en RL, Chambers DA. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. *J Immunol*. 1999 Sep 1;163(5):2492–2499. PMID: 10452985.
- Andersen BL et al. Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(1):30–36. DOI: 10.1093/jnci/90.1.30
- Badino GR, Novelli A, Girardi C, Di Carlo F. Evidence for functional beta-adrenoceptor subtypes in CG-5 breast cancer cell. *Pharmacology Research*. 1996;33:255–260. DOI: 10.1006/phrs.1996.0036.
- Marchetti B, Spinola PG, Pelletier G, Labrie F. A potential role for catecholamines in the development and progression of carcinogen-induced mammary tumors: hormonal control of beta-adrenergic receptors and correlation with tumor growth. *Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;38(3):307–320. DOI: 10.1016/0960-0760(91)90102-b.
- Young StZ, Bordey A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:171–185. DOI: 10.1152/physiol.00002.2009.
- Sarrouihe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med*. 2015;15(1):62–77. DOI: 10.2174/1566524015666150114113411.
- Ortego A. A new role of GABA: inhibition of tumor cells migration. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(4):151–154. DOI: 10.1016/S0165-6147(03)00052-X.
- Iacovelli L, Arcella A, Battaglia G, Pazzaglia S, Aronica E, Spinsanti P, Caruso A, DeSmaele E, Saran A, GulinAo, D'Onofrio M, Giangaspero F, Nicoletti F. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas. *J Neurosci*. 2006;26(32):8388–8397. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2285-06.2006.
- Iqbal U, Nguyen PA, Syed-Abdul S, Yang HC, Huang CW, Jian WS, Hsu MH, Yen Y, Li YJ. Is long-term use of benzodiazepine a risk for cancer? *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(6):e483. DOI: 10.1097/MD.0000000000000483
- Wernli KJ, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Newcomb P. Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoeconom Drug Saf*. 2009;18(4):284–290. DOI: 10.1002/pds.1719.
- Varga B, Markó K, Hádinger N, Jelítai M, Demeter K, Tihanyi K, Vas A, Madarász E. Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci Lett*. 2009;462(3):257–262. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.06.051.
- Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci*. 2006;78(16):1777–1783. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.08.015.
- Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quintero-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli ML, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells *in vivo*. *Eur J Pharmacol*. 2009;626(2-3):131–138. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.09.036.
- Stepień H, Agro A, Padol I, Stanis A. Inhibitory effect of diazepam on human natural killer activity *in vitro*. *Cytobios*. 1994;77(310):131–136.
- Hardwick M, Fertikh D, Culty M, Li H, Vidic B, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res*. 1999;59(4):831–842.
- Ikezaki K, Black KL. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine. *Cancer Lett*. 1990;49(2):115–120. DOI: 10.1016/0304-3835(90)90146-o.
- Kletsas D, Li W, Han Z, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(10):1927–1932. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.01.021.
- Кудряшов Н.В., Наплёкова П.Л., Волкова А.В. и др. Влияние острого плавательного стресса на поведенческие и нейрохимические эффекты производного пирозоло [С] пиридина ГИЖ-72 и диазепаму у мышей BALB/c и C57BL/6. *Российский физиологический журнал им. Сеченова*. 2021;107(8):973–995. [Kudryashov NV, Naplekova PL, Volkova AV et al. The influence of acute swimming stress on the behavioral and neurochemical effects of pyrazole[C]pyridine derivative GIZH-72 and diazepam in BALB/C and C57BL/6 mice. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im I.M. Sechenova*. 2021;107(8):973–995. (In Russ).]. DOI: 10.31857/S0869813921080082.
- Amerio A, Gálvez JF, Odone A, Dalley AD, Ghaemi SN. Carcinogenicity of psychotropic drugs: A systematic review of US Food and Drug Administration—required preclinical *in vivo* studies. *Aust N Z J Psychiatry*. 2015;49(8):686–696. DOI: 10.1177/0004867415582231.