

ISSN 2587-7836 (print)  
ISSN 2686-8830 (online)

# ФАРМАКО КИШЕТИКА *и* ДИНАМИКА

*Включен в перечень рецензируемых  
научных журналов ВАК РФ*



№4.2024



## Главный редактор

**Жердев Владимир Павлович**

д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

## Зам. главного редактора

**Смирнов Валерий Валерьевич**

д. фарм. н., Москва

## Ответственный секретарь

**Литвин Александр Алексеевич**

д. б. н., Москва

## Редакционная коллегия

**Бондарева Ирина Борисовна**

д. б. н., Москва

**Воронина**

**Татьяна Александровна**

заслуженный деятель науки  
РФ, д. м. н., профессор, Москва

**Громова Ольга Алексеевна**

д. м. н., профессор, Москва

**Дорофеев Владимир Львович**

д. фарм. н., профессор, Москва

**Дурнев Андрей Дмитриевич**

член-корр. РАН, д. м. н.,  
профессор, Москва

**Ковалёв Георгий Иванович**

д. м. н., профессор, Москва

**Колик Лариса Геннадьевна**

д. б. н., профессор РАН, Москва

**Колыванов Геннадий**

**Борисович**, д. б. н., Москва

**Мирзоян Рубен Симонович**

заслуженный деятель науки  
РФ, д. м. н., профессор, Москва

**Мирошниченко Игорь Иванович**

д. м. н., Москва

**Рудакова Алла Всеволодовна**

д. фарм. н., профессор,  
Санкт-Петербург

**Раменская**

**Галина Владиславовна**

д. фарм. н., профессор, Москва

**Спасов Александр Алексеевич**

академик РАН, д. м. н.,  
профессор, Волгоград

**Стародубцев**

**Алексей Константинович**

д. м. н., профессор, Москва

**Сычёв Дмитрий Алексеевич**

академик РАН, д. м. н.,  
профессор, Москва

**Тюрников Иван Николаевич**

член-корр. РАН, д. м. н.,  
профессор, Волгоград  
д. б. н., профессор РАН, Москва

**Хохлов Александр Леонидович**

академик РАН, д. м. н.,  
профессор, Ярославль

## Выпускающая группа

**Белоусов Дмитрий Юрьевич**

Ответственный за выпуск журнала  
+ 7 (910) 449-22-73  
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева**

**Елена Владимировна**

Генеральный директор  
ООО «Издательство ОКИ»

подписка

+ 7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

**Жук Елена Владимировна**

Дизайн и верстка  
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 30.12.2024 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел./Факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

NEICON (лаборатория Elrub) — создание и поддержка сайта журнала www.pharmacokinetics.ru на платформе Elrub.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. ISSN 2587-7836. Журнал включен в перечень ВАК. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

## Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru  
www.ClinVest.ru  
www.MyRWD.ru  
www.Patient-Oriented.ru  
www.PharmacoGenetics-Pharmaco-Genomics.ru

## Журналы

Антибиотики и Химиотерапия  
Качественная клиническая практика  
Реальная клиническая практика: данные и доказательства  
Пациентоориентированная медицина и фармация  
Фармакогенетика и Фармакогеномика

## WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru  
www.izdat-oki.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований  
Издательство ОКИ

### ОБЗОРЫ

Димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF, потенциальный антидепрессант с новым механизмом действия

Гудашева Т. А., Поварнина П. Ю., Тарасюк А. В., Жердев В. П., Дурнев А. Д. .... 3

Экспериментальные модели старения

Гаранин А. А., Громова О. А., Богачева Т. Е. .... 17

### ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол): содержание в крови у крыс после внутривенного введения и химическая устойчивость

Александров В. А., Точильников Г. В., Шатик С. В., Стуков А. Н., Беляева О. А., Башкатова Е. В., Дранишников В. Г., Семиглазова Т. Ю. .... 22

### ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Прогностическое влияние клинических и генетических факторов на задержку элиминации метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом

Гурьева О. Д., Савельева М. И., Валиев Т. Т., Варфоломеева С. Р., Ильин М. В. .... 29

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Кардиотропные свойства соединения ZMEI-3 – потенциального ингибитора белков Ерас

Крыжановский С. А., Мокров Г. В., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Столярук В. Н., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Дурнев А. Д. .... 39

Гепатопротекторные эффекты аскорбата лития на модели неалкогольной жировой болезни печени с перегрузкой железом

Богачева Т. Е., Калачева А. Г., Громова О. А., Торшин И. Ю., Гришина Т. Р., Гаранин А. А. .... 49

Вовлечённость TRK-рецепторов в ноотропный эффект цикло-пролилглицина

Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. .... 55



## Chief editor

**Vladimir P. Zherdev**

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

## Deputy chief editor

**Valery V. Smirnov**

Ph.D., Moscow

## Executive secretary

**Alexander A. Litvin**

Ph.D., Moscow

## EDITORIAL BOARD

**Irina B. Bondareva**

Ph.D., Moscow

**Tatiana A. Voronina**

Honored Scientist RF, Ph.D.,  
Professor, Moscow

**Olga A. Gromova**

Ph.D., Professor, Ivanovo

**Vladimir L. Dorofeev**

Ph.D., Professor, Moscow

**Andrey D. Durnev**

Corresponding Member RAS,  
Ph.D., Professor, Moscow

**Georgiy I. Kovalev**

Ph.D., Professor, Moscow

**Larisa G. Colic**

Ph.D., Professor, Moscow

**Gennady B. Kolyvanov**

Ph.D., Moscow

**Ruben S. Mirzoyan**

Honored Scientist RF, Ph.D.,  
Professor, Moscow

**Igor I. Miroshnichenko**

Ph.D., Moscow

**Alla V. Rudakova**

Ph.D., Professor, St. Petersburg

**Galina V. Ramenskaya**

Ph.D., Professor, Moscow

**Alexander A. Spasov**

Academician RAS, Ph.D.,  
Professor, Moscow

**Alex K. Starodubtcev**

Ph.D., Professor, Moscow

**Dmitry A. Sychev**

Academician RAS,  
Ph.D., Professor, Moscow

**Ivan N. Tyurenkov**

Corresponding Member PAS,  
Ph.D., Professor, Volgograd

**Alexander L. Khokhlov**

Academician RAS, Ph.D.,  
Professor, Yaroslavl

## ISSUING GROUP

**Dmitry Yu. Belousov**

Managing Editor  
+ 7 (910) 449-22-73  
e-mail: clinvest@mail.ru

**Elena V. Afanaseva**

CEO in LLC «Publishing OKI»  
subscription  
+7(916)986-04-65  
e-mail: eva88@list.ru  
site: www.izdat-oki.ru

**Elena V. Zhuk**

Design and layout  
e-mail: elenazuk70@mail.ru

**Signed in print** 30.12.2024. **Circulation** 400 copies.

**Typography:** LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com  
115093, Moscow, Partiyinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

**Editorial address:** 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8 Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies  
Tel./Fax: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

NEICON (Elpub Lab) — www.pharmacokinetica.ru creation and support on the Elpub Platform.

The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. ISSN 2587-7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

## Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru  
www.ClinVest.ru  
www.MyRWD.ru  
www.Patient-Oriented.ru  
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

## Journals

Antibiotics and Chemotherapy  
Good Clinical Practice  
Real-World Data & Evidence  
Patient-Oriented Medicine and Pharmacy  
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

## WEB-portals

www.HealthEconomics.ru  
www.izdat-oki.ru

Center of Pharmacoeconomics Research  
Publisher OKI

## REVIEWS

- Dimeric dipeptide mimetic of the BDNF loop 4, a potential antidepressant with a novel mechanism of action  
*Gudasheva TA, Povarnina PYu, Tarasiuk AV, Zherdev VP, Durnev AD* ..... 3
- Experimental models of aging  
*Garanin AA, Gromova OA, Bogacheva TE* ..... 17

## EXPERIMENTAL PHARMACOKINETIC RESEARCHES

- 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlomisol): blood content in rats after intravenous administration and chemical resistance  
*Alexandrov VA, Tochilnikov GV, Shatik SV, Stukov AN, Beljaeva OA, Bashkatova EV, Dranishnikov VG, Semiglazova TYu* ..... 22

## CLINICAL PHARMACOKINETIC RESEARCHES

- Prognostic impact of clinical and genetic factors on delayed elimination of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia  
*Gurieva OD, Savelyeva MI, Valiev TT, Varfolomeeva SR, Ilyin MV* ..... 29

## PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

- The cardiotropic properties of ZMEI-3 compound — a potential inhibitor of Epac proteins  
*Kryzhanovskii SA, Mokrov GV, Tsorin IB, Ionova EO, Vititnova MB, Stolyaruk VN, Miroshkina IA, Sorokina AV, Durnev AD*..... 39
- Hepatoprotective effects of lithium ascorbate on a model of nonalcoholic fatty liver disease with iron overload  
*Bogacheva TE, Kalacheva AG, Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, Garanin AA*..... 49
- Involvement of TRK receptors in the nootropic effect of cyclopropylglycine  
*Vorontsova ON, Alyaeva AG, Koliashnikova KN, Povarnina PYu, Gudasheva TA, Dorofeev VL* ..... 55



# Димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF, потенциальный антидепрессант с новым механизмом действия

Гудашева Т. А., Поварнина П. Ю., Тарасюк А. В., Жердев В. П., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

## Аннотация

Представлен обзор собственных работ, посвящённых конструированию, синтезу и фармакологическому изучению оригинального димерного дипептидного миметика 4-й петли мозгового нейротрофического фактора гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-L-серил-L-лизина (ГСБ-106)). Это соединение было сконструировано с использованием авторской технологии создания низкомолекулярных миметиков нейротрофинов и проявило выраженную антидепрессантоподобную активность при системном введении, включая пероральное. Приводятся данные о фармакологических свойствах ГСБ-106 *in vitro* и *in vivo*, его механизме действия, о создании и изучении эффектов таблетированной лекарственной формы дипептида, о результатах токсикологических и фармакокинетических исследований.

**Ключевые слова:** мозговой нейротрофический фактор; BDNF; TrkB; дипептидный миметик; ГСБ-106; нейропротекторная активность; антидепрессантоподобная активность

## Для цитирования:

Гудашева Т. А., Поварнина П. Ю., Тарасюк А. В., Жердев В. П., Дурнев А. Д. Димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF, потенциальный антидепрессант с новым механизмом действия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):3–16. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-3-16>. EDN: KGXWCF

**Поступила:** 03.11.2024. **В доработанном виде:** 03.12.2024. **Принята к печати:** 17.12.2024. **Опубликована:** 30.12.2024.

## Dimeric dipeptide mimetics of BDNF loop 4 are potential antidepressants with novel mechanisms of action

Tatiana A. Gudashева, Polina Yu. Povarnina, Alexey V. Tarasyuk, Vladimir P. Zherdev, Andrei D. Durnev

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

This review covers original research focused on the design, synthesis, and pharmacological evaluation of an innovative dimeric dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) loop 4 bis-(*N*-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine) hexamethylenediamide (GSB-106). Developed using a proprietary approach for creating low-molecular-weight neurotrophin mimetics, GSB-106 displayed marked antidepressant-like activity following systemic and oral administration. The article details its pharmacological properties *in vitro* and *in vivo*, mechanism of action, development of a tablet form of the dipeptide, and findings from toxicological and pharmacokinetic studies.

**Keywords:** brain-derived neurotrophic factor; BDNF; TrkB; dipeptide mimetic; GSB-106; neuroprotective activity; antidepressant-like activity

## For citations:

Gudashева TA, Povarnina PYu, Tarasiuk AV, Zherdev VP, Durnev AD. Dimeric dipeptide mimetics of BDNF loop 4 are potential antidepressants with novel mechanisms of action. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):3–16. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-3-16>. EDN: KGXWCF

**Received:** 03.11.2024. **Revision received:** 03.12.2024. **Accepted:** 17.12.2024. **Published:** 30.12.2024.

## Введение / Introduction

По данным ВОЗ, 3,8 % населения земли (около 280 млн человек) страдают депрессией (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>). В настоящее время в фармакотерапии депрессии применяются моноаминергические препараты, такие как ингибиторы обратного захвата моноаминов (трициклические и тетрациклические антидепрессанты — amitриптилин, имипрамин, дезипрамин и др.), се-

лективные ингибиторы обратного захвата серотонина (пароксетин, флуоксетин, сертралин и др.), ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (например, венлафаксин и милнаципран), ингибиторы обратного захвата норадреналина и дофамина (бупропион). Эффекты моноаминергических антидепрессантов достигаются при их длительном применении (недели и месяцы), при этом около 30 % людей остаются резистентными [1]. Кроме того, эти препараты могут вызывать развитие серьёзных побоч-

ных эффектов, таких как сонливость или бессонница, мигрень, желудочно-кишечные расстройства, расстройства аппетита, половая дисфункция, повышение риска суицида [2, 3].

В настоящее время большое внимание уделяется быстродействующим антидепрессантам, антагонистам NMDA-рецепторов, из которых S-кетамин в виде назального спрея был одобрен FDA для клинического применения. Препараты этого класса эффективны даже в случае лекарственно-резистентной депрессии, однако на настоящий момент недостаточно данных об их долгосрочной эффективности и безопасности [4].

Во всём мире продолжают исследования по созданию новых антидепрессантов, превосходящих по эффективности и безопасности существующие препараты. Клинические исследования в качестве потенциальных антидепрессантов в настоящее время проходят моноаминергические препараты (например ингибитор обратного захвата серотонина, норадреналина и дофамина Ансофаксин), психоделики (псилоцибин), глутаматергические препараты (среди которых антагонист NMDA рецепторов AXS-05 и модулятор NMDA рецепторов тетрапептид Apimostinel), аналоги нейростероидов (аллопрегнонолон), модуляторы сестринов (активатор mTORC1 аналог лейцина NV-5138) и другие [5, 6].

Патогенез депрессии тесно связан с нейротрофическим BDNF (brain-derived neurotrophic factor, мозговой нейротрофический фактор) и его специфическими тирозинкиназными TrkB рецепторами. BDNF является одним из основных регуляторов нейропластичности мозга, в том числе в лимбических структурах, дегенеративные изменения в которых, в особенности гиппокампе и префронтальной коре, ассоциированы с депрессией [7]. Установлено, что BDNF играет центральную роль в регуляции гиппокампального нейрогенеза [8], одного из основных компонентов нейропластичности, а также стимулирует нейрогенез и в других областях мозга [9]. BDNF способствует поддержанию жизнеспособности серотонинергических нейронов, стимулирует синтез серотонина, регулирует серотониновую нейротрансмиссию [10].

Показано, что депрессия ассоциирована со снижением содержания BDNF в плазме крови, а лечение антидепрессантами приводит к его восстановлению [11, 12]. Сниженное содержание BDNF и TrkB рецепторов выявлено в префронтальной коре и гиппокампе у жертв суицида [13, 14]. Антидепрессантоподобные эффекты BDNF выявлены в большом количестве экспериментальных исследований, причём они проявляются даже при остром введении нейротрофина [15, 16]. Следует отметить, что эффекты классических антидепрессантов, а также кетамина, по крайней мере частично опосредованы активацией TrkB рецепторов. Так, трансгенные мыши с дефицитом TrkB в головном мозге нечувствительны к действию антидепрессантов [17, 18]. На примере ряда моноаминергических

антидепрессантов и кетамина установлено прямое связывание с трансмембранным доменом TrkB рецепторов, которое приводит к транслокации рецепторов из внутриклеточных депо на цитоплазматическую мембрану, где они становятся доступными для взаимодействия с BDNF [19].

В связи с вышеизложенным модуляция BDNF/TrkB сигналинга рассматривается как перспективная терапевтическая стратегия для лечения депрессии. Применение полноразмерного BDNF в клинике ограничено его быстрой биодegradацией, низкой способностью проникать через биологические барьеры и риском развития нежелательных побочных эффектов [20]. Так, клинические исследования BDNF как средства лечения бокового амиотрофического склероза были прекращены в связи с его недостаточной эффективностью в низких дозах и развитием побочных эффектов при повышении доз [21, 22].

Попытки создания фармакологически пригодных миметиков BDNF пептидной и непептидной природы предпринимаются рядом зарубежных исследовательских групп [23–25]. В одном из таких соединений агонист TrkB-рецепторов 7,8-дигидроксифлавонон продемонстрировал антидепрессантоподобную активность при системном введении в тестах и моделях на грызунах, не уступающую по выраженности активности кетамина [26, 27]. Антидепрессантоподобная активность была выявлена у положительных модуляторов TrkB рецепторов производных триазинтриона при подкожном введении в тесте вынужденного плавания на мышах [28].

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был предложен оригинальный подход для конструирования димерных дипептидных миметиков нейротрофинов, основанный на предположении, что основными фармакофорами при взаимодействии с Trk рецепторами являются наиболее экспонированные дипептидные фрагменты  $\beta$ -изгибов шпилькообразных петель нейротрофинов [29, 30]. С помощью этого подхода был получен миметик 4-й петли BDNF соединение ГСБ-106.

Данный обзор посвящён получению и изучению фармакологических эффектов ГСБ-106.

## Результаты и их обсуждение / Results and discussion

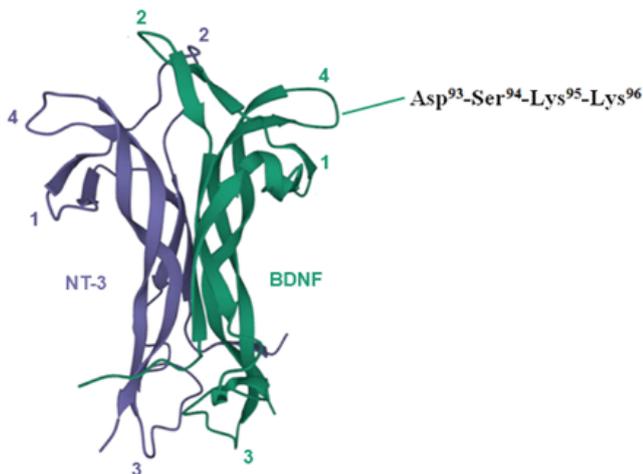
### Конструирование и синтез дипептида ГСБ-106 / Construction and synthesis of dipeptide GSB-106

Подобно другим членам нейротрофинового семейства, полипептид BDNF представляет собой симметричный гомодимер, мономерные единицы которого содержат 7 бета-тяжей, образующих три антипараллельных листа.  $\beta$ -тяжи связаны четырьмя экспонированными наружу нерегулярными участками, называемыми петлями, три из которых, петли 1

(остатки 28–36), 2 (43–49) и 4 (92–98), являются бета-поворотными, а 3-я петля (остатки 59–75) представляет собой серию из трёх последовательных изгибов, включающих обратный бета-поворот (остатки 72–75) [31].

Для конструирования миметика 4-й петли BDNF был применён оригинальный подход, апробированный в нашем Центре ранее при получении дипептидных миметиков фактора роста нервов [29] и состоящий в получении амидов N-ацилдипептидов, которые в растворе часто воспроизводят конформацию бета-изгиба, стабилизированную внутримолекулярной водородной связью.

В связи с отсутствием в литературе кристаллической структуры гомодимера BDNF при конструировании его миметиков мы основывались на кристаллической структуре гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd, рис. 1). Путём визуального анализа этой структуры нами было обнаружено, что наиболее экспонированным является бета-изгиб 4-й петли BDNF -Asp<sup>93</sup>-Ser<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-Lys<sup>96</sup>- и особенно его центральный фрагмент, предположительно занимающий геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение. Поэтому в качестве основы для моделирования была выбрана последовательность этого бета-изгиба, и его центральный фрагмент -Ser<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>- был полностью сохранён.



**Рис. 1.** Структура гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd) [31]

**Fig. 1.** Structure of the BDNF/NT-3 heterodimer (PDB ID: 1bnd) [31]

*Примечания:* указаны петли 1, 2, 4 нейротрофинов BDNF и NT-3, а также аминокислотная последовательность бета-изгиба 4-й петли BDNF.

*Notes:* the 1st, 2nd, and 4th loops of the BDNF and NT-3 neurotrophins are labeled, along with the amino acid sequence of the BDNF loop 4  $\beta$ -turn.

Предшествующий этому фрагменту аминокислотный остаток Asp заменяли его биоизоостером — остатком янтарной кислоты (HO-Suc-). Последующий за дипептидным фрагментом остаток заменяли амидной

группой. Цели эти двух замен — стабилизация конформации  $\beta$ -изгиба, увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз, а также удешевление синтеза.

Основываясь на данных о взаимодействии нейротрофина BDNF с TrkB-рецептором в гомодимерной форме, два миметика  $\beta$ -изгиба 4-й петли были соединены по С-концу гексаметилендиаминовым спейсером. Такая длина спейсера была выбрана на основе предыдущих исследований по димерным дипептидным миметикам NGF [32].

Таким образом был сконструирован димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)).

Дипептид ГСБ-106 был синтезирован четырьмя разными методами классического пептидного синтеза в растворе, из которых был выбран оптимальный [33].

Синтез методами I и II основывался на Boc/Z(Bzl) — стратегии защитных групп и включал 8 стадий: 1) и 2) получение активированных эфиров защищённых лизина и серина; 3) конденсация активированного эфира лизина с гексаметилендиамином; 4) удаление Boc-защитной группы; 5) конденсация полученного деблокированного продукта с активированным эфиром серина; 6) второй ацидолиз (Boc-деблокирование); 7) ацилирование янтарным ангидридом; 8) удаление бензильных защитных групп с боковых функциональных групп серина и лизина каталитическим гидрогенолизом. Методы отличаются используемыми активированными эфирами — N-гидроксисукцинимидными или пентафторфениловыми.

Синтез методами III и IV основывался на Z/Boc — стратегии защитных групп и включал 10 стадий. Метод III: 1) получение гидразида Z-серина; 2) получение азидо Z-серина; 3) получение N-оксисукцинимидного эфира Z-Lys(Boc)-OH; 4) его конденсация с гексаметилендиамином; 5) удаление Z-группы с остатка лизина каталитическим гидрогенолизом; 6) конденсация бис-лизина с азидом Z-серина; 7) второй гидрогенолиз, удаление Z-группы с серина; 8) ацилирование янтарным ангидридом; 9) удаление Boc-группы с NεH — групп лизина; 10) перевод соединения в бессолевую форму.

Синтез методом IV (рис. 2), также как и метод III, включал 10 стадий, однако есть отличия на стадиях 1, 2 и 6: 1) получение Z-защищённого серина; 2) получение пентафторфенилового эфира Z-защищённого серина; 6) его конденсация с бис-лизинном с образованием димерного дипептида.

Общий выход по методу I составил 21 %, по методу II — 29 % в расчёте на защищённый лизин после очистки ГСБ-106 кристаллизацией. К преимуществам синтеза способами I и II относится использование гидрогенолиза на финальной стадии, что позволяет получать ГСБ-106 сразу в виде цвиттер-иона без использования ионообменных смол.

Синтез азидным методом (III) позволяет использовать серин, не защищённый по боковой OH-группе.

Это важно, т. к. введение защиты в боковую группу серина является трудоёмкой операцией, что приводит к значительному росту стоимости синтеза ГСБ-106. На завершающей стадии синтеза методом III трифторацетат ГСБ-106 переводили в свободное основание с помощью анионообменной смолы Amberlite IRA-410 в ОН-форме, затем очищали на катионообменной смоле в градиенте пиридин-ацетатного буфера с последующей лиофилизацией. Общий выход синтеза этим методом составил 44 %.

В синтезе способом IV трудномасштабируемый азидный метод заменён на метод активированных пентафторфениловых эфиров. Известно, что для свободного по гидроксильной группе Z-Ser-ОН проблемным является получение его N-оксисукцинимидного эфира, выход реакции составляет ~20 %, в то время как Z-Ser-OPfp удаётся получить с выходом ~90 %. Поэтому для введения в структуру остатка серина был выбран метод пентафторфениловых эфиров. Общий выход ГСБ-106 по методу IV составляет 62 % без заметной рацемизации, как и при других методах. На основе метода IV (см. рис. 2) был разработан лабораторный регламент получения дипептида ГСБ-106.

ГСБ-106 синтезировали исходя из коммерчески доступных энантимерно чистых H-L-Ser-ОН и Z-L-Lys(Вос)-ОН. На первой стадии получали активированные эфиры защищённых аминокислот. Активированный N-оксисукцинимидный эфир Z/Вос-защищённого лизина (I) получали с выходом 90 %, используя дициклогексилкарбодимид (ДЦГК) и N-гидроксисукцинимид, синтез вели в этилацетате при + 8 °С – +10 °С. N-Карбобензоксизащищённый серин (II) получали взаимодействием N-бензилоксикарбонилсукцинимид (ZOSu) с серином в смеси ацетон–вода в соотношении 1:1 в присутствии бикарбоната натрия при температуре 20–22 °С. Активированный пентафторфениловый эфир Z-Ser-OPfp (III) получали с выходом 81 %, используя ДЦГК и пентафторфенол, проводя синтез в этилацетате при 0 °С – +5 °С. Конденсация Z-Lys(Вос)-OSu (I) с гексаметилендиамином в ДМФА при комнатной температуре приводила к бис-продукту (IV) с выходом 93 %, который затем Z-деблокировали в условиях каталитического гидрогенолиза (10 % Pd/C). Взаимодействием пентафторфенилового эфира (III) и бис-лизина (V) в ДМФА получали (Z-Ser-Lys(Вос)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (VI). Бис-дипептид (VI) подвергали каталитическому гидрогенолизу (10 % Pd/C), затем ацилировали янтарным ангидридом в ДМФА, получая N-моносукцинимильное производное бис-дипептида (VIII) с выходом 95 %. Кислотный ацидолиз (трифторуксусная кислота) соединения (VIII) приводил к дитрифторацетату (IX), который обрабатывали анионообменной смолой, очищали на катионной смоле в градиенте пиридин-ацетатного буфера. Продукт лиофилизировывали и обрабатывали этанолом. Общий выход ГСБ-106 составлял 62 % в расчёте на исходный защищённый лизин.

Структура и диастереомерная чистота ГСБ-106 были подтверждены методами одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии. (М.м. (ГСБ-106) = 746,85, чистота = 96,4 % (ОФ ВЭЖХ), [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = –44,3° (c = 1; H<sub>2</sub>O), т.пл. = 153–161 °С (EtOH)) [33].

### Фармакологическое изучение субстанции ГСБ-106 *in vitro* / Pharmacological study of the substance GSB-106 *in vitro*

**Нейропротекторная активность.** Дипептид ГСБ-106 в концентрациях 10<sup>-5</sup>–10<sup>-8</sup> М в экспериментах защищал мышинные гиппокампальные нейроны линии HT-22 от окислительного стресса с максимальным эффектом ~50 % от эффекта BDNF в его оптимальной концентрации 10<sup>-9</sup> М (табл. 1) [34]. Нейропротекторный эффект дипептида был также выявлен на клетках HT-22 в условиях глутаматной токсичности и на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y в условиях 6-OHDA — индуцированной токсичности, при этом в обоих случаях дипептид в концентрации 10<sup>-7</sup> М проявлял такую же по выраженности активность, как и BDNF в концентрации 10<sup>-9</sup> М (см. табл. 1) [34].

Таблица 1

Нейропротекторная активность ГСБ-106 на клеточных моделях нейротоксичности [34]

Table 1

Neuroprotective activity of GSB-106 in cellular models of neurotoxicity [34]

Условия эксперимента		BDNF (10 <sup>-9</sup> М)	ГСБ-106			
Повреждающий агент	Клетки		10 <sup>-5</sup> М	10 <sup>-6</sup> М	10 <sup>-7</sup> М	10 <sup>-8</sup> М
		Активность (МТТ–тест), %				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HT-22	81*	–10	25*	24*	45*
Glu-ОН	HT-22	72*	53*	30*	96*	120*
6-гидроксидофамин	SH-SY5Y	76*	77*	80*	74*	27

Примечания: Активность вычисляли по следующей формуле:

$$A = \frac{D_{\text{эксп}} - D_{\text{повр}}}{D_{\text{контр}} - D_{\text{повр}}} \times 100 \%, \text{ где } D_{\text{эксп}} \text{ — оптическая плотность рас-}$$

твора в опыте,  $D_{\text{повр}}$  — оптическая плотность активного контроля (с повреждающим агентом),  $D_{\text{контр}}$  — оптическая плотность пассивного контроля (без повреждающего агента). \*  $p < 0,05$  по сравнению с активным контролем (t-критерий Стьюдента).

Notes: Activity was calculated using the following formula:  $A = (D_{\text{exp}} - D_{\text{pov}}) / (D_{\text{control}} - D_{\text{pov}}) \times 100 \%$ , where  $D_{\text{exp}}$  is the optical density of the solution in the experiment,  $D_{\text{pov}}$  is the optical density of the active control (with the damaging agent),  $D_{\text{control}}$  is the optical density of the passive control (without the damaging agent). \*  $p < 0.05$  compared to the active control (Student's t-test).

На клетках SH-SY5Y, культивируемых в бессывороточной среде, ГСБ-106 оказывал нейропротекторное действие в концентрациях 10<sup>-9</sup>–10<sup>-5</sup> М с максимальным эффектом 37 % от эффекта BDNF [35]. Методом Вестерн-блот анализа было установлено, что нейропротекторная активность ГСБ-106 ассоциирована,

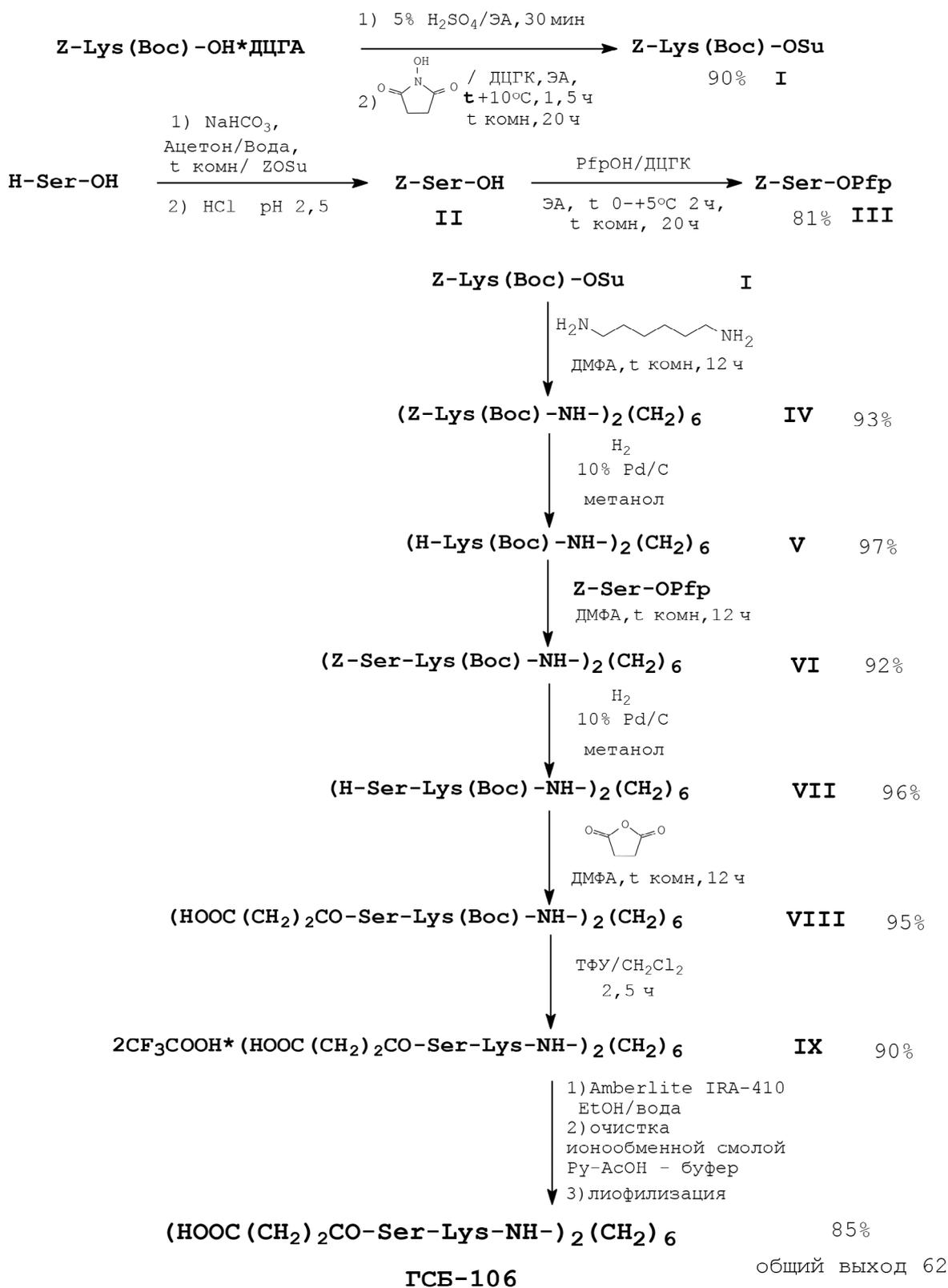


Рис. 2. Схема синтеза ГСБ-106 по Z/Boc — стратегии методом IV

Fig. 2. Synthesis scheme of GSB-106 using the Z/Boc strategy by the method IV

как и в случае BDNF, с TrkB-зависимыми антиапоптотическими механизмами, включая инактивацию про-апоптотического белка BAD ((Bcl-2 antagonist of cell death) и подавление активности GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), каспаз 9 и 3/7 [35].

**Молекулярный механизм действия.** На клетках линии HT-22 было установлено с помощью Вестерн-блот анализа, что ГСБ-106, подобно полноразмерному BDNF, активирует TrkB рецепторы и их основные пути трансдукции сигнала — PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$  [36, 37]. На клетках SH-SY5Y было показано, что ГСБ-106 способствует фосфорилированию TrkB рецепторов по тирозинам аутокаталитического домена (Tyr<sup>706/707</sup>), а также по тирозинам, ответственным за запуск основных пострецепторных сигнальных каскадов — PI3K/Akt, MAPK/ERK (Tyr<sup>515/516</sup>) и PLC- $\gamma$  (Tyr<sup>816</sup>) [35]. На тех же клетках, культивируемых в бессывороточной среде, было выявлено с помощью фармакологического ингибиторного анализа, что нейропротекторное действие ГСБ-106 обусловлено активацией Trk рецепторов и их PI3K/Akt и MAPK/ERK сигнальных путей [35]. Селективность взаимодействия ГСБ-106 с TrkB рецепторами была подтверждена с использованием клеток HT-22, нокаутных по генам *trka* или *trkb*: нейропротекторные эффекты дипептида в условиях окислительного стресса проявлялись только при наличии TrkB рецепторов [38]. Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что предварительная инкубация TrkB с ГСБ-106 приводила к статистически значимому снижению сигнала оптического биосенсора при взаимодействии BDNF с TrkB, что свидетельствует в пользу прямого связывания ГСБ-106 с рецептором [39].

#### Антидепрессантоподобная активность субстанции ГСБ-106 / Antidepressant-like activity of the substance GSB-106

Дипептид ГСБ-106 при остром внутрибрюшинном (в/б) введении проявлял антидепрессантоподобную активность в дозах 0,1 и 1 мг/кг в тесте вынужденного плавания на мышцах линии BALB/c с эффектом, составляющим около 30 % от эффекта трициклического антидепрессанта Имипрамина (25 мг/кг, в/б) [30]. На беспородных мышцах в тесте вынужденного плавания ГСБ-106 был активен в тех же дозах, но только при субхроническом введении [40]. Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 также была выявлена в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура на беспородных крысах (0,1 и 0,5 мг/кг, в/б, однократно) и в тесте подвешивания за хвост по Стеру на беспородных мышцах (1 и 1,5 мг/кг, в/б, субхронически) [40]. Важно, что ГСБ-106 сохранял активность в тесте вынужденного плавания при пероральном (п/о) (14 дней) введении крысам в дозах 0,5–5 мг/кг, при этом его эффект по выраженности был сравним с эффектом трицикли-

ческого антидепрессанта amitriptилина (10 мг/кг, п/о, 14 дней) [41].

Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 была подтверждена на модели хронического умеренного непредсказуемого стресса на мышцах BALB/c. Эта модель имеет высокую прогностическую (реакция на терапию антидепрессантами), доверительную (сходство с симптомами депрессии) и конструктивную (сходство с патофизиологическими механизмами депрессии) валидность [42]. Установлено, что ГСБ-106 при хроническом (26 дней) п/о введении (1 мг/кг) на фоне хронического (54 дня) стресса полностью противодействует развитию депрессивноподобного состояния в тесте вынужденного плавания [43].

#### Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 в лекарственном препарате / Antidepressant-like activity of GSB-106 in a medicinal product

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» разработан таблетированный лекарственный препарат ГСБ-106, содержащий на одну таблетку 0,001 г ГСБ-106 и вспомогательные вещества: микрокристаллическая целлюлоза (МСС 101) 0,033 г, лактозы моногидрат 0,06 г, KollicoatIR 0,005 г и магния стеарат 0,001 г [44].

В тесте вынужденного плавания на беспородных крысах ГСБ-106 в лекарственном препарате проявлял антидепрессантоподобную активность в дозах от 0,01 до 5 мг/кг [41]. Таким образом, лекарственный препарат активен в более чем на порядок низких дозах, чем субстанция в тех же условиях (табл. 2).

Эффекты лекарственного препарата ГСБ-106 были изучены на ряде моделей депрессивноподобного состояния на грызунах.

Модель хронического социального стресса считается наиболее близкой к человеческой патологии, поскольку стресс социальной этиологии — наиболее частый фактор развития депрессии у людей [45]. На модели 10-дневного социального стресса на мышцах C57Bl/6 дипептид ГСБ-106 при однократном п/о введении (0,1 мг/кг) после окончания стрессирования, как и препарат сравнения amitriptилин (10 мг/кг), полностью противодействовал проявлению агедонии в тесте предпочтения раствора сахара [45]. Этот эффект был выявлен и на модели более выраженного депрессивноподобного состояния, индуцированного 28-дневным социальным стрессом (мышцы C57Bl/6) при хроническом п/о введении ГСБ-106 (0,1 мг/кг, 21 день) после окончания стрессирования [47].

Модель депрессивноподобного состояния, вызванного введением индуктора воспаления липополисахарида (ЛПС), базируется на данных о важной роли процессов воспаления в патофизиологии депрессивных расстройств [48]. Введение ЛПС грызунам приводит к развитию агедонии, когнитивным нарушениям и угнетению двигательной активности [49–51].

Таблица 2

Антидепрессантоподобный эффект ГСБ-106 в таблетированном лекарственном препарате в сравнении с субстанцией и с препаратом амитриптилином в тесте вынужденного плавания на крысах

Table 2

Antidepressant-like effects of GSB-106 in tablet formulation compared to the substance and the drug amitriptyline in the forced swim test in rats

Группы крыс	Дозы, мг/кг (по активному веществу), 14 дней, внутрь	Время иммобильности, с	Активность, % 1
Субстанция ГСБ-106			
Эксперимент 1			
Контроль (вода)	–	177,9 ± 9,3	
Амитриптилин	5,0	134,3 ± 16,6#	24
ГСБ-106	0,1	184,8 ± 16,6	–4
	0,5	116,9 ± 21,6#	34
Эксперимент 2			
Контроль (вода)	–	199,2 ± 10,0	
ГСБ-106	1,0	163,2 ± 7,9#	18
Эксперимент 3			
Контроль (вода)	–	216,3 ± 13,8	
ГСБ-106	5,0	137,1 ± 12,3#	37
Эксперимент 4			
Контроль (вода)	–	190,8 ± 9,8	
ГСБ-106	10,0	202,2 ± 14,9	–6
Таблетки ГСБ-106			
Эксперимент 1			
Контроль (плацебо)	–	245,7 ± 13,4	
ГСБ-106	0,001	192,5 ± 13,2	22
	0,01	155,2 ± 20,3**	37
	0,1	134,9 ± 18,8***	45
	0,5	165,4 ± 15,1**	33
Эксперимент 1			
Контроль (плацебо)	–	201,2 ± 12,1	
ГСБ-106	1,0	159,9 ± 23,6	20
	5,0	92,8 ± 17,2***	54

*Примечания:* данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. <sup>1</sup>Активность рассчитывалась по формуле  $A \% = T_k - T_{\text{эксп}} / T_k \times 100 \%$ , где  $T_k$  — время иммобильности в контроле,  $T_{\text{эксп}}$  — время иммобильности в группах мышей, получавших ГСБ-106 или амитриптилин. # —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (U тест Манна–Уитни); \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем (однофакторный ANOVA, тест Даннета).  
*Notes:* The data are presented as means and standard errors of the mean. <sup>1</sup>Activity was calculated using the formula  $A \% = T_k - T_{\text{exp}} / T_k \times 100 \%$ , where  $T_k$  is the immobility time in the control,  $T_{\text{exp}}$  is the immobility time in the groups of mice treated with GSB-106 or Amitriptyline. # —  $p < 0.05$  compared to the control (Mann–Whitney U test); \*\*\* —  $p < 0.001$ ; \*\* —  $p < 0.01$  compared to the control (one-way ANOVA, Dunnett's test).

Было установлено, что ГСБ-106 при однократном п/о введении (0,5 мг/кг) мышам С57В1/6 через 24 ч после ЛПС противодействует проявлению агедонии, восстанавливая на 20 % предпочтение раствора сахара [52].

В качестве модели депрессивноподобного состояния также часто используется модель выученной беспомощности, обладающая хорошей прогностической и достоверной валидностью [53]. В условиях этой модели на беспородных крысах ГСБ-106 (0,5 мг/кг, п/о, 10 дней после моделирования депрессивноподобного состояния) полностью, до уровня контрольных животных, восстанавливал сниженное количество реакций избегания в тесте УРАИ и долю животных,

достигших критерия обученности [54]. Кроме того, ГСБ-106 полностью восстанавливал сниженные у группы активного контроля двигательную и исследовательскую активности в открытом поле [54].

#### Механизм антидепрессантоподобной активности ГСБ-106 / Mechanism of antidepressant-like activity of GSB-106

Установлено, что антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания не проявляется при введении блокаторов  $Trk$  рецепторов или одного из трёх основных пострецепторных сигнальных

путей этих рецепторов — PI3K/Akt, MAPK/ERK, PLC-γ [55]. Таким образом, антидепрессантоподобная активность дипептида опосредована активацией Trk рецепторов и всех их основных путей трансдукции сигнала.

На моделях депрессивноподобного состояния было показано, что поведенческие эффекты ГСБ-106 ассоциированы с его положительным влиянием на гиппокампальную нейропластичность, что хорошо известно для полноразмерного BDNF [56, 57]. Так, дипептид в условиях хронического социального стресса препятствовал снижению иммунореактивности к пресинаптическому белку синаптофизину, маркеру нейропластичности транскрипционному фактору CREB и его фосфорилированной форме — pCREB, а также BDNF в гиппокампе мышей [46, 47]. В условиях хронического непредсказуемого умеренного стресса ГСБ-106 противодействовал снижению иммунореактивности к BDNF и pTrkB в гиппокампе и префронтальной коре стрессированных мышей [43]. Для ГСБ-106 было выявлено и стимулирующее влияние на гиппокампальный нейрогенез на модели 5-дневного стресса на мышах, индуцированного контактом с хищником. В этих условиях ГСБ-106 полностью противодействовал ухудшению нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа по маркеру пролиферативной активности Ki-67 [58].

#### **Токсикологические исследования таблеток ГСБ-106 / Toxicological studies of GSB-106 tablets [59]**

При оценке острой токсичности на беспородных белых мышах и крысах обоего пола при п/о или в/б введении и использовании ГСБ-106 в максимально допустимых концентрациях и объёмах введения определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных.

Хроническая токсичность ГСБ-106 была изучена на беспородных крысах и кроликах породы Шиншилла при ежедневном п/о введении препарата в течение одного месяца в дозе, соответствующей терапевтической — 1 мг/кг и превышающей её в десять раз — 10 мг/кг (в пересчёте на активное вещество). Установлено, что ГСБ-106 не вызывает изменений общего состояния и внешнего вида экспериментальных животных, а также массы тела, не вызывает патологических изменений, регистрируемых по показателям электрокардиограммы, не влияет на артериальное давление, не вызывает значительных изменений ректальной температуры, не оказывает повреждающего действия на систему крови, не вызывает существенных изменений биохимических показателей сыворотки крови и физико-химических свойств мочи, не вызывает закономерных изменений строения внутренних органов, а также головного мозга, и не обладает местнораздражающим действием.

Изучение иммунотоксичности ГСБ-106 на мышах-гибридах F1 (СВА С57ВL/6) при его 14-дневном п/о

введении в дозах 2,2 и 22 мг/кг показало, что препарат не вызывает значимого изменения клеточности тимуса, селезёнки и подколенных лимфатических узлов, не стимулирует клеточный иммунитет по сравнению с контрольной группой.

Аллергенность препарата изучали на морских свинках-альбиносах. Показано, что в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, п/о, ГСБ-106 не вызывает системной реакции анафилаксии и реакции активной кожной анафилаксии. Иммунизация морских свинок ГСБ-106 в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, п/о в смеси с полным адьювантом Фрейда не выявила аллергических реакций замедленного типа.

На беспородных крысах-самцах было показано, что ГСБ-106 при хроническом п/о введении в дозах 1 и 10 мг/кг не вызывает тератогенных эффектов, эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периоде развития, а также не влияет на генеративную функцию животных.

На индикаторных штаммах *S.typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537 и на комбинации штаммов *E.coli* pKM101 и *uvrA*, в вариантах с метаболической активацией S9 и без таковой (тест Эймса) показано, что ГСБ-106 не проявляет мутагенной активности.

В цитогенетическом исследовании, проведённом на клетках костного мозга, не выявлена кластогенная активность ГСБ-106 при его однократном п/о введении в дозах 1 и 10 мг/кг самцам мышей F1 (СВАхС57ВL/6) и 5-кратном п/о введении в дозе 1 мг/кг самцам и самкам мышей F1 (СВАхС57ВL/6).

При п/о однократном введении ГСБ-106 в дозах 1 и 10 мг/кг не выявлена индукция повреждений ДНК в клетках костного мозга, печени, почек и селезёнки мышей F1 (СВАхС57ВL/6).

Совокупность результатов проведённых краткосрочных тестов указывает на отсутствие у ГСБ-106 генотоксической (мутагенной) и потенциальной канцерогенной активности.

Таким образом, ГСБ-106 является малотоксичным соединением, результаты исследования общей и специфических видов токсичности которого свидетельствуют об отсутствии эффектов, препятствующих проведению клинических исследований.

#### **Фармакокинетические исследования ГСБ-106 / Pharmacokinetic studies of GSB-106 [60]**

Было установлено, что после однократного п/о введения субстанции ГСБ-106 (150 мг/кг) вещество определяется в организме беспородных крыс на протяжении 4 ч. Период полувыведения ГСБ-106 из плазмы крови составил 0,65 ч. Показано, что ГСБ-106 проникает через гематоэнцефалический барьер и определяется в головном мозге. Тканевая доступность (отношение площадей под кривой концентрация—время для исследуемой ткани и плазмы крови) в мозге составила 0,05. Фармакокинетика ГСБ-106

была линейной в диапазоне доз 50,0–150,0 мг/кг. Абсолютная биодоступность составила 5,6 %, что говорит о потенциальной возможности разработки таблетированного лекарственного препарата. На кроликах породы Шиншилла было показано, что лекарственный препарат обладает в 1,6 раза более высокой относительной биодоступностью по сравнению с субстанцией [61].

### **Сопутствующие основному эффекту фармакологические свойства ГСБ-106 / Pharmacological properties of GSB-106 accompanying the main effect**

**Альгетическая активность [62].** В литературе описаны как про-, так и ноцицептивные эффекты экзогенного BDNF [63–66]. Вероятно, регистрируемые эффекты BDNF на болевую чувствительность зависят от дозы, пути введения и используемых поведенческих тестов [66].

Влияние ГСБ-106 на болевую чувствительность изучали при его остром в/б введении беспородным крысам-самцам в дозах 0,1 и 1 мг/кг в тестах «отдёргивание хвоста» и «горячая пластина». В тесте «отдёргивание хвоста» ГСБ-106 в дозе 0,1 мг/кг статистически значимо увеличивал болевой порог через 0,5; 1 и 24 ч, через 48 ч эффект дипептида пропадал. Максимум эффекта (144% по сравнению с контрольной группой) наблюдался через 24 ч после введения ГСБ-106. В дозе 1,0 мг/кг ГСБ-106 увеличивал болевой порог только через 0,5 ч после введения. В тесте «горячая пластина» увеличение латентного периода реакции под действием ГСБ-106 было выявлено только в дозе 1,0 мг/кг. Эффект проявлялся в широком временном диапазоне 0,5–48 ч, при этом наибольшая активность (149 % по сравнению с контрольной группой) была зарегистрирована через 1 ч после введения дипептида. Через 72 ч альгетический эффект ГСБ-106 не сохранялся.

**Мнемотропная активность.** Было установлено, что дипептид ГСБ-106, подобно BDNF [67, 68], обладает мнемотропной активностью. Так, 14-дневное введение ГСБ-106 крысам линии Wistar (0,1 мг/кг, в/б) статистически значимо улучшало долговременную память в тесте распознавания нового объекта [69]. Дипептид ГСБ-106 проявлял мнемотропную активность также в тесте УРПИ на беспородных крысах с амнезией, вызванной МЭШ. Введение дипептида в течение 5 дней до обучения УРПИ (1 мг/кг, в/б) противодействовало снижению латентного периода захода в тёмную камеру установки и снижению количества крыс, не зашедших в тёмную камеру, с терапевтическим эффектом в обоих случаях около 60 % [69].

**Эффекты ГСБ-106 в условиях экспериментального ишемического инсульта.** Согласно данным литературы, BDNF в условиях экспериментального инсульта оказывает выраженное нейропротекторное действие, стимулирует нейрогенеративные процессы и проти-

водействует развитию постинсультных когнитивных и психоэмоциональных нарушений [70–74].

Эффекты ГСБ-106 были изучены в условиях модели ишемического инсульта, индуцированного транзиторной (в течение 1 ч с последующей реперфузией) окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс. Выбор модели обусловлен тем, что она близка к клинической картине, поскольку инсульт происходит в большинстве случаев в бассейне средней мозговой артерии, является валидированной, хорошо изученной и позволяет получать воспроизводимую область инфаркта мозга [75, 76].

Показано, что на данной модели ГСБ-106 при 7-дневном введении (0,1 мг/кг, в/б, стартовое введение через 4 ч после ОСМА) беспородным крысам статистически значимо снижает объём инфаркта мозга примерно на 60% и улучшает неврологический статус по данным теста стимулирования конечностей и теста «Цилиндр» [77]. Установлено, что ГСБ-106 сохраняет активность (снижение объёма инфаркта мозга примерно на 20%) и при стартовом введении через 24 ч после моделирования ОСМА на крысах Wistar, когда зона инфаркта практически полностью сформирована [78] и восстановление может происходить только за счёт нейрогенеративных процессов. Нейрогенеративные свойства ГСБ-106 были подтверждены с помощью Вестерн-блот анализа: дипептид при 7-дневном введении крысам-Wistar после ОСМА (0,1 мг/кг, в/б) практически полностью противодействовал снижению нейрогенеза (по маркеру пролиферации Ki-67) в стриатуме и гиппокампе ишемизированного полушария и полностью противодействовал снижению иммунореактивности к синаптическим маркерам синаптофизину и PSD-95 в стриатуме [79].

Предполагают [80, 81], что гиппокампальный нейрогенез при острых нарушениях мозгового кровообращения может играть не только положительную роль. Было показано [82], что в условиях экспериментального инсульта около 5–10% новых нейронов, образовавшихся в зубчатой извилине, имеют аномальную морфологию, когда дендриты направлены в сторону хилуса и/или занимают эктопическое положение. Установлена связь между образованием aberrantных нейронов в гиппокампе при моделировании ишемического инсульта и когнитивными нарушениями [81, 83]. В связи с вышеизложенным было изучено иммуногистохимическим методом с использованием маркера незрелых нейронов даблкортина (Dcx) возможное влияние ГСБ-106 (0,1 мг/кг, в/б, 7 дней) на aberrantный гиппокампальный нейрогенез на модели ОСМА (крысы Wistar). Установлено, что ОСМА приводила к статистически значимому увеличению количества нейронов с аномальной морфологией в гиппокампе ишемизированного полушария по сравнению с группой «ложная операция», а также к увеличению количества эктопических нейронов в гиппокампе ишемизированного полушария по сравнению с интактным

полушарием. ГСБ-106 полностью противодействовал увеличению количества aberrантных нейронов (Гуляева Н.В. и др., неопубликованные данные).

В условиях экспериментальной постинсультной депрессии и деменции на модели ОСМА на крысах Wistar было установлено, что ГСБ-106 при хроническом введении (0,1 мг/кг, в/б, 21 день) полностью противодействует развитию депрессивноподобного состояния по данным теста вынужденного плавания, а также развитию нарушений кратковременной и долговременной памяти в тесте распознавания нового объекта [84].

### Заключение / Conclusions

Сконструирован и синтезирован димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF с лабораторным шифром ГСБ-106. Показано, что дипептид проявляет нейропротекторную активность в экспериментах *in vitro* в микро-наномолярных концентрациях и активирует специфические для полноразмерного нейротрофина TrkB рецепторы и их основные пострецепторные пути трансдукции сигнала — PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC-γ. Антидепрессантоподобная активность дипептида ГСБ-106 выявлена в батарее тестов и моделей на грызунах при в/б и п/о введении (в дозах 0,1–1,5 и 0,5–5 мг/кг, соответственно). Выявлены BDNF-ергические механизмы нейропро-

текторного и антидепрессантоподобного действия дипептида. Фармакокинетические исследования продемонстрировали, что ГСБ-106 проникает через гематоэнцефалический барьер и определяется в головном мозге. Абсолютная биодоступность составила 5,6 %, что говорит о потенциальной возможности разработки лекарственной формы для п/о применения. Создана таблетированная лекарственная форма ГСБ-106 и показано, что она обладает в 1,6 раза более высокой относительной биодоступностью по сравнению с субстанцией. Установлено, что ГСБ-106 в разработанной лекарственной форме проявляет антидепрессантоподобную активность в более низких дозах (от 0,01 мг/кг), чем в форме субстанции, что соответствует фармакокинетическим данным. Изучение общей и специфических видов токсичности ГСБ-106 в лекарственной форме показало, что препарат малотоксичен и не вызывает нежелательных эффектов, которые могли бы препятствовать клиническим исследованиям. Показано, что помимо антидепрессантоподобной активности, ГСБ-106 проявляет мнемотропные и анальгетические эффекты. В условиях экспериментального ишемического инсульта ГСБ-106 оказывает нейропротекторное и нейрогенеративное действие. Таким образом, ГСБ-106 перспективен в качестве потенциального лекарственного средства с BDNF-ергическим механизмом действия.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

#### Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

### ADDITIONAL INFORMATION

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

#### Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

#### Funding

The work was carried out without sponsorship.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Гудашева Татьяна Александровна** — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
**Автор, ответственный за переписку**  
e-mail: gudasheva@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
РИНЦ SPIN-код: 4970-0006

**Tatiana A. Gudasheva** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
**Corresponding author**  
e-mail: gudasheva@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
RSCI SPIN code: 4970-0006

**Поварнина Полина Юрьевна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

**Тарасюк Алексей Валерьевич** — к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>  
РИНЦ SPIN-код: 9670-2415

**Жердев Владимир Павлович** — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>  
РИНЦ SPIN-код: 2213-9592

**Дурнев Андрей Дмитриевич** — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0912-7684>  
РИНЦ SPIN-код: 8426-0380

**Polina Yu. Povarnina** — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

**Alexey V. Tarasyuk** — PhD, Cand. Sci. (Chemical), Senior Research Scientist of Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>  
RSCI SPIN code: 9670-2415

**Vladimir P. Zherdev** — PhD, Dr. Sci. (Med.), professor, Head of laboratory pharmacokinetics Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>  
RSCI SPIN code: 2213-9592

**Andrei D. Durnev** — PhD, Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0912-7684>  
RSCI SPIN code: 8426-0380

## Список литературы / References

- McIntyre RS, Alsuwaidan M, Baune BT, et al. Treatment-resistant depression: definition, prevalence, detection, management, and investigational interventions. *World Psychiatry*. 2023;22(3):394-412. doi: 10.1002/wps.21120.
- Li K, Zhou G, Xiao Y, et al. Risk of Suicidal Behaviors and Antidepressant Exposure Among Children and Adolescents: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Front Psychiatry*. 2022;13:880496. doi: 10.3389/fpsy.2022.880496.
- Wang SM, Han C, Bahk WM, et al. Addressing the Side Effects of Contemporary Antidepressant Drugs: A Comprehensive Review. *Chonnam Med J*. 2018;54(2):101-112. doi: 10.4068/cmj.2018.54.2.101.
- McIntyre RS, Rosenblat JD, Nemeroff CB, et al. Synthesizing the Evidence for Ketamine and Esketamine in Treatment-Resistant Depression: An International Expert Opinion on the Available Evidence and Implementation. *Am J Psychiatry*. 2021;178(5):383-399. doi: 10.1176/appi.ajp.2020.20081251.
- Sakurai H, Yonezawa K, Tani H, et al. Novel Antidepressants in the Pipeline (Phase II and III): A Systematic Review of the US Clinical Trials Registry. *Pharmacopsychiatry*. 2022;55(4):193-202. doi: 10.1055/a-1714-9097.

- Vasiliu O. Investigational Drugs for the Treatment of Depression (Part 1): Monoaminergic, Orexinergic, GABA-Ergic, and Anti-Inflammatory Agents. *Front Pharmacol*. 2022;13:884143. doi: 10.3389/fphar.2022.884143.
- Liu W, Ge T, Leng Y, et al. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*. 2017;2017:6871089. doi: 10.1155/2017/6871089.
- Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3650. doi: 10.3390/ijms19113650.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*. 2001;21(17):6706-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06706.2001.
- Correia AS, Cardoso A, Vale N. BDNF Unveiled: Exploring Its Role in Major Depression Disorder Serotonergic Imbalance and Associated Stress Conditions. *Pharmaceutics*. 2023;15(8):2081. doi: 10.3390/pharmaceutics15082081.

11. Polyakova M, Stuke K, Schuemberg K, et al. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis. *J Affect Disord*. 2015;174:432-40. doi: 10.1016/j.jad.2014.11.044.
12. Allen AP, Naughton M, Dowling J, et al. Serum BDNF as a peripheral biomarker of treatment-resistant depression and the rapid antidepressant response: A comparison of ketamine and ECT. *J Affect Disord*. 2015;186:306-11. doi: 10.1016/j.jad.2015.06.033.
13. Karege F, Vaudan G, Schwald M, et al. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;136(1-2):29-37. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.12.020.
14. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, et al. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11(8):1047-61. doi: 10.1017/S1461145708009000.
15. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002;22(8):3251-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-08-03251.2002.
16. Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res*. 2005;1037(1-2):204-8. doi: 10.1016/j.brainres.2005.01.007.
17. Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*. 2003;23(1):349-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-01-00349.2003.
18. Castrén E, Anttila H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol Psychiatry*. 2017;22(8):1085-1095. doi: 10.1038/mp.2017.61.
19. Casarotto PC, Giryh M, Fred SM, et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*. 2021;184(5):1299-1313.e19. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.034.
20. Miranda-Lourenço C, Ribeiro-Rodrigues L, Fonseca-Gomes J, et al. Challenges of BDNF-based therapies: From common to rare diseases. *Pharmacol Res*. 2020;162:105281. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105281.
21. Ochs G, Penn RD, York M, et al. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000;1(3):201-6. doi: 10.1080/14660820050515197.
22. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*. 1999;52(7):1427-33. doi: 10.1212/wnl.52.7.1427.
23. Gudasheva TA, Povarnina PY, Tarasiuk AV, Seredenin SB. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. *Med Res Rev*. 2021;41(5):2746-2774. doi: 10.1002/med.21721.
24. O'Leary PD, Hughes RA. Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25738-44. doi: 10.1074/jbc.M303209200.
25. Cerquone Perpetuini A, Mathoux J, Kennedy BN. The potential of small molecule brain-derived neurotrophic factor: mimetics to treat inherited retinal degeneration. *Neural Regen Res*. 2019;14(1):85-86. doi: 10.4103/1673-5374.243711.
26. Zhang JC, Yao W, Dong C, et al. Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(23):4325-35. doi: 10.1007/s00213-015-4062-3.
27. Zhang MW, Zhang SF, Li ZH, Han F. 7,8-Dihydroxyflavone reverses the depressive symptoms in mouse chronic mild stress. *Neurosci Lett*. 2016;635:33-38. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.035.
28. Madjid N, Lidell V, Nordvall G, et al. Antidepressant effects of novel positive allosteric modulators of Trk-receptor mediated signaling - a potential therapeutic concept? *Psychopharmacology (Berl)*. 2023;240(8):1789-1804. doi: 10.1007/s00213-023-06410-x.
29. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Доклады Академии Наук*. 2010;4(1):549-552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Dokl Biochem Biophys*. 2010 Sep-Oct;434:262-5. (In Eng.)]. doi: 10.1134/S160767291005011X.
30. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2012;38(3):280-290. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorg Khim*. 2012;38(3):280-90. (In Russ.)]. doi: 10.1134/s1068162012030053.
31. Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, et al. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci*. 1999;8(12):2589-97. doi: 10.1110/ps.8.12.2589.
32. Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Курилов Д.В., и др. Синтез и нейротропная активность in vitro аналогов димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 с разной длиной спейсера. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(6):3-10. [Tarasyuk AV, Sazonova NM, Kurilov DV, et al. Synthesis and in vitro neuroprotector activity of analogs of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor (GK-2) with various spacer lengths. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):3-10. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2019-53-6-3-10.
33. Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Курилов Д.В., Гудашева Т.А. Синтез димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106, потенциального нейротропного препарата. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(1):21-28. [Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, Kurilov DV, Gudasheva TA. Synthesis of BDNF dimeric dipeptide mimetic GSB-106 – a potential neuroprotector drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013;47(1):21-28. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2013-47-1-21-28.
34. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., и др. Нейротропные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;155(3):319-322. [Logvinov IO, Antipova TA, Gudasheva TA, et al. Neuroprotective properties of the dipeptide mimetic of brain neurotrophic factor GSB-106 in in vitro experiments. *Bull Exp Biol Med*. 2013;155(3):319-322. (In Russ.)].
35. Zainullina LF, Vakhitova YV, Lusta AY, et al. Dimeric mimetic of BDNF loop 4 promotes survival of serum-deprived cell through TrkB-dependent apoptosis suppression. *Sci Rep*. 2021;11(1):7781. doi: 10.1038/s41598-021-87435-0.
36. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов in vitro. *Доклады Академии Наук*. 2013;451(5):577-580. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. The dipeptide mimetic of the 4th loop of the brain neurotrophic factor GSB-106 activates TrkB, Erk, and Akt and promotes the survival of neurons in vitro. *Dokl Biochem Biophys*. 2013;451(5):577-580. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869565213240250.
37. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC-γ1. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2020;494(1):486-490. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC-γ1. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. doi: 10.31857/s2686738920050133.
38. Антипова Т.А., Логвинов И.О., Деев И.Е., и др. Фармакогенетический анализ взаимодействия низкомолекулярного миметика BDNF дипептида ГСБ-106 с Trk рецепторами. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2023;511:391-394. [Antipova TA, Logvinov IO, Deyev IE, et al. Pharmacogenetic analysis of the interaction of the low-molecular weight BDNF mimetic dipeptide GSB-106 with TRK receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2023;511:391-394. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738923600218.
39. Тарасюк А.В., Мезенцев Ю.В., Гнеденко О.В., и др. Исследование взаимодействия дипептидного миметика нейротрофина BDNF ГСБ-106 с тирозинкиназным рецептором TrkB с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2022;4:50-54. [Tarasyuk AV, Mезенцев YV, Gnedenko OV, Povarnina PYu, Ivanov AS. Study of the interaction of the GSB-106 BDNF neurotrophin dipeptide mimetic with the TrkB tyrosine kinase receptor using surface plasmon resonance technology. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):50-54. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2022-4-50-54.
40. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106. *Acta Naturae*. 2013;5(4(19)):116-120. [Seredenin SB, Voronina TA, Gudasheva TA, et al. Antidepressant effect of the original low molecular weight mimetic BDNF, dimeric dipeptide GSB-106. *Acta Naturae*. 2013;5(4(19)):116-120. (In Russ.)].
41. Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении. *Acta Naturae*. 2018;10(3(38)):88-91. [Povarnina PYu, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of brain neurotrophic factor has the properties of an antidepressant when administered orally. *Acta Naturae*. 2018;10(3(38)):88-91. (In Russ.)].

42. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2016;6:78-93. doi: 10.1016/j.nustr.2016.08.002.
43. Vakhitova YV, Kalinina TS, Zainullina LF, et al. Analysis of Antidepressant-like Effects and Action Mechanisms of GSB-106, a Small Molecule, Affecting the TrkB Signaling. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13381. doi: 10.3390/ijms222413381.
44. Патент РФ №2697254 С2, 2019. [RF Patent No.2697254 С2, 2019. (In Russ.)]. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/86/1f/3a/97015af4924703/RU2697254C1.pdf>. (дата обращения 23.10.2024).
45. Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J*. 2014;55(2):221-32. doi: 10.1093/ilar/ilu002.
46. Поварнина П.Ю., Таллерова А.В., Межлумян А.Г., и др. Антидепрессивная активность димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 при однократном пероральном введении на модели социального стресса у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(4):3-7. [Povarnina PYu, Tallerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Dimeric dipeptide BDNF mimetic GSB-106 exhibits antidepressant-like activity upon single oral administration in mice under social stress model conditions. *Ekspierimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2020;83(4):3-7. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-4-3-7.
47. Gudasheva TA, Tallerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Low-Molecular Weight BDNF Mimetic, Dimeric Dipeptide GSB-106, Reverses Depressive Symptoms in Mouse Chronic Social Defeat Stress. *Biomolecules*. 2021;11(2):252. doi: 10.3390/biom11020252.
48. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jan;16(1):22-34. doi: 10.1038/nri.2015.5.
49. O'Connor JC, Lawson MA, André C, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009;14(5):511-22. doi: 10.1038/sj.mp.4002148.
50. Remus JL, Dantzer R. Inflammation Models of Depression in Rodents: Relevance to Psychotropic Drug Discovery. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016 Sep 21;19(9):pyw028. doi: 10.1093/ijnp/pyw028.
51. Zhang JC, Wu J, Fujita Y, et al. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;18(4):pyu077. doi: 10.1093/ijnp/pyu077.
52. Таллерова А.В., Межлумян А.Г., Яркова М.А., и др. Эффекты оригинальных соединений ГСБ-106, ГМЛ-3 и ГЗК-111 на экспериментальной модели ангедонии, индуцированной липополисахаридом. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(2):3-7. [Tallerova AV, Mezhlumyan AG, Yarkova MA, et al. Effects of original compounds GSB-106, GML-3 and GZK-111 in experimental lipopolysaccharide-induced model of anhedonia. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021;55(2):3-7. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2021-55-2-3-7.
53. Song X, Vilares I. Assessing the relationship between the human learned helplessness depression model and anhedonia. *PLoS One*. 2021;16(3):e0249056. doi: 10.1371/journal.pone.0249056.
54. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Котельникова С.О., и др. Поведенческие эффекты димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 на модели депрессивно-подобного состояния у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;169(2):252-256. [Garibova TL, Kraïneva VA, Kotel'nikova SO, et al. Behavioral effects of the dimeric dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in a depressive-like state in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2020;169(2):252-256. (In Russ.)].
55. Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PY, et al. Antidepressant-like Effects of BDNF and NGF Individual Loop Dipeptide Mimetics Depend on the Signal Transmission Patterns Associated with Trk. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(3):284. doi: 10.3390/ph15030284.
56. Yang T, Nie Z, Shu H, et al. The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:82. doi: 10.3389/fncel.2020.00082.
57. Chakrapani S, Eskander N, De Los Santos LA, et al. Neuroplasticity and the Biological Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in the Pathophysiology and Management of Depression. *Cureus*. 2020;12(11):e11396. doi: 10.7759/cureus.11396.
58. Gudasheva TA, Povarnina PY, Seredenin SB. Dipeptide Mimetic of the Brain-derived Neurotrophic Factor Prevents Impairments of Neurogenesis in Stressed Mice. *Bull Exp Biol Med*. 2017;162(4):454-457. doi: 10.1007/s10517-017-3638-9.
59. Алексеева С.В., Сорокина А.В., Волкова А.В., и др. Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;2:46-49. [Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, et al. The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:46-50. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10047.
60. Жердев В.П., Кольванов Г.Б., Литвин А.А., и др. Фармакокинетика дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;1:37-43. [Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Pharmacokinetics of dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:37-43. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10038.
61. Кольванов Г.Б., Жердев В.П., Грибакина О.Г., и др. Сравнительная доклиническая фармакокинетика и биодоступность таблетированной лекарственной формы антидепрессанта ГСБ-106. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(5):577-580. [Kolyvanov GB, Zherdev VP, Gribakina OG, et al. Comparative preclinical pharmacokinetics and bioavailability of the pharmaceutical form of the antidepressant GSB-106. *Bull Exp Biol Med*. 2019;167(5):577-580. (In Russ.)].
62. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Тарасюк А.В., и др. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора обладает анальгетической активностью. *Доклады Академии Наук*. 2019;485(3):366-369. [Gudasheva TA, Konstantinopolsky MA, Tarasyuk AV, et al. The dipeptide mimetic of the 4th loop of the cerebral neurotrophic factor has analgesic activity. *Dokl Biochem Biophys*. 2019;485(3):366-369. (In Russ.)].
63. Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain*. 2002;100(1-2):171-81. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00264-6.
64. Marcos JL, Galleguillos D, Pelissier T, et al. Role of the spinal TrkB-NMDA receptor link in the BDNF-induced long-lasting mechanical hyperalgesia in the rat: A behavioural study. *Eur J Pain*. 2017;21(10):1688-1696. doi: 10.1002/ejp.1075.
65. Siuciak JA, Altar CA, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Brain Res*. 1994;633(1-2):326-30. doi: 10.1016/0006-8993(94)91556-3.
66. Merighi A, Salio C, Ghirri A, et al. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol*. 2008;85(3):297-317. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.04.004.
67. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(7):2711-6. doi: 10.1073/pnas.0711863105.
68. Bechara RG, Lyne R, Kelly ÁM. BDNF-stimulated intracellular signalling mechanisms underlie exercise-induced improvement in spatial memory in the male Wistar rat. *Behav Brain Res*. 2014;275:297-306. doi: 10.1016/j.bbr.2013.11.015.
69. Поварнина П.Ю., Никифоров Д.М., Котельникова С.О., и др. Ноотропная активность дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(1):16-22. [Povarnina PYu, Nikifiriv DM, Kotelnikova SO, et al. Seredenin S.B. Nootropic activity of brain-derived neurotrophic factor dipeptide mimetic GSB-106. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2020;23(1):16-22. (In Russ.)]. doi: 10.29296/25877313-2020-01-03
70. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007;38(7):2165-72. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.477331.
71. Jeong CH, Kim SM, Lim JY, et al. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model. *Biomed Res Int*. 2014;2014:129145. doi: 10.1155/2014/129145.
72. Chen HH, Zhang N, Li WY, et al. Overexpression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus protects against post-stroke depression. *Neural Regen Res*. 2015;10(9):1427-32. doi: 10.4103/1673-5374.165510.
73. Luo L, Li C, Du X, et al. Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke. *Behav Brain Res*. 2019;362:323-331. doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.037.
74. El-Tamawy MS, Abd-Allah F, Ahmed SM, et al. Aerobic exercises enhance cognitive functions and brain derived neurotrophic factor in ischemic stroke patients. *NeuroRehabilitation*. 2014;34(1):209-13. doi: 10.3233/NRE-131020.
75. Krafft PR, Bailey EL, Letic T, et al. Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke*. 2012;7(5):398-406. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x.
76. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3445-54. doi: 10.2147/DDDT.S56071.

77. Gudasheva TA, Povarnina P, Logvinov IO, et al. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3545-3553. doi: 10.2147/DDDT.S118768.
78. Back T, Schüler OG. The natural course of lesion development in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 2004;89:55-61. doi: 10.1007/978-3-7091-0603-7\_7. PMID: 15335101.
79. Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, et al. Neuroregenerative Activity of the Dipeptide Mimetic of Brain-derived Neurotrophic Factor GSB-106 Under Experimental Ischemic Stroke. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2021;20(10):954-962. doi: 10.2174/1871527320666210525090904.
80. Cuartero MI, García-Culebras A, Torres-López C, et al. Post-stroke Neurogenesis: Friend or Foe? *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:657846. doi: 10.3389/fcell.2021.657846.
81. Woitke F, Ceanga M, Rudolph M, et al. Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory. *PLoS One.* 2017;12(9):e0183463. doi: 10.1371/journal.pone.0183463.
82. Niv F, Keiner S, et al. Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke.* 2012;43(9):2468-75. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.660977.
83. Cuartero MI, de la Parra J, Pérez-Ruiz A, et al. Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1536-1550. doi: 10.1172/JCI120412.
84. Povarnina PY, Antipova TA, Logvinov IO, et al. Chronically Administered BDNF Dipeptide Mimetic GSB-106 Prevents the Depressive-like Behavior and Memory Impairments after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Curr Pharm Des.* 2023;29(2):126-132. doi: 10.2174/1381612829666230103161824.



# Экспериментальные модели старения

Гаранин А. А.<sup>1</sup>, Громова О. А.<sup>1,2</sup>, Богачева Т. Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Иваново, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН),  
Москва, Российская Федерация

## Аннотация

Старение — это результат сочетанных изменений во многих биологических процессах, которые связаны с нарушением функционального состояния у людей и повышают риск хронических патологий. Поскольку существует ряд непреодолимых трудностей в проведении клинических исследований на людях, приходится прибегать к экспериментальному моделированию ключевых признаков старения и связанных с ним патологий.

Однако все используемые модели старения далеко не совершенны, поскольку существует целый ряд факторов, которые не позволяют полностью сопоставить механизмы процесса старения у человека и животных. В этой статье приведены основные экспериментальные модели старения и определены их преимущества и недостатки в контексте потенциальных исследований.

**Ключевые слова:** старение; экспериментальные модели; возрастные патологии

## Для цитирования:

Гаранин А. А., Громова О. А., Богачева Т. Е. Экспериментальные модели старения. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):17–21. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-17-21>. EDN: VMQTRD

**Поступила:** 29.10.2024. **В доработанном виде:** 30.11.2024. **Принята к печати:** 15.12.2024. **Опубликована:** 30.12.2024.

## Experimental models of aging

Alexey A. Garanin<sup>1</sup>, Olga A. Gromova<sup>1,2</sup>, Tatiana E. Bogacheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ivanovo State Medical University of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal Research Center "Computer Science and Control", RAS, Moscow, Russian Federation

## Abstract

Aging is the result of combined changes in many biological processes that are associated with impaired functional status in humans and increase the risk of chronic pathologies. Since there are a number of insurmountable difficulties in conducting clinical studies on humans, it is necessary to resort to experimental modeling of key signs of aging and associated pathologies.

However, all the used models of aging are far from perfect, since there are a number of factors that do not allow a full comparison of the mechanisms of the aging process in humans and animals. This article presents the main experimental models of aging and determines their advantages and disadvantages in the context of potential studies.

**Keywords:** aging; experimental models; age-related pathologies

## For citations:

Garanin AA, Gromova OA, Bogacheva TE. Experimental models of aging. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):17–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-17-21>. EDN: VMQTRD

**Received:** 29.10.2024. **Revision received:** 30.11.2024. **Accepted:** 15.12.2024. **Published:** 30.12.2024.

## Введение / Introduction

Старение — это результат сочетанных изменений во многих биологических процессах, которые связаны с нарушением функционального состояния у людей и повышают риск хронических патологий (диабета, онкологических, дегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний). В ряде исследований были обозначены некоторые биологические процессы, которые приводят к старению: отсутствие протеостаза, нестабильность генома, укорочение теломер, нарушение восприятия питательных веществ, митохондриальные нарушения,

клеточное старение, нарушения в работе стволовых клеток и нарушение межклеточной коммуникации. Признаки старения были классифицированы по трём основным пунктам: возникает при нормальном старении; экспериментальная индукция увеличивает темпы старения; а экспериментальное подавление снижает темпы старения [1].

Большое количество упомянутых характеристик и их возможные взаимодействия затрудняют поиск механизмов, ответственных за старение, их изучение и, прежде всего, их предотвращение или подавление. Существует несколько факторов, усложняющих ис-

следования. Изучение процесса старения у людей сопряжено с рядом сложностей из-за продолжительности этого процесса, поэтому клинические исследования на людях имеют существенные недостатки. В первом случае приходится сталкиваться с трудностью поддержания оптимальной продолжительности исследования и его непрерывности. Во втором случае влияет значительное количество факторов, которые меняются с течением времени (социальные условия, питание, физическая активность и т. д.) [2]. Чтобы минимизировать влияние этих факторов на исследование, существует ряд экспериментальных моделей: системы *in vitro*, организмы беспозвоночных и позвоночных, а также лабораторные животные.

Однако исследования на экспериментальных моделях имеют ряд недостатков. Несмотря на то, что кривые продолжительности жизни имеют сходную форму для разных видов, они в большинстве случаев существенно различаются по интервалам [3]. Помимо этого, теоретические кривые объективно не способны продемонстрировать фактическое состояние здоровья [4] и степень взаимосвязи возраста с изменениями в конкретных тканях и органах. Так, в недавнем исследовании были показаны сложности изучения возрастной потери массы и функции скелетных мышц [5] и дегенеративных заболеваний [6] на моделях с использованием мышей, учитывая доказательства того, что эти два процесса старения значительно отличаются от таковых у людей.

Исходя из приведённого выше, исследования старения в приоритете должны проводиться на организмах, которые способны на самопроизвольное старение и которые могут быть изменены для индукции или подавления интересующих признаков.

### Экспериментальные модели *in vitro* / *In vitro experimental models*

**Органоиды, iPSC и клеточные линии / Organoids, iPSCs and cell lines.** Клеточные линии — это экспериментальная система, которая позволяет изучать механизмы жизнедеятельности клетки и изменять их *in vitro*. Существуют данные о том, что такие системы могут сталкиваться с двумя типами старения: репликативным [7] и старению по оксидативно-нитрозативному типу [8]. Поскольку в настоящее время ведутся активные исследования с изменением и настройкой всевозможных параметров для конкретных исследовательских моделей (изменения генома, условий культивирования и пр.), это делает возможным изучение различных клеточных механизмов, принимающих непосредственное участие в процессе старения [9].

Индуктированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) в настоящее время широко используют в исследованиях механизмов старения [10]. Существуют определённые сложности при создании подобных культур, однако они являются наиболее

предпочтительными, поскольку состоят фактически из модифицированных соматических клеток, которые в свою очередь можно получить от здоровых людей или людей с различными патологиями, в частности iPSC могут быть применены для лечения пациентов со склеротическими заболеваниями [10], болезнью Альцгеймера [11] и болезнью Паркинсона [12].

Тем не менее получение достоверных данных о старении и расширение понимания причин и механизмов старения организма в целом существенно лимитированы в связи с невозможностью изучения на моделях клеточных линий индуцированных старением изменений в тканях и органах. Однако всё ещё возможно получить необходимые данные путём использования органоидов, ассоциированных с конкретными исследуемыми объектами.

Так, органоиды уже используют в регенеративной медицине, а с недавнего времени существует большой потенциал использования органоидов в исследованиях механизмов старения [13], поскольку они обладают необходимыми для исследования молекулярными механизмами старения: гиперметилирование ДНК [14] и синтез интерстициального матрикса [15] с последующим гликированием.

**Дрожжи / Yeast.** Дрожжи используют в качестве модели старения с 1959 года [16]. Существуют исследования с целым рядом различных видов дрожжей, однако наиболее распространённый исследовательский штамм — *Saccharomyces cerevisiae*, геном которого полностью секвенирован [17]. Механизмы старения клетки этого микроорганизма с двухчасовым жизненным циклом развиваются и по репликативной, и по хронологической моделям [18, 19], опосредованные различными клеточно-молекулярными путями. Дальнейшее исследование привело к обнаружению генетически стойкой связи процессов метаболизма и старения, связанной с Sir-2 NAD-зависимой гистондеацетилазой.

Тем не менее несмотря на простоту культивирования и ряд других несомненных приоритетных особенностей моделирования процессов старения на штаммах одноклеточных организмов, всё ещё остаётся невозможным получение экспериментальных данных о механизмах старения конкретных тканей и органов в контексте организма человека. Однако данная экспериментальная модель подходит для доклинических исследований субстанций, предположительно индуцирующих или подавляющих старение.

### Экспериментальные модели беспозвоночных / *Experimental models of invertebrates*

***Caenorhabditis elegans*.** Среди беспозвоночных организмов одним из наиболее используемых в моделировании процессов старения является *Caenorhabditis elegans* [20] со средней длиной жизненного цикла в 15 суток и способностью адаптироваться к изменениям

факторов окружающей среды в виде состояния диапаузы. В таком состоянии замедляется метаболизм, процессы окисления и, соответственно, старение; а при выходе из него способны восстанавливать все свои функции и продолжать нормальную жизнедеятельность.

Преимуществом для моделирования старения на этом организме является наличие сходства с тканями и органами человека, в том числе и в выполняемых ими функциях. Так, было показано наличие совпадающих механизмов старения у человека и нематоды *C. elegans* по типу саркопении и нейродегенеративных изменений.

При этом данная модель далеко не совершенна для оценки взаимосвязи механизмов старения у исследуемого организма и человека вследствие эволюционных различий и радикальных различий в ключевых процессах жизнедеятельности.

**Drosophila melanogaster.** *Drosophila melanogaster* используют в качестве модели старения уже 107 лет, в течение этого периода было установлено, что продолжительность жизни этого организма зависит от количества и качества пищи, а также от температуры окружающей среды (~60 суток при нормальных условиях) [21]. Подобно *C. elegans*, способна входить в состояние диапаузы.

У *D. melanogaster* наблюдаются сходные с человеком механизмы старения как на уровне физиологии, так и на биохимическом уровне, в том числе происходит изменение метаболизма некоторых белков (гликирование) [22].

Основным преимуществом данной модели является возможность исследования генетических механизмов старения, поскольку за широкий период использования этого организма в качестве экспериментальной модели были полностью секвенированы его геном, более половины которого соотносится с генами млекопитающих [23].

Хотя подобные модели позволили достичь значительного расширения знаний о генетических механизмах старения, нельзя полностью игнорировать радикальные структурные различия *D. melanogaster* и млекопитающих, в частности человека. Из этого следует, что необходимы более совершенные модели для изучения.

#### Экспериментальные модели позвоночных / Experimental models of vertebrates

**Рыба/Fish.** Рыбу вида *Danio rerio* с циклом жизни от двух до трёх лет в основном используют в качестве экспериментальной модели функционального и физиологического старения [24].

Основное преимущество данной модели, как и в случае с *D. melanogaster* — возможность исследования генетических механизмов старения вследствие своего консервативного и легко изменяемого в экспериментальных условиях генома. В частности, в настоящее время активно проводят исследования, связанные с различными нейродегенеративными патологиями [25].

**Грызуны / Rodents.** Несмотря на то, что экспериментальных моделей грызунов достаточно большое количество, включающее различные виды лабораторных животных, предпочтение отдаётся моделированию на крысах и мышах [26].

Причиной этому послужило создание стандартизированных линий этих животных с модифицированным геномом, в том числе для изучения различных механизмов старения, связанных с нейродегенеративными патологиями и изменённым метаболизмом [27].

Цикл жизни мыши длится около трёх лет, при этом наблюдается достаточная степень физиологической схожести и схожести клеточных процессов с человеком для получения достоверных сведений [28].

При этом наблюдаются и значительные отличия в регуляции длины теломера, биосинтезе ДНК и иммунных процессах [29], а также в процессе метаболизма [30], что заставляет делать осторожные выводы при оценке экспериментальных данных, полученных на данной модели.

#### Выводы / Conclusions

Большинство экспериментальных моделей старения было создано с учётом наличия сходных механизмов старения и механизмов развития возрастных патологий у человека и животных, что позволяет получать достоверные данные при исследованиях как самих механизмов, так и субстанций, потенциально их подавляющих. При этом следует отметить, что несмотря на все преимущества экспериментального моделирования старения, существует целый ряд недостатков воспроизводимых моделей, связанных с наличием принципиальных различий в ключевых клеточных и генетических механизмах у человека и экспериментальных животных, которые накладывают ряд ограничений либо на планирование исследования, либо на уже полученные исследовательские данные, поэтому следует учитывать эти факторы и особенности при транслировании их на человека. Из этого следует, что поиск более совершенных экспериментальных моделей старения для получения достоверных данных изучения механизмов старения и скрининга лекарственных веществ — крайне перспективное направление дальнейших исследований.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Authors' participation

The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Гаранин Алексей Алексеевич** — ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: alexgaranin@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-6673-554X>

**Alexey A. Garanin** — Assistant Professor, Chair of Pharmacology of the FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

**Corresponding autor**

e-mail: alexgaranin@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-6673-554X>

**Громова Ольга Алексеевна** — д. м. н, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация; в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

РИНЦ SPIN-код: 6317-9833

**Olga A. Gromova** — Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Pharmacology FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation; Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>

RSCI SPIN code: 6317-9833

**Богачева Татьяна Евгеньевна** — к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

**Tatiana E. Bogacheva** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

## Список литературы / References

1. López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

2. Moffitt TE, Belsky DW, Danese A, et al. The Longitudinal Study of Aging in Human Young Adults: Knowledge Gaps and Research Agenda. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Feb;72(2):210-215. doi: 10.1093/gerona/glw191.

3. Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, de Cabo R. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annu Rev Anim Biosci*. 2015;3:283-303. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110829.

4. Hamczyk MR, Nevado RM, Baretino A, et al. Biological Versus Chronological Aging: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Mar 3;75(8):919-930. doi: 10.1016/j.jacc.2019.11.062.

5. Larsson L, Degens H, Li M, et al. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):427-511. doi: 10.1152/physrev.00061.2017.

6. Burns TC, Li MD, Mehta S, et al. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:101-17. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.021.

7. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

8. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 2000 Oct;35(8):927-45. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00180-7.

9. Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO. Aging cell culture: methods and observations. *Methods Mol Biol*. 2007;371:9-19. doi: 10.1007/978-1-59745-361-5\_2.

10. Liu GH, Ding Z, Izpisua Belmonte JC. iPSC technology to study human aging and aging-related disorders. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Dec;24(6):765-74. doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.014.

11. Machairaki V. Human Pluripotent Stem Cells as In Vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1195:93-94. doi: 10.1007/978-3-030-32633-3\_13.
12. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):691-705. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.006.
13. Hu JL, Todhunter ME, LaBarge MA, Gartner ZJ. Opportunities for organoids as new models of aging. *J Cell Biol.* 2018 Jan 2;217(1):39-50. doi: 10.1083/jcb.201709054.
14. Lewis SK, Nachun D, Martin MG, et al. DNA Methylation Analysis Validates Organoids as a Viable Model for Studying Human Intestinal Aging. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(3):527-541. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.11.013.
15. Birch HL. Extracellular Matrix and Ageing. *Subcell Biochem.* 2018;90:169-190. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0\_7.
16. Mortimer RK, Johnston JR. Life span of individual yeast cells. *Nature.* 1959 Jun 20;183(4677):1751-2. doi: 10.1038/1831751a0.
17. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science.* 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7. doi: 10.1126/science.274.5287.546.
18. Longo VD. Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol Aging.* 1999 Sep-Oct;20(5):479-86. doi: 10.1016/s0197-4580(99)00089-5.
19. Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* 2012 Jul 3;16(1):18-31. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.002.
20. Mack HID, Heimbucher T, Murphy CT. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2018;(27):3-13. doi: 10.1016/j.ddmod.2018.11.001.
21. Loeb J, Northrop JH. Is There a Temperature Coefficient for the Duration of Life? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1916 Aug;2(8):456-7. doi: 10.1073/pnas.2.8.456.
22. Jacobson J, Lambert AJ, Portero-Otín M, et al. Biomarkers of aging in *Drosophila*. *Aging Cell.* 2010 Aug;9(4):466-477. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00573.x.
23. Taormina G, Ferrante F, Vieni S, et al. Longevity: Lesson from Model Organisms. *Genes (Basel).* 2019 Jul 9;10(7):518. doi: 10.3390/genes10070518.
24. Gilbert MJ, Zerulla TC, Tierney KB. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. *Exp Gerontol.* 2014 Feb;50:106-13. doi: 10.1016/j.exger.2013.11.013.
25. Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 Aug;3(4):648-54. doi: 10.1016/0959-437x(93)90102-u.
26. Daya A, Donaka R, Karasik D. Zebrafish models of sarcopenia. *Dis Model Mech.* 2020 Mar 30;13(3):dmm042689. doi: 10.1242/dmm.042689.
27. Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *Age.* 2008;(30):111-119.
28. Yamaza H, Komatsu T, Chiba T, et al. A transgenic dwarf rat model as a tool for the study of calorie restriction and aging. *Exp Gerontol.* 2004 Feb;39(2):269-72. doi: 10.1016/j.exger.2003.11.001.
29. Ackert-Bicknell CL, Anderson LC, Sheehan S, et al. Aging Research Using Mouse Models. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2015 Jun 1;5(2):95-133. doi: 10.1002/9780470942390.mo140195.
30. Giacomello E, Crea E, Torelli L, et al. Age Dependent Modification of the Metabolic Profile of the Tibialis Anterior Muscle Fibers in C57BL/6J Mice. *Int J Mol Sci.* 2020 May 30;21(11):3923. doi: 10.3390/ijms21113923.



# 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол): содержание в крови у крыс после внутривенного введения и химическая устойчивость

Александров В. А.<sup>1</sup>, Точильников Г. В.<sup>1</sup>, Шатик С. В.<sup>2</sup>, Стуков А. Н.<sup>1</sup>, Беляева О. А.<sup>1</sup>,  
Башкатова Е. В.<sup>1</sup>, Дранишников В. Г.<sup>1</sup>, Семиглазова Т. Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Отечественное противоопухолевое соединение 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол) обладает высокой противоопухолевой активностью на широком спектре экспериментальных опухолей.

**Цель.** Изучить содержание хлонизола в крови у крыс в разные сроки после внутривенного введения и его химическую устойчивость в 0,9 % растворе натрия хлорида, моче и сыворотке крови.

**Методы.** Концентрацию хлонизола в различных средах определяли методом ВЭЖХ. В опытах *in vivo* на 10 крысах самцах с массой тела 180–200 г. концентрацию хлонизола определяли в крови у крыс через 2, 30, 60, 90 и 120 мин после его внутривенного введения в дозе 40 мг/кг. В опытах *in vitro* 0,1 % раствор хлонизола инкубировали при 37 °С в трёх средах: 0,9 % растворе натрия хлорида, сыворотке крови и моче. Через разные промежутки времени отбирали аликвоты и анализировали на содержание хлонизола. Устойчивость хлонизола оценивалась по отношению его концентрации до и после инкубации, выраженному в процентах.

**Результаты.** При внутривенном введении хлонизола в дозе 40 мг/кг крысам его полное исчезновение из крови наблюдалось в течение 2 часов. Время полувыведения составило 27 минут. Из трёх сред, изученных в опытах *in vitro*, хлонизол был наиболее устойчив в 0,9 % растворе натрия хлорида (89 % содержания от исходного уровня после 10 часов инкубации при 37 °С). Менее устойчив, но достаточно долго — в моче (60 % от исходного после 1 часа инкубации и 37 % после 2 часов). Наименьшая устойчивость хлонизола была в сыворотке крови (снижение концентрации до 11 % через 1 час и до 0 после 2 часов инкубации).

**Заключение.** Полученные результаты позволяют сделать предположения о возможных путях применения хлонизола. Высокая устойчивость хлонизола в 0,9 % растворе натрия хлорида позволит осуществлять его длительные капельные внутривенные инфузии, а также перфузионную интраартериальную химиотерапию. Сохранение концентрации хлонизола в моче на уровне 60 % от исходной в течение 1 часа позволит использовать внутрипузырные инстилляци хлонизола при поверхностном раке мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол; ВЭЖХ; содержание в сыворотке крови; устойчивость в различных средах

## Для цитирования:

Александров В. А., Точильников Г. В., Шатик С. В., Стуков А. Н., Беляева О. А., Башкатова Е. В., Дранишников В. Г., Семиглазова Т. Ю. 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол): содержание в крови у крыс после внутривенного введения и химическая устойчивость. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):22–28. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-22-28>. EDN: PSTLMB

Поступила: 06.11.2024. В доработанном виде: 07.12.2024. Принята к печати: 18.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

## 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol): blood content in rats after intravenous administration and chemical resistance

Valery A. Alexandrov<sup>1</sup>, Grigory V. Tochilnikov<sup>1</sup>, Sergey V. Shatik<sup>2</sup>, Alexander N. Stukov<sup>1</sup>, Olesya A. Beljaeva<sup>1</sup>, Elizaveta V. Bashkatova<sup>1</sup>,  
Vladislav G. Dranishnikov<sup>1</sup>, Tatiana Yu. Semiglazova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> NMIC of Oncology named after N.N. Petrov MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian Center of Radiology and Surgical Technologies named after Academician A.M. Granova MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation

## Abstract

**Background.** The domestic antitumor compound 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) has high antitumor activity on a wide range of experimental tumors.

**Goal.** To study the content of chlonisol in the blood of rats at different times after intravenous administration and its chemical stability in 0.9 % sodium chloride solution, urine and blood serum.

**Methods.** The concentration of chlonisol in various media was determined by HPLC. *In vivo* studies on 10 male rats with a body weight of 180–200 g. the concentration of chlonisol in the blood of rats was determined 2, 30, 60, 90 and 120 minutes after its intravenous administration at a dose of 40 mg/kg. In *in vitro* experiments, a 0.1 % solution of chlonisol was incubated at 37 °C in three media: 0.9 % sodium chloride solution, blood serum and urine. Aliquots were selected at different intervals and analyzed for the content of chlonisol. The stability of chlonisol was evaluated in relation to its concentration before and after incubation, expressed as a percentage.

**Results.** When chlonisol was administered intravenously at a dose of 40 mg/kg to rats, its complete disappearance from the blood was observed within 2 hours. The half-life was 27 minutes. Of the three media studied *in vitro* experiments, chlonisol was the most stable in 0.9 % sodium chloride solution

(89 % of the initial level after 10 hours of incubation at 37 °C). Less stable, but for a long time — in urine (60 % of the initial after 1 hour of incubation and 37 % after 2 hours). The lowest resistance of chlonisol was in the blood serum (a decrease in concentration to 11 % after 1 hour and to 0 after 2 hours of incubation).

**Conclusion.** The results obtained allow us to make assumptions about possible ways of using chlonisol: The high stability of chlonisol in 0.9 % sodium chloride solution will allow its long-term drip intravenous infusions, as well as perfusion intraarterial chemotherapy. Maintaining the concentration of chlonisol in urine at 60 % of the initial level for 1 hour will allow the use of intravesical instillations of chlonisol in superficial bladder cancer.

**Keywords:** 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol; HPLC; blood serum content; resistance in various environments

**For citations:**

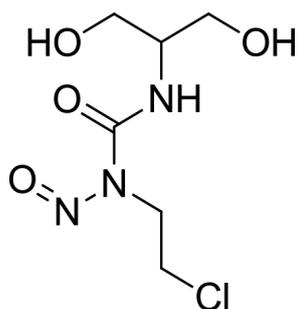
Alexandrov VA, Tochilnikov GV, Shatik SV, Stukov AN, Beljaeva OA, Bashkatova EV, Dranishnikov VG, Semiglazova TYu. 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol): blood content in rats after intravenous administration and chemical resistance. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):22–28. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-22-28>. EDN: PSTLMB

**Received:** 06.11.2024. **Revision received:** 07.12.2024. **Accepted:** 18.12.2024. **Published:** 30.12.2024.

**Введение / Introduction**

Отечественное противоопухолевое соединение 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол) относится к классу нитрозоалкилмочевин, являясь производным отдельной группы этого класса — алкилнитрозоуреидопропандиолов.

2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол — кристаллический порошок жёлтого цвета, хорошо растворимый в воде, в 95 % спирте, а также растворим в хлороформе, ацетоне, этилацетате. Температура плавления 91–92 °C. Молекулярная масса 225.63018 Da. Структурная формула этого соединения приводится на рис. 1. Индивидуальность полученного соединения доказана методом ВЭЖХ, строение — ЯМР 1H и масс-спектрами. Соединение зарегистрировано в НИИ по БИХС под номером 10181391 от 19.02.1991 и защищено патентами РФ № 2068843 и № 2678846. Разработан технологический метод синтеза хлонизола, позволяющий получать конечный продукт высокой степени очистки (98–99 %) [1].



**Рис. 1.** Структурная формула 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол)

**Fig. 1.** The structural formula is 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol)

2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол) характеризуется высокой противоопухолевой активностью на широком спектре перевиваемых опухолей [2], а также при спонтанных HER2-положительных опухолях молочной

железы у мышей FVB/N, трансгенных по онкогену HER2 [3]. Хлонизол проходит через гематоэнцефалический барьер и проявляет выраженный терапевтический эффект на моделях интракраниальных опухолей [4].

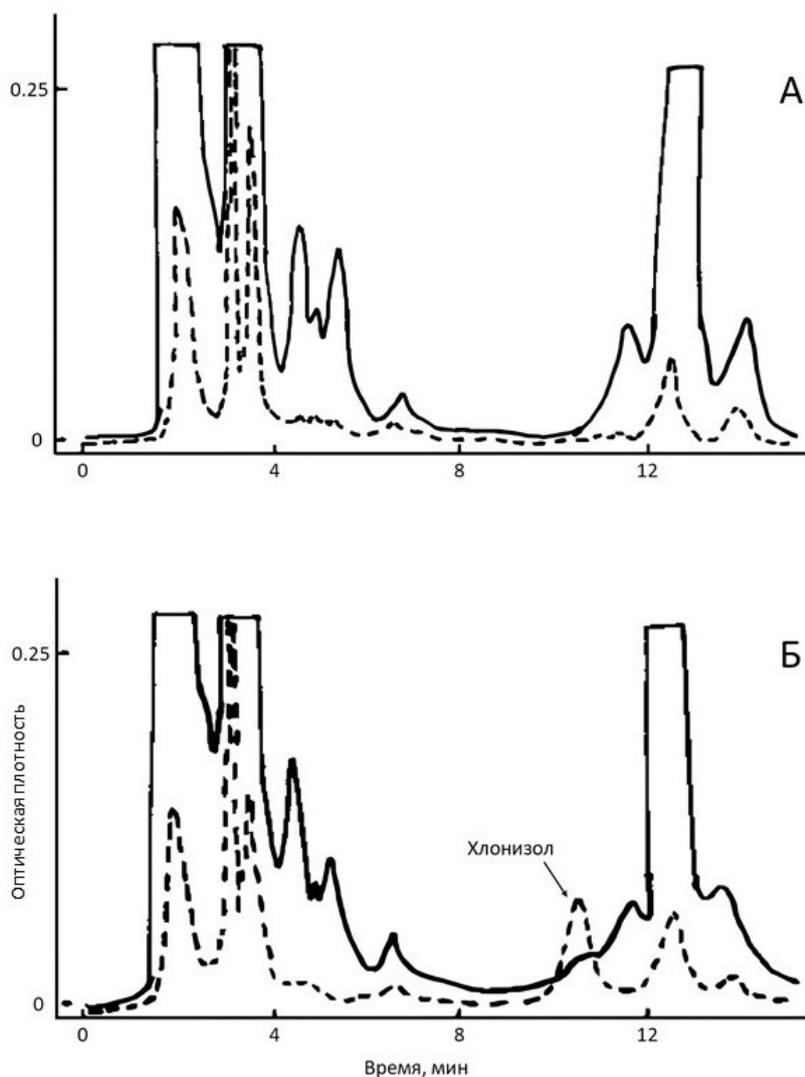
*Цель исследования:* изучить содержание хлонизола в крови у крыс в разные сроки после внутривенного введения и его химическую устойчивость в 0,9 % растворе натрия хлорида, моче и сыворотке крови.

**Материалы и методы / Materials and methods**

Исследование проводилось на 10 беспородных крысах самцах с массой тела 180–200 г. Все животные содержались при стандартных условиях (12 часов — свет, 12 часов — темнота, приточно-вытяжная вентиляция и температура 20–24 °C), получали стандартный комбинированный корм (ООО «Лабораторкорм», Россия) и питьевую воду *ad libitum*. Эксперименты на животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и Хельсинкской декларации, а также под контролем этического комитета «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова», Минздрава России, Санкт-Петербург.

Под наркозом животным делали разрез кожи в области шеи и обнажали яремную вену, из которой шприцом брали 0,3 мл крови до и после введения хлонизола через различное время. В вену вводили свежеприготовленный раствор хлонизола в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией 10 мг/мл в дозе 40 мг/кг. Через 2, 30, 60, 90 и 120 мин повторяли заборы крови по 0,3 мл. Пробы оставляли в ледяной бане на 20 мин, центрифугировали при 1000 г в течение 5 мин, сыворотку отбирали и хранили при –20 °C.

Для ВЭЖХ анализа отбирали 50 мкл сыворотки, добавляли 100 мкл ацетонитрила для осаждения белков и центрифугировали. Супернатант отбирали и высушивали под вакуумом, после чего растворяли в 50 мкл 50 мМ раствора однозамещённого фосфата натрия с рН 2,5.



**Рис. 2.** Хроматограммы 25 мкл сыворотки крови крысы при двух параметрах оптической плотности (200 нм — сплошная линия и 240 нм — пунктирная линия) до введения 1 мкг хлонизола (А) и после введения препарата (Б)

**Fig. 2.** Chromatograms of 25  $\mu$ l of rat blood serum at two optical density parameters (200 nm — solid line and 240 nm — dotted line) before administration of 1  $\mu$ g of chlonisol (A) and after administration of the drug (B)

Количественное определение хлонизола в сыворотке с помощью ВЭЖХ проводили на хроматографической установке, включавшей насосы высокого давления и программатор градиента хроматографа «Цвет 3110», кран-дозатор Rheodyne 7125, хроматографическую колонку 1 $\times$ 50 мм с сорбентом Сепарон С-18, 5 мкм, многоволновой спектрофотометрический детектор хроматографа «Миллихром-1», регистратор-интегратор на базе ДВК 2 м. Хроматографию осуществляли в градиентном режиме. Буфер А: 50 мМ однозамещённого фосфата натрия с рН 2,5, подкисленный фосфорной кислотой. Буфер Б: смесь 100 мМ раствора однозамещённого фосфата

натрия с рН 2,5 с ацетонитрилом (1:1), градиент от 5 до 50 % Б в А за 30 мин, скорость подачи 75 мкл/мин, объём пробы 25 мкл. Регистрацию проводили при двух длинах волн — 200 и 240 нм. О количестве хлонизола в пробе судили по высоте соответствующего пика при 240 нм.

Для изучения химической устойчивости хлонизола были приготовлены 0,1 % растворы этого соединения в следующих средах — 0,9 % растворе натрия хлорида, в сыворотке крови и моче. Эти пробы инкубировали при 37 °С. Через разные промежутки времени отбирали аликвоты и определяли содержание хлонизола в этих пробах. Устойчивость

хлонизола оценивалась по отношению его концентрации в данный момент времени по отношению к исходной концентрации, выраженному в процентах.

### Результаты и обсуждение / Results and discussion

В предварительных опытах были отработаны оптимальные условия забора и подготовки проб для хроматографического анализа, длин волн регистрации. Сравнение хроматограмм показало, что после внутривенного введения хлонизола выявляется пик с временем удерживания 10,638 мин (длина волны 240 нм), который соответствует параметрам пика хлонизола (рис. 2). Эти результаты легли в основу количественных расчётов содержания хлонизола в сыворотке крови в различное время после внутривенного введения препарата крысам в опытах *in vivo*, а также при изучении химической устойчивости хлонизола в опытах *in vitro*. В опытах *in vivo* выявлено, что при внутривенном введении хлонизола крысам в дозе 40 мг/кг время полувыведения составило 27 минут, а полное исчезновение препарата из крови происходит в течение 2 часов (табл. 1), которое вероятно связано как с депонированием в другие органы и ткани, так и с химической деградацией.

Таблица 1

Результаты изучения содержания хлонизола в сыворотке крови крысы после внутривенного введения препарата в дозе 40 мг/кг

Table 1

The results of studying the content of chlonisol in rat blood serum after intravenous administration of the drug at a dose of 40 mg/kg

Время после введения хлонизола, мин / Time after administration of chlonisol, min	Концентрация хлонизола в сыворотке крови / The concentration of chlonisol in the blood serum	
	мкг/мл / mcg/ml	% от максимума / % of the maximum
До введения	0	0
2	36	100
30	16	44
60	11	30
90	5,3	15
120	0	0

В опытах *in vitro* по сравнительному изучению химической устойчивости выявлено, что хлонизол имеет значительную устойчивость в 0,9 % растворе натрия хлорида. Даже после 10 часов инкубации при 37 °С содержание хлонизола в пробе сохраняется на уровне 89 % (табл. 2). Достаточно высока устойчивость хлонизола была и в моче: 60 % через 1 час инкубации и 37 % — через 2 часа (табл. 3). Менее всего хлонизол устойчив в сыворотке крови: через 1 час его уровень снижается до 11 %, а через 2 часа — до 0 (табл. 4).

Таблица 2

Результаты изучения химической устойчивости хлонизола в 0,9 % растворе натрия хлорида

Table 2

The results of studying the chemical stability of chlonisol in 0.9 % sodium chloride solution

Время инкубации хлонизола при 37 °С, ч / The incubation time of chlonisol at 37 °С, hour	Концентрация хлонизола / Concentration of chlonisol	
	мкг/мл / mcg/ml	% от максимума / % of the maximum
0	1	100
5	0,95	95
10	0,89	89

Таблица 3

Результаты изучения химической устойчивости хлонизола в моче

Table 3

The results of studying the chemical stability of chlonisol in urine

Время инкубации хлонизола при 37 °С, ч / The incubation time of chlonisol at 37 °С, hour	Концентрация хлонизола / Concentration of chlonisol	
	мкг/мл / mcg/ml	% от максимума / % of the maximum
0	1	100
1	0,6	60
2	0,37	37
3	0,175	17,5
4	0,103	10,3
5	0,028	2,8

Таблица 4

Результаты изучения химической устойчивости хлонизола в сыворотке крови

Table 4

The results of studying the chemical stability of chlonisol in blood serum

Время инкубации хлонизола при 37 °С, ч / The incubation time of chlonisol at 37 °С, hour	Концентрация хлонизола / Concentration of chlonisol	
	мкг/мл / mcg/ml	% от максимума / % of the maximum
0	1	100
0,5	0,32	32
1	0,11	11
1,5	0,03	3
2	0	0

### Заключение / Conclusion

При внутривенном введении хлонизола крысам в дозе 40 мг/кг его полное исчезновение из крови происходит в течение 2 часов. Из трёх изученных сред хлонизол наиболее устойчив в 0,9 % растворе натрия хлорида, менее — в моче и наименее — в сыворотке крови.

Полученные результаты позволяют сделать некоторые предположения о возможных путях примене-

ния хлонизола: 1) Высокая устойчивость хлонизола в 0,9 % растворе натрия хлорида позволит осуществлять его длительные капельные внутривенные инфузии, а также перфузионную интраартериальную химиотерапию. 2) Сохранение концентрации хлонизола в моче в течение 1 часа на уровне 60 % от исходного позволит использовать внутривезикулярные инстилляционные хлонизола при поверхностном раке мочевого пузыря.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией

#### Финансирование

Статья опубликована по результатам исследований, финансируемых по Госзаданию Минздрава Российской Федерации.

### ADDITIONAL INFORMATION

#### Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

#### Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

#### Funding

The article was published based on the results of research funded by the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Александров Валерий Анатольевич** — д. м. н., профессор, в. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
*Автор, ответственный за переписку*  
e-mail: alexandrov.valeri@yandex.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0019-2685>

**Точильников Григорий Викторович** — к. м. н., зав. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4232-8170>  
РИНЦ SPIN-код: 4366-6930

**Valery A. Alexandrov** — Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation

#### *Corresponding autor*

e-mail: alexandrov.valeri@yandex.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0019-2685>

**Grigory V. Tochilnikov** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Head of the Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4232-8170>  
RSCI SPIN code: 4366-6930

**Шатик Сергей Васильевич** — к. б. н., в. н. с. лаборатории радиофармацевтических технологий, зав. отделением циклотронных радиофармпрепаратов ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1718-9335>

**Стуков Александр Николаевич** — д. м. н., с. н. с. научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1741-6630>  
РИНЦ SPIN-код: 4652-8674

**Беляева Олеся Александровна** — к. б. н., с. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-2201-5796>

**Башкатова Елизавета Владимировна** — м. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0009-4728-6556>  
РИНЦ SPIN-код: 6152-7587

**Дранишников Владислав Георгиевич** — лаборант-исследователь научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, аспирант, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-5121-0561>  
РИНЦ SPIN-код: 7496-6734

**Семиглазова Татьяна Юрьевна** — д. м. н., профессор, в. н. с. научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации, заведующая научным отделом инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4305-6691>  
РИНЦ SPIN-код: 9773-3759

**Sergey V. Shatik** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher Laboratory of Radiopharmaceutical Technologies, Head of the Department of Cyclotron radiopharmaceuticals, Russian Center of Radiology and Surgical Technologies named after Academician A.M. Granova MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1718-9335>

**Alexander N. Stukov** — Dr. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Innovative methods of Therapeutic Oncology and Rehabilitation, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1741-6630>  
RSCI SPIN code: 4652-8674

**Olesya A. Beljaeva** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-2201-5796>

**Elizaveta V. Bashkatova** — Junior Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0009-4728-6556>  
RSCI SPIN code: 6152-7587

**Vladislav G. Dranishnikov** — Laboratory assistant Researcher at the Scientific Laboratory of Cancer Chemoprophylaxis and Oncopharmacology, postgraduate student, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-5121-0561>  
RSCI SPIN code: 7496-6734

**Tatiana Yu. Semiglazova** — Dr. Sci. (Med.), professor, Leading researcher, Scientific Department of Innovative methods of Therapeutic oncology and Rehabilitation, Head of the Scientific Department of Innovative methods of Therapeutic oncology and Rehabilitation, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4305-6691>  
RSCI SPIN code: 9773-3759

**Список литературы / References**

1. Стуков А.Н., Есиков К.А., Усманова Л.М. и др. Способ синтеза 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола, обладающего противоопухолевой активностью. Патент на изобретение RU 2678846 C1, 04.02.2019. Заявка № 2018140004 от 12.11.2018. [Stukov AN, Esikov KA, Usmanova LM, et al. Method of synthesis 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propane-diol owned with antitumor activity. RU 2678846 C1, 04.02.2019. Application No. 2018140004 12.11.2018. (In Russ.)].

2. Stukov AN, Esikov KA, Usmanova LM, et al. Synthesis and antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(6):579-581. doi: 10.1007/s11094-020-02242-7.

3. Александров В.А., Стуков А.И., Змитриченко Ю.Г., Точильников Г.В. Противоопухолевое действие 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) на рост спонтанных опухолей молочной железы у HER-2/neu трансгенных мышей. *Сибирский онкологический*

*журнал*. 2023;22(3):76-82 [Alexandrov VA, Stukov AN, Zmitrichenko YuG, Tochilnikov GV. The antitumor effect of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) on the growth of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Siberian journal of oncology*. 2023;22(3):76-82. (In Russ.)]. doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-3-76-82.

4. Муразов Я.Г., Стуков А.Н., Змитриченко Ю.Г., Точильников Г.В. Влияние отечественного противоопухолевого соединения из класса нитрозоалкилмочевин хлонизола на общую выживаемость лабораторных грызунов с интракраниальными опухолями: метаанализ результатов доклинических исследований. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022;5(2):45-51. [Murazov YaG, Stukov AN, Zmitrichenko IuG, Tochilnikov GV. The effect of the domestic antitumor compound chlonisol from the class of nitrosoalkylureas on the overall survival of laboratory rodents with intracranial tumors: a meta-analysis of preclinical studies. *Laboratory Animals for Science*. 2022;5(2):45-51. (In Russ.)]. doi: 10.29296/2618723X-2022-02-05.



# Прогностическое влияние клинических и генетических факторов на задержку элиминации метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом

Гурьева О. Д.<sup>1</sup>, Савельева М. И.<sup>2</sup>, Валиев Т. Т.<sup>1,3</sup>, Варфоломеева С. Р.<sup>1</sup>, Ильин М. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Метотрексат (MTX), вводимый в высоких дозах (1000–5000 мг/м<sup>2</sup>), занимает одно из ведущих мест в современных программах терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Благодаря этому препарату, включённому в схемы риск-адаптированной полихимиотерапии, удалось достичь высоких показателей многолетней выживаемости детей с ОЛЛ. Но не менее важной проблемой остаётся токсичность проводимого лечения и прогнозирование его эффективности и безопасности, в связи с чем возрастает роль фармакогенетических исследований в выявлении полиморфизмов в генах-кандидатах, влияющих на фармакокинетику MTX.

**Цель исследования.** Определить предикторы задержки элиминации метотрексата с использованием фармакогенетических биомаркеров у детей с острым лимфобластным лейкозом.

**Материалы и методы.** Проведён проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного (когортного) одноцентрового исследования. В исследование включены 124 ребёнка с диагнозом ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-IC BFM 2009 с включением высокодозного MTX. Для исследования полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* использован метод ПЦР в режиме реального времени. Материал исследования — периферическая кровь. Статистический анализ влияния фармакогенетических биомаркеров на токсичность и эффективность терапии проводился с использованием программы SPSS Statistics 26.0 (США). Для формирования математических прогностических моделей применялся метод построения логистической функции с помощью бинарной логистической регрессии с пошаговым отбором факторов и проведением, при необходимости, дополнительного построения ROC-кривых с последующим ROC-анализом. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ ; при  $p \geq 0,05$  различия считали маловероятными и статистически недостоверными.

**Результаты.** По результатам проведённого комплексного анализа эффективности и безопасности терапии высокодозным MTX разработана достоверная ( $p < 0,001$ ) прогностическая модель с высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью (>70 % соответственно), демонстрирующая взаимосвязи клинических и генетических факторов, влияющих на задержку элиминации MTX у детей с ОЛЛ, что подтверждает необходимость внедрения фармакогенетического тестирования в реальную клиническую практику.

**Заключение.** Определение полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм цитостатиков необходимо использовать в практической работе онкогематологических клиник для индивидуализации терапии и обеспечения её безопасности.

**Ключевые слова:** прогнозирование безопасности; полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1*; метотрексат; фармакокинетика; острый лимфобластный лейкоз; дети

## Для цитирования:

Гурьева О. Д., Савельева М. И., Валиев Т. Т., Варфоломеева С. Р., Ильин М. В. Прогностическое влияние клинических и генетических факторов на задержку элиминации метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):29–38. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-29-38>. EDN: ZALQMG

Поступила: 29.10.2024. В доработанном виде: 29.11.2024. Принята к печати: 07.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

## Prognostic impact of clinical and genetic factors on delayed elimination of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia

Oksana D. Gurieva<sup>1</sup>, Marina I. Savelyeva<sup>2</sup>, Timur T. Valiev<sup>1</sup>, Svetlana R. Varfolomeeva<sup>1</sup>, Mikhail V. Ilyin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Background.** Methotrexate (MTX) in high doses (1000–5000 mg/m<sup>2</sup>), occupies one of the leading places in modern programs of therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. Achievement of high long-term survival rates in children with ALL has become possible thanks to this drug. However, no less important problem is the toxicity of the treatment and prediction of its efficacy and safety, in this regard, the role of pharmacogenetic studies in the identification of polymorphisms in candidate genes affecting the pharmacokinetics of MTX is increasing.

**Objective.** To determine predictors of delayed elimination of methotrexate using pharmacokinetic biomarkers in children with acute lymphoblastic leukemia.

**Materials and methods.** We prospectively analyzed the database of pediatric patients with ALL within the framework of an observational (cohort) single-center study. The study included 124 children diagnosed with ALL who received therapy according to the ALL-IC BFM 2009 protocol including high-dosed MTX. Real-time PCR method was used to study polymorphisms of *ABCB1* and *SLCO1B1* genes. The study material was peripheral blood. Statistical analysis of

pharmacogenetic biomarkers influence on toxicity and efficacy of therapy was performed using SPSS Statistics 26.0 program (USA). To form mathematical prognostic models, we used the method of logistic function construction using binary logistic regression with step-by-step selection of factors and, if necessary, additional construction of ROC-curves with subsequent ROC-analysis. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ ; at  $p \geq 0.05$ , differences were considered unlikely and statistically insignificant.

**Results.** Based on the results of the conducted complex analysis of efficacy and safety of high-dosed MTX therapy, a reliable ( $p < 0.001$ ) prognostic model with high sensitivity, specificity and efficacy ( $>70\%$ , respectively) was developed, demonstrating the interrelationships of clinical and genetic factors influencing the delay of MTX elimination in children with ALL, which confirms the necessity of implementing pharmacogenetic testing in real clinical practice.

**Conclusion.** Determination of polymorphisms of genes providing transport and metabolism of cytostatics should be used in practical work of oncohematological clinics for individualization of therapy and ensuring its safety.

**Keywords:** safety prediction; polymorphisms of *ABCB1* and *SLCO1B1* genes; methotrexate; pharmacokinetics; acute lymphoblastic leukemia; children

#### For citations:

Gurieva OD, Savelyeva MI, Valiev TT, Varfolomeeva SR, Ilyin MV. Prognostic impact of clinical and genetic factors on delayed elimination of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):29–38. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-29-38>. EDN: ZALQMG

**Received:** 29.10.2024. **Revision received:** 29.11.2024. **Accepted:** 07.12.2024. **Published:** 30.12.2024.

## Введение / Introduction

Высокие показатели выживаемости больных впервые диагностированным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и неходжкинскими лимфомами удалось достичь благодаря разработке риск-адаптированных программ, включающих прогностические факторы, определяющие эффективность терапии и риск развития рецидива. Подобный подход позволяет проводить оптимальное по интенсивности лечение, при котором 10-летняя общая выживаемость составляет 90,7 % [1, 2]. Тем не менее, пациенты по-прежнему страдают от токсических эффектов, вызванных лекарственными средствами, что в ряде случаев требует редукции дозы или прекращения введения цитотоксических препаратов, что способствует снижению общей эффективности терапии [3, 4].

Исследователи Evans WE, Crews KR (2004 и 2020 гг.) отметили значительную межиндивидуальную вариабельность токсичности лекарственных средств и исходов заболевания, в связи с чем роль фармакогенетики (ФГ) в выявлении генетических полиморфизмов генов-кандидатов для оптимизации терапевтических подходов весьма высока [5, 6].

Одним из препаратов с известным и прогнозируемым профилем токсичности при лечении ОЛЛ является метотрексат (MTX) — ингибитор фолиевой кислоты, введённый в клиническую практику в 1950-х годах. Множество транспортёров и ферментов участвуют в метаболизме фолиевой кислоты, некоторые обеспечивают всасывание и транспорт MTX, что определяет его фармакокинетику. Активность белков-транспортёров оказывает влияние на концентрацию препарата в плазме крови и тканях, тем самым определяя лекарственную токсичность [7, 8].

Выявление полиморфизмов генов, кодирующих белки-переносчики MTX и ферменты его биотрансформации, позволяет прогнозировать риск MTX-индуцированной токсичности со стороны кожи и слизистых, печени, почек, нервной системы [9].

Переносчик органических анионов растворённого вещества 1B1 (SLCO1B1) — транспортёр MTX — расположен в основном на гепатоцитах человека. Два однонуклеотидных полиморфизма (SNP, single nucleotide polymorphism) *SLCO1B1*, rs11045879 и rs4149081 были связаны с клиренсом MTX и с тяжёлой гастроинтестинальной токсичностью во время проведения фазы консолидации при лечении ОЛЛ [10, 11]. Исследования других научных групп (*Schulte RR*, 2021; *Lopez-Lopez E*, 2013; *Treviño LR*, 2009) также подтвердили, что SNP коррелируют с результатами терапии [8, 12, 13]. *Radtke S с соавт.* показали, что вариант *SLCO1B1* rs4149056 в значительной степени связан с фармакокинетикой (ФК) MTX [10]. По результатам высокопроизводительного секвенирования экзонов *SLCO1B1* у детей с ОЛЛ, четыре общих гаплотипа *SLCO1B1* были связаны с самым низким клиренсом MTX [10]. Различные полиморфизмы в этом гене могут объяснить изменения клиренса высокодозного MTX у 10,7 % больных [8]. Следовательно, SNP в гене *SLCO1B1* являются важными детерминантами токсичности MTX, в особенности стоматита и мукозита [6]. Биодоступность MTX также зависит от генетических полиморфизмов переносчиков семейства ABC, которые транспортируют молекулы MTX из энтероцитов в просвет желудочно-кишечного тракта (кодируются генами *ABCC2*, *ABCB1*, *ABCG2*) и в кровь (кодируются генами *ABCC1* и *ABCC3*). Системное выведение MTX обеспечивается за счёт клубочковой фильтрации и активной секреции из клеток почечных канальцев [14, 15].

Все существующие протоколы терапии ОЛЛ предполагают расчёт дозы MTX, исходя из площади поверхности тела без учёта влияния генетических факторов. Поскольку клиренс препарата имеет большое значение для токсичности и исходов терапии, точное дозирование высокодозного (1000–5000 мг/м<sup>2</sup>) MTX (HD-MTX) у каждого пациента для достижения целевых ФК-параметров позволит получить максимальные терапевтические эффекты при минимизации токсичности. Для создания алгоритмов дозирования

препарата необходимы дополнительные данные о влиянии клинических и генетических факторов на клиренс HD-MTX [16].

Таким образом, определение полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм цитостатиков, то есть фармакогенетические аспекты токсичности, является многообещающим и динамично развивающимся направлением клинической онкологии. В связи с этим актуальным является выявление подобных ассоциаций у детей с ОЛЛ, что позволит установить связь эффективности и безопасности MTX с его фармакогенетическими особенностями и выявить факторы риска, позволяющие прогнозировать ответ на терапию и тяжесть токсических явлений за счёт оценки влияния на фармакокинетику MTX при лечении ОЛЛ.

### Цель исследования / Objective

Определить предикторы задержки элиминации метотрексата более 54 часов с использованием фармакогенетических биомаркеров у детей с острым лимфобластным лейкозом.

### Гипотеза / Hypothesis

Выраженность токсических нежелательных лекарственных реакций (НЛР) на метотрексат у детей с ОЛЛ зависит от фармакокинетики препарата.

### Материалы и методы / Materials and methods

Проведён проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного (когортного) одноцентрового исследования. В исследование включены 124 ребёнка с диагнозом ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-IC BFM 2009 с использованием HD-MTX. Для исследования полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* использован метод ПЦР в режиме реального времени. Материал исследования — периферическая кровь. Забор материала производился однократно независимо от сроков терапии метотрексатом. Критерии отбора SNPs: частота минорных аллелей >5 %, гены, соответствовавшие равновесию Харди–Вайнберга (HWE), и, наконец, уровень доказательности ранее опубликованных исследований.

В соответствии с протоколами терапии ОЛЛ, оптимальным временем экскреции MTX считается период до 54 ч от момента введения MTX, а безопасным уровнем — концентрация MTX в сыворотке крови менее 0,25 мкмоль/л. При достижении безопасного уровня в течение более продолжительного периода времени, элиминацию MTX следует считать замедленной.

Для статистической обработки результатов использовалась программа SPSS Statistics 26.0 (США). Расчёт объёма выборки производился по методу К.А. Отдельновой (исследование средней точности

при статистической мощности 80 %). Проверка нормальности распределения проводилась методом Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При нормальном распределении данных количественный показатель представлялся в виде средней арифметической ( $M$ ), со стандартным отклонением ( $\pm SD$ ) и 95 % доверительным интервалом (ДИ), а при ненормальном распределении — в виде медианы ( $Me$ ) с интерквартильным размахом (25–75 % Q). Межгрупповые различия оценивались при нормальном распределении при помощи  $t$ -критерия Стьюдента, а при ненормальном распределении — с помощью  $U$ -критерия Манна–Уитни. Сравнительный анализ независимых категориальных переменных использовался с применением  $\chi^2$  Пирсона либо точного теста Фишера. При парных сравнениях трёх и более групп между собой применялась поправка на множественность сравнений Бонферрони. Номинальный показатель представлялся абсолютным числом наблюдений, приведена процентная доля признака в подгруппах.

Для формирования математических прогностических моделей применялся метод построения логистической функции с помощью бинарной логистической регрессии с пошаговым отбором факторов и проведением, при необходимости, дополнительного построения ROC-кривых с последующим ROC-анализом. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ ; при  $p \geq 0,05$  различия считали маловероятными и статистически недостоверными.

### Результаты исследования / Results of the study

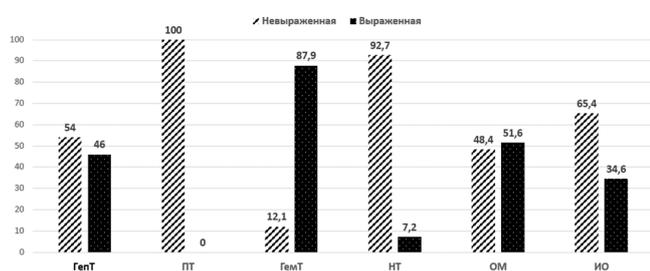
Проведена оценка историй болезни и исследованы образцы периферической крови 124 пациентов: соотношение пациентов мужского ( $n = 70$ ) и женского ( $n = 54$ ) пола составило 1,2/1,0, медиана возраста — 7 лет. Среди возрастных групп преобладали дети в возрасте 6–12 лет (33,9 %), затем в порядке убывания шли следующие возрастные группы: 4–5 лет (27,4 %), 13–18 лет (21,8 %), 1–3 года (13 %) и менее года (4 %). Превалировал В-линейный иммуноподвариант ОЛЛ — 67,7 %, по сравнению с Т-линейным (32,3 %). Группы риска в соответствии с протоколом ALL-IC BFM 2009 распределялись следующим образом: отмечалось незначительное преобладание пациентов группы среднего риска (48,4 %) над группой высокого риска (44,4 %), тогда как наименьшее число больных были стратифицированы в группу стандартного риска (7,2 %). 106 пациентов с впервые установленным диагнозом ОЛЛ проходили лечение по программе ALL-IC BFM 2009, 18 больных с рецидивом ОЛЛ — по программе ALL REZ BFM 2002. Исходы терапии представлены на рис. 1.

Результаты оценки частоты встречаемости НЛР метотрексата по степеням тяжести были объединены в две подгруппы: невыраженные (0–2 ст.) и выраженные ( $\geq 3$  ст.) НЛР, сравнение которых наглядно представлено на рис. 2.



**Рис. 1.** Распределение исходов лечения детей с ОЛЛ в исследуемой группе ( $n = 124$ ).

**Fig. 1.** Distribution of treatment outcomes for children with ALL in the study group ( $n = 124$ )



**Рис. 2.** Сравнение невыраженных и выраженных степеней тяжести НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ

**Fig. 2.** Comparison of unexpressed and expressed degrees of severity of methotrexate ADR in children with ALL

**Примечания:** HepT — гепатотоксичность; PT — почечная токсичность; GemT — гематологическая токсичность; NT — нейротоксичность; OM — орофарингеальный мукозит; IO — инфекционные осложнения.

**Notes:** HepT — hepatotoxicity; RT — renal toxicity; GemT — hematological toxicity; NT — neurotoxicity; OM — oropharyngeal mucositis; IC — infectious complications.

По результатам частотного анализа выявлены достоверные преобладания выраженных форм таких НЛР, как гематологическая ( $p = 0,002$ ), гепатологическая ( $p < 0,001$ ) токсичность, а также орофарингеальный мукозит ( $p = 0,003$ ), при этом тяжёлые формы гематологической токсичности и орофарингеального мукозита оказались достоверно связаны с задержкой элиминации MTX ( $p < 0,001$ ). Кроме того, обнаружено, что чем выше частота встречаемости гематологической и гепатотоксичности, а также орофарингеального мукозита ( $\geq 3$ ст.), тем выше частота встречаемости инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию метотрексатом.

По результатам фармакогенетического тестирования обнаружено, что при выявлении генотипа CC гена *ABCB1* rs1128503 повышен риск развития выраженного орофарингеального мукозита ( $p = 0,047$ , ОШ: 2,1 (95 % ДИ: 1,01–4,55)); у пациентов с генотипом TT *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженной инфекции ( $p = 0,046$ , ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1)), а у пациентов с генотипом TT *ABCB1* C3435Trs1045642 — нефротоксичности ( $p = 0,035$ , ОШ: 8,3 (95 % ДИ:

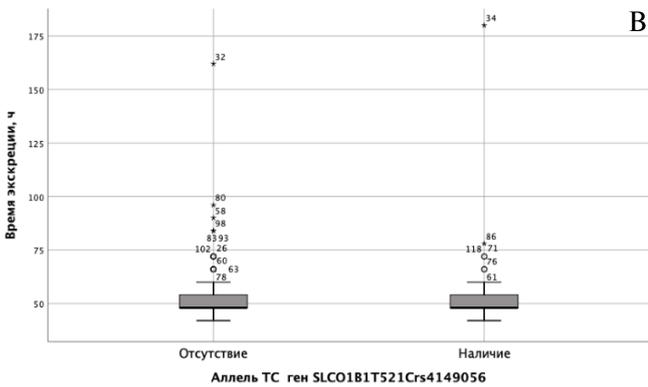
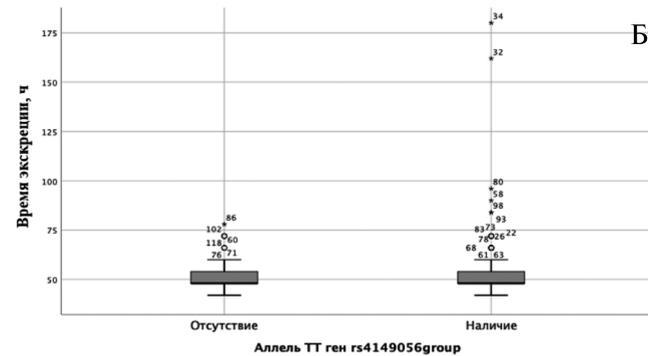
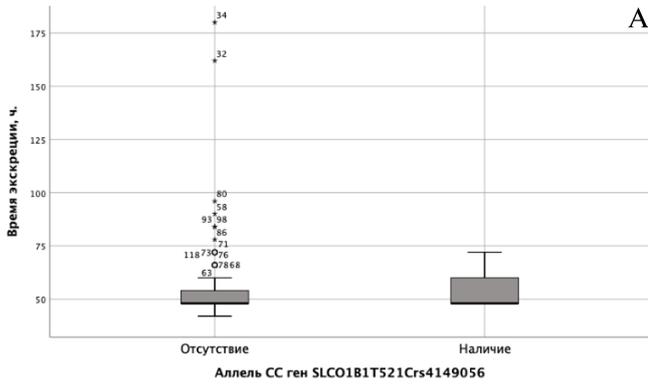
0,83–82,2)) и нейротоксичности ( $p = 0,041$ , ОШ: 2,3 (95 % ДИ: 1,02–5,12)).

Результаты проведённого ассоциативного анализа по оценке эффективности терапии MTX у детей с ОЛЛ в зависимости от носительства полиморфизмов гена *ABCB1* свидетельствуют о необходимости проведения фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей «дикого» генотипа GG гена *ABCB1* rs2032582 и аллеля TT гена *ABCB1* rs4148738 для определения группы пациентов с повышенным риском развития событий в отсроченном периоде. Показатели бессобытийной выживаемости (БСВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) достоверно выше были в группе носителей TT, TC, чем в группе носителей аллеля CC «дикий тип» гена *ABCB1* C3435T rs1045642 ( $p = 0,018$  и  $p = 0,026$ , соответственно). Все три вида оценённой выживаемости (БСВ, БРВ, ОВ) оказались выше в группе пациентов, получавших метотрексат в дозе более 1000 мг/м<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,047$ , соответственно), демонстрируя зависимость — чем выше доза метотрексата, тем выше общая выживаемость у детей с ОЛЛ. При этом группа пациентов ( $n = 18$ ), получавшая впервые HD-MTX в дозировке 1000 мг/м<sup>2</sup>, с подтверждённым диагнозом рецидива ОЛЛ при первичном лечении не имевшая в составе полихимиотерапии высокодозного MTX, продемонстрировала худшие показатели выживаемости.

Остальные же изучаемые нами полиморфизмы не показали значимого влияния на результаты терапии MTX в связи с возможно недостаточной мощностью исследования и не полным соответствием равновесию Харди–Вайнберга, т. е. неравномерным распределением генотипов в выборке.

При сравнении времени экскреции MTX в зависимости от генотипов CC и TC *SLCO1B1* T521C rs4149056 статистически значимых различий получено не было ( $p = 1$  и  $p = 0,304$ , соответственно). Время экскреции MTX у пациентов с генотипами CC и TC *SLCO1B1* T521C rs4149056 отличалось незначимо (медианы составляли 48 ч). При сравнении времени экскреции в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия генотипа TT rs4149056 статистически значимых различий получено не было ( $p = 0,267$ ). Время экскреции у группы пациентов с генотипом TT rs4149056 не отличалось от пациентов с другими генотипами (медианы составляли 48 и 48 ч, соответственно) (рис. 3).

Для проверки гипотезы о том, что выраженность токсических реакций на MTX у детей с ОЛЛ зависит от фармакокинетики препарата был осуществлён поиск взаимосвязей между выраженными НЛР и временем экскреции MTX, отражающим фармакокинетику препарата. Проведено сравнение медианы времени экскреции MTX при проявлении выраженной токсичности того или иного вида с медианой времени экскреции препарата при отсутствии тяжёлых НЛР. Результаты сравнительного анализа представлены в виде таблиц (табл. 1, 2) и графиков (рис. 4, 5).



**Рис. 3.** Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции МТХ от генотипов *SLCO1B1*: CC (А), ТТ «дикий тип» (Б) и TC (В)  
**Fig. 3.** Graphical representation of comparative data on median time of MTX excretion from the *SLCO1B1* genotypes: CC (A), TT "wild type" (B) and TC (C)

Таблица 1

Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от проявлений выраженного орофарингеального мукозита

Table 1

Comparison of median time of methotrexate excretion depending on the manifestations of severe oropharyngeal mucositis

Показатель	Выраженный мукозит				p
	Наличие		Отсутствие		
	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
Время экскреции, ч	54	48–66	48	48–54	<0,001

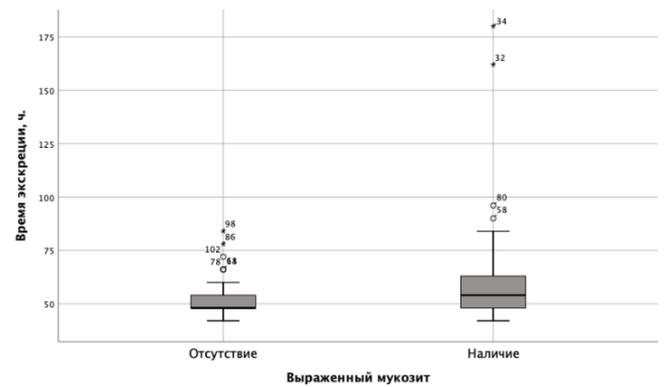
Таблица 2

Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от проявлений выраженной гепатотоксичности

Table 2

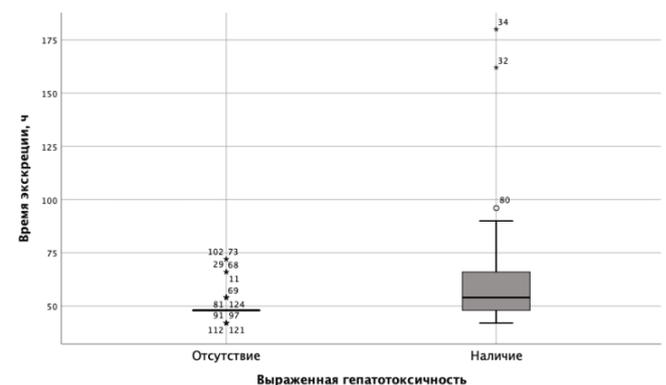
Comparison of median time of methotrexate excretion depending on the manifestations of expressed hepatotoxicity

Показатель	Выраженная гепатотоксичность				p
	Наличие		Отсутствие		
	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
Время экскреции, ч	54	48–66	48	48–48	<0,001



**Рис. 4.** Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженного орофарингеального мукозита у детей с ОЛЛ

**Fig. 4.** Graphical representation of comparative data on median time of methotrexate excretion in the presence or absence of manifestations of severe oropharyngeal mucositis in children with ALL



**Рис. 5.** Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженной гепатотоксичности у детей с ОЛЛ

**Fig. 5.** Graphical representation of comparative data on the median time of methotrexate excretion in the presence or absence of manifestations of expressed hepatotoxicity in children with ALL

При сравнении тяжести орофарингеального мукозита в зависимости от времени экскреции метотрексата (табл. 1, рис. 4) были получены статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ). Время экскреции препарата у пациентов с выраженным орофарингеальным мукозитом было существенно выше, чем среди пациентов без выраженного мукозита (медианы составляли 54 и 48 ч, соответственно).

При сравнении степени выраженности гепатотоксичности в зависимости от времени экскреции МТХ были получены статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ), (табл. 2, рис. 5). Время экскреции у пациентов с выраженной гепатотоксичностью было существенно выше, чем среди пациентов без выраженной гепатотоксичности (медианы составляли 48 и 54 ч, соответственно).

Доказано, чем выше время экскреции МТХ у детей с ОЛЛ, как показателя, отражающего фармакокинетику препарата, тем выше степень выраженности таких токсических НЛР, как орофарингеальный мукозит и гепатотоксичность ( $p < 0,001$ ). Пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* C3435T rs1045642 имеют повышенный риск развития нефро- и нейротоксичности ( $p = 0,041$ , ОШ: 2,3 (95 % ДИ: 1,02–5,12)). Пациенты с генотипом СС *ABCB1* rs1128503 имеют повышенный риск развития выраженного орофарингеального мукозита ( $p = 0,047$ , ОШ: 2,1 (95 % ДИ: 1,01–4,55)), а с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ( $p = 0,046$ , ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1,01–7,1)). Другие виды токсических НЛР на МТХ во взаимосвязи с носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* не показали достоверных различий.

На основании всех полученных данных частотного и ассоциативного анализов эффективности и безопасности терапии высокодозным МТХ нами была разработана актуальная прогностическая модель риска задержки элиминации МТХ более 54 часов при ОЛЛ у детей в зависимости от различных генетических и клинических данных.

Прогностическая модель для определения вероятности задержки элиминации МТХ более 54 часов включала 7 предикторов, которые составляют 42 % факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. Данная прогностическая модель оказалась статистически значимой ( $p < 0,001$ ) и описывались уравнением:

$$P = \frac{1}{(1 + e^{-z})} \times 100 \%,$$

$$z = -3,76 + 3,75 \times X_{ABCB1rs1128503CC} + 1,29 \times X_{ABCB1rs1128503CT} - 2,76 \times X_{ABCB1rs2032582GG} + 2,24 \times X_{\text{гепатотоксичность}} + 1,6 \times X_{\text{гематотоксичность}} + 1,23 \times X_{\text{нейротоксичность}} - 1,017 \times X_{\text{инф\_выраж}}$$

где  $P$  — вероятность неблагоприятного исхода (событие, рецидив, смерть) или задержки элиминации МТХ более 54 часов (в долях единицы);  $X_{ABCB1rs1128503CC}$  — генотип СС *ABCB1* rs1128503 (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{ABCB1rs1128503CT}$  — генотип СТ *ABCB1* rs1128503 (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{ABCB1rs2032582GG}$  — GG генотип *ABCB1* rs2032582 (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{\text{гепатотокс\_выраж}}$  — наличие выраженной гепатотоксичности (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{\text{гематотокс\_выраж}}$  — наличие выраженной гематологической токсичности (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{\text{наличие\_нейротоксичности}}$  — наличие нейротоксичности (0 — отсутствие, 1 — наличие);  $X_{\text{инф\_выраж}}$  — наличие выраженных инфекционных осложнений (0 — отсутствие, 1 — наличие).

Исходя из значений коэффициентов регрессии, наличие генотипа GG *ABCB1* rs2032582 и выраженных инфекционных осложнений уменьшают вероятность экскреции МТХ более 54 часов. В свою очередь, другие факторы (генотипы СС *ABCB1* rs1128503 и СТ *ABCB1* rs1128503; наличие выраженных гепатотоксичности, гематологической и нейротоксичности) увеличивают вероятность задержки элиминации МТХ более 54 часов в отдалённом периоде (рис. 6).



**Рис. 6.** Схематическое изображение прогностической модели развития задержки элиминации МТХ более 54 часов в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получавших терапию HD-MTX  
**Fig. 6.** Schematic representation of the prognostic model of the development of delayed elimination of MTX for more than 54 hours, depending on clinical and genetic factors in children with ALL who received HD-MTX therapy

В табл. 3 определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами вероятности экскреции МТХ >54 ч. В соответствии с коэффициентом детерминации  $R_2$  Найджелкерка, вошедшие в её состав предикторы составляют 42 % факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную.

С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции  $P$ . Полученная кривая представлена на рис. 7.

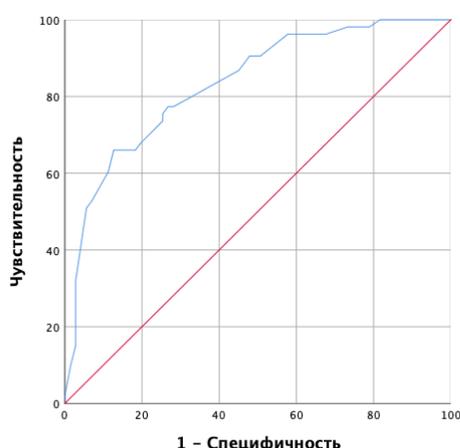
Оценка связи предикторов модели с шансами вероятности экскреции МТХ >54 часов

Table 3

Evaluation of the relationship of the predictors of the model with the chances of the probability of excretion of MTX >54 hours

Предиктор	COR (95 % CI)	p	AOR (95 % CI)	p
<i>ABCB1</i> rs1128503_CC	1,58 (0,75–3,3)	0,226	42,5 (2,5–729)	0,01*
<i>ABCB1</i> rs1128503_CT	1,17 (0,6–2,4)	0,658	3,6 (1,1–12,8)	0,044*
<i>ABCB1</i> rs2032582_GG	1,03 (0,5–2,2)	0,941	0,063 (0,005–0,8)	0,033*
Наличие выраженной гепатотоксичности	6,6 (3–14,7)	<0,001*	9,4 (3,3–26,9)	<0,001*
Наличие выраженной гематологической токсичности	6,26 (1,4–28,9)	0,013*	4,95 (0,9–27,2)	0,065
Наличие нейротоксичности	3,57 (1,6–7,75)	0,001*	3,4 (1,3–8,9)	0,012*
Наличие выраженных инфекционных осложнений	1,5 (0,74–3,3)	0,242	0,36 (0,12–1,1)	0,066

Примечание: \* — связь с предиктором статистически значима.  
Note: \* — the association with the predictor is statistically significant.



**Рис. 7.** ROC-кривая, характеризующая зависимость прогноза падения вероятности задержки элиминации МТХ (более 54 часов) от значения логистической функции  $p$ . Площадь под ROC-кривой составила  $0,833 \pm 0,036$  (95 % ДИ:  $0,762-0,905$ ). Значение логистической функции  $p$  в точке cut-point составило 0,35.

**Fig. 7.** ROC-curve characterizing the dependence of the forecast of the decrease in the probability of delayed elimination of MTX (more than 54 hours) from the value of the logistic function  $p$ . The area under the ROC-curve was  $0.833 \pm 0.036$  (95 % CI:  $0.762-0.905$ ). The value of the logistic function  $p$  at the cut-point was 0.35.

Чувствительность разработанной модели составила 77,4 % (41 верных прогнозов из 53 случаев экскреции более 54 ч), специфичность составила 73,2 % (52 верных прогнозов из 71 случая экскреции МТХ до 54 ч). Общая диагностическая эффективность 75 %.

### Обсуждение / Discussion

Исследования токсичности HD-MTX с точки зрения полиморфизмов генов белков-переносчиков появились сравнительно недавно. В данной работе мы

оценили ассоциации полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с токсичностью HD-MTX и прогнозом задержки элиминации МТХ более 54 часов, как показателя, отражающего фармакокинетику препарата.

Анализ результатов настоящего исследования подтверждает важность стратификации больных на группы риска с учётом инициальных клинико-лабораторных параметров и выявления ряда полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с большей степенью представленности ассоциаций с полиморфизмом гена *ABCB1*, чем гена *SLCO1B1*. Следует отметить, что только у пациентов с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 был повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ( $p = 0,046$ , ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1), что из-за широкого доверительного интервала и низкой частоты встречаемости в популяции (менее 5 %) требует дальнейших исследований на более обширном материале для подтверждения или опровержения полученного результата, и кроме того, ни один из полиморфизмов данного гена не попал в логистические функции прогностических моделей исходов ОЛЛ у детей и задержки элиминации МТХ более 54 часов.

В систематическом обзоре и метаанализе, представленном коллективом авторов под руководством Song Z, рассмотрены и исследованы генетические полиморфизмы всего пути метаболизма лекарственных средств [17]. Оказалось, что ген *ABCB1* 3435C>T rs1045642 оказывает значимое влияние на повышение риска гепатотоксичности, что соответствует результатам предыдущих исследований [18, 19]. Однако в нашей работе пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* 3435C>T rs1045642 имели повышенный риск развития нефротоксичности ( $p = 0,035$ , ОШ: 8,3 (95 % ДИ: 0,83–82,2)) и нейротоксичности ( $p = 0,041$ , ОШ: 2,3 (95 % ДИ: 1,02–5,12)), связи полиморфизмов с ГепТ 3–4 ст. не обнаружено.

В нашем исследовании в группе пациентов с аллелем «дикого типа» СС rs1128503 в 2,1 раз повышен риск развития орофарингеального мукозита 3–4 степени

относительно пациентов с мутантными аллелями этого SNP ( $p = 0,047$ , ОШ: 2,1 (95 % ДИ: 1,01–4,55)). По сообщению группы авторов под руководством *Liu SG*, не было обнаружено полиморфизма, ассоциированного с орофарингеальным мукозитом, хотя он чаще встречался у пациентов с генотипами СС и ТС гена *ABCB1* rs1128503, чем у тех, кто имел генотип ТТ (ОШ 2,009, 95 % ДИ 0,987–4,090,  $p = 0,054$ ) [20]. По нашему мнению, получение противоречивых результатов только подтверждает необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

У пациентов с мутантным генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 риск развития тяжёлых инфекционных осложнений повышен в 2,7 раз ( $p = 0,046$ , ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1)). Полиморфизмы гена *SLCO1B1* влияют на клиренс и токсичность МТХ, что может быть обусловлено опосредованной эндогенными метаболитами дистанционной связью между белками-транспортёрами в печени и почках [20]. В исследовании *Yang's FF et al.* генотип rs11045879 был связан с анальным мукозитом, а локус rs4149056 — с тромбоцитопенией, почечной токсичностью и анальным мукозитом [21].

В исследовании *Hao Q et al.* анализировались ассоциации между концентрацией МТХ в сыворотке крови, задержкой элиминации МТХ и токсичностью, связанной с МТХ, также было показано, что почечная токсичность была значимо ассоциирована с высокой концентрацией МТХ в сыворотке крови и высокой частотой задержки элиминации МТХ. Концентрация МТХ в сыворотке крови пациентов с генотипом ТТ *SLCO1B1* rs4149056 через 48 и 72 часа была значительно выше, чем у пациентов с генотипом ТС или СС ( $p = 0,014$  и  $p = 0,019$ , соответственно). Кроме того, повышенный риск нейтропении был связан с вариантом rs4149056 (генотипы ТС или СС) [22], а в нашем исследовании у пациентов с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ( $p = 0,046$ , ОШ: 2,7 (95% ДИ: 1–7,1)), что также имеет связь с течением агранулоцитоза.

В исследовании, проведённом *Treviño LR et al.* в рамках геномного анализа два варианта *SLCO1B1*, rs4149081 и rs11045879, были идентифицированы как ассоциированные с токсичностью, связанной с МТХ и его клиренсом [13]. *Ramsey LB et al.* подтвердили, что варианты *SLCO1B1*, rs4149056 и rs2306283 являются предикторами замедлённого клиренса МТХ у пациентов с ОЛЛ [23]. В их исследовании были установлены ассоциации между *SLCO1B1* rs4149056 и сывороточным уровнем МТХ и задержкой его элиминации, что аналогично результатам *den Hoed MA et al.* [24]. Вариант *SLCO1B1* rs4149056 был достоверно связан с кинетикой МТХ. В модели мультивариабельной регрессии площадь под кривой «концентрация–время» ( $AUC_{0-48ч}$ ) МТХ увеличивалась на 26 % ( $p < 0,01$ ) в зависимости от аллеля гена *SLCO1B1* rs4149056,  $AUC_{0-48ч}$  МТХ яв-

лялась значимым предиктором общих токсических нежелательных явлений во время курсов терапии МТХ ( $R(2) = 0,043$ ;  $p < 0,001$ ) [10].

Полученные в нашем исследовании данные подтверждают наличие ассоциаций между генами *SLCO1B1* и *ABCB1* и повышенным риском токсичности HD-МТХ. А разработанная нами прогностическая модель риска задержки элиминации МТХ более 54 часов в отдалённом периоде подтверждает вклад таких факторов, как наличие выраженных гепато-, гемато- и нейротоксичности, а также носительство генотипов СС *ABCB1*rs1128503 и СТ *ABCB1*rs1128503, которые необходимо рассматривать в качестве предикторов нарушений фармакокинетики МТХ.

Результаты проведённого ассоциативного анализа по оценке безопасности терапии метотрексатом у детей с ОЛЛ в зависимости от носительства ряда полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* свидетельствуют о необходимости проведения фармакогенетического тестирования с целью выявления «дикого» генотипа СС гена *ABCB1* rs1128503 для прогнозирования развития выраженного орофарингеального мукозита, а также генотипа ТТ *SLCO1B1* T521Crs4149056 для прогнозирования развития выраженных инфекционных осложнений.

## Заключение / Conclusion

Между полиморфизмами генов *SLCO1B1* и *ABCB1* и повышенным риском токсичности HD-МТХ существует значимая взаимосвязь. Мы пришли к выводу, что генотипирование полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* до начала лечения может быть потенциально полезным с целью возможной индивидуальной адаптации терапии HD-МТХ и снижения токсичности у пациентов с ОЛЛ, несмотря на то что многие современные исследования часто не обладают достаточной мощностью. В дальнейшем необходимо проведение более крупных валидизированных исследований генетических ассоциаций с терапией высокодозным метотрексатом.

Таким образом, по результатам проведённого комплексного анализа безопасности терапии высокодозным МТХ нами разработана достоверная ( $p < 0,001$ ) прогностическая модель с высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью (>70 % соответственно), демонстрирующая взаимосвязь клинических и генетических факторов, влияющих на фармакокинетику МТХ у детей с ОЛЛ, что подтверждает необходимость внедрения фармакогенетического тестирования в реальную клиническую практику. Разработанный алгоритм прогнозирования безопасности применения МТХ у детей с ОЛЛ с учётом таких фармакогенетических биомаркеров, как полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1*, может быть использован в работе стационарных отделений лечебных учреждений гематологического профиля с целью усовершенствования и оптимизации терапии детей с ОЛЛ.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Участие авторов

*Гурьева О. Д., Савельева М. И., Валиев Т. Т., Варфоломеева С. Р., Ильин М. В.:* разработка концепции и дизайна статьи, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, сбор и анализ данных, научное редактирование статьи, окончательное одобрение рукописи.

### Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России. Тематика государственного задания «Новые фармакогенетические маркеры безопасности фармакотерапии некоторых социально значимых заболеваний» (ЕГИСУ НИОКТР № 1022050400012-9).

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

### Authors' participation

*Gurieva OD, Savelyeva MI, Valiev TT, Varfolomeeva SR, Ilyin MV:* concept and design development, article writing, review of publications on the article topic, data collection and analysis, scientific article editing, final approval of the article.

### Funding

The work was financially supported by the Ministry of Health of Russia. The subject of the state assignment "New pharmacogenetic markers of safety of pharmacotherapy of some socially significant diseases" (EGISU NIOCTR No. 1022050400012-9).

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Гурьева Оксана Дмитриевна** — врач-детский онколог отделения детской онкологии и гематологии (химиотерапия гемобластозов) № 1 НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Минздрава России, Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0050-0721>

**Савельева Марина Ивановна** — д. м. н., профессор кафедры терапии имени профессора Е.Н. Дормидонтова ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация  
**Автор, ответственный за переписку**  
e-mail: [marinasavelyeva@mail.ru](mailto:marinasavelyeva@mail.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2373-2250>

**Валиев Тимур Теймуразович** — д. м. н., заведующий отделением детской онкологии и гематологии (химиотерапия гемобластозов) № 1 НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Российская Федерация; профессор кафедры детской онкологии имени академика Л.А. Дурнова ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

**Oksana D. Gurieva** — Pediatric Oncologist of the Department of Pediatric Oncology and Hematology (Hemoblastosis Chemotherapy) No. 1 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0050-0721>

**Marina I. Savelyeva** — Dr. Sci (Med.), Professor, Department of Therapy, Prof. E.N. Dornidontov Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation  
**Corresponding autor**  
e-mail: [marinasavelyeva@mail.ru](mailto:marinasavelyeva@mail.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2373-2250>

**Timur T. Valiev** — Dr. Sci (Med.), Head of the Department of Pediatric Oncology and Hematology (Hemoblastosis Chemotherapy) No. 1 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Pediatric Oncology named academician L.A. Durnov FSBEI FPE RMACPE MOH Russia, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

**Варфоломеева Светлана Рафаэлевна** — д. м. н., профессор, директор НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

**Svetlana R. Varfolomeeva** — Dr. Sci (Med.), Professor, Director of the Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

**Ильин Михаил Витальевич** — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой терапии имени профессора Е.Н. Дормидонтова ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6278-374X>

**Mikhail V. Ilyin** — Dr. Sci (Med.), Professor, Head of the Department of Therapy Prof. E.N. Dormidontov Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6278-374X>

### Список литературы / References

1. Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т., Тупицын Н.Н. Перспективы оценки минимальной остаточной болезни в постиндукционном периоде при В-линейном остром лимфобластном лейкозе у детей. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2020;7(2):15-22. [Sherwashidze MA, Valiev TT, Tupitsyn NN. Prospects for evaluation of the minimal residual disease in the post-induction period in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2020;7(2):15-22. (In Russ.)]. doi: 10.21682/2311-1267-2020-7-2-15-22.
2. Барях Е.А., Валиев Т.Т., Яцков К.В., и соавт. Интенсивная терапия лимфомы Беркитта: описание двух клинических случаев. *Гематология и трансфузиология*. 2007;52(1):41-43. [Baryakh EA, Yatskov KV, Valiev TT, et al. Intensive care for Burkitts lymphoma: two case reports. *Hematology and transfusiology*. 2007;52(1):41-43. (In Russ.)].
3. Валиев Т. Т., Шервашидзе М. А., Бельшева Т. С. Оценка токсичности терапии острого лимфобластного лейкоза по протоколу ALL IC-bfM 2002. *Онкогематология* 2022;17(3):137-59. [Valiev TT, Sherwashidze MA, Belysheva TS. Toxicity assessment of acute lymphoblastic leukemia treatment protocol ALL IC-bfM 2002. *Onkogematologiya = Oncohematology*. 2022;17(3):137-59. (In Russ.)]. doi: 10.17650/1818-8346-2022-17-3-137-159.
4. Коркина Ю.С. Оценка эффективности и токсичности терапии острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу ALL IC-BFM 2009: Дис. ... канд. мед. наук. — Москва; 2023. [Korkina YuS. Evaluation of the effectiveness and toxicity of therapy for acute lymphoblastic leukemia in children according to the ALL IC-BFM 2009 protocol. [dissertation] Moscow; 2023. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/otsenka-effektivnosti-i-toksichnosti-terapii-ostrogo-limfoblastnogo-leukoza-u-detei-po-proto?ysclid=m3m6gcbnxi143584346>. Ссылка активна на 25.10.2024.
5. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2690-6. doi: 10.1182/blood-2004-04-1616.
6. Lopez-Lopez E, Autry RJ, Smith C, et al. Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells *in vivo*. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6600-6615. doi: 10.1172/JCI1140797.
7. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, et al. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev*. 2015 Jul;29(4):243-9. doi: 10.1016/j.blre.2015.01.001.
8. Schulte RR, Choi L, Utreja N, et al. Effect of SLC01B1 Polymorphisms on High-Dose Methotrexate Clearance in Children and Young Adults With Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Clin Transl Sci*. 2021 Jan;14(1):343-353. doi: 10.1111/cts.12879.
9. Maamari D, El-Khoury H, Saifi O, et al. Implementation of Pharmacogenetics to Individualize Treatment Regimens for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmgenomics Pers Med*. 2020 Aug 12;13:295-317. doi: 10.2147/PGPM.S239602.
10. Radtke S, Zolk O, Renner B, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013 Jun 27;121(26):5145-53. doi: 10.1182/blood-2013-01-480335.
11. Zgheib NK, Akra-Ismaïl M, Aridi C, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in

12. Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Aug;24(8):387-96. doi: 10.1097/FPC.000000000000069.
12. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec;13(6):498-506. doi: 10.1038/tj.2012.44.
13. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5972-8. doi: 10.1200/JCO.2008.20.4156.
14. Razali RH, Noorizhab MNF, Jamari H, et al. Association of ABCB2 with levels and toxicity of methotrexate in Malaysian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Pediatr Hematol Oncol*. 2020 Apr;37(3):185-197. doi: 10.1080/08880018.2019.1705949.
15. Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015 Aug;15(4):372-9. doi: 10.1038/tj.2014.81.
16. Cheng Y, Chen MH, Zhuang Q, et al. Genetic factors involved in delayed methotrexate elimination in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 May;68(5):e28858. doi: 10.1002/pbc.28858.
17. Song Z, Hu Y, Liu S, et al. The Role of Genetic Polymorphisms in High-Dose Methotrexate Toxicity and Response in Hematological Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2021 Oct 21;12:757464. doi: 10.3389/fphar.2021.757464.
18. Maagdenberg H, Oosterom N, Zanen J, et al. Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 May;161:103312. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103312.
19. Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1445-54. doi: 10.1007/s13277-012-0395-2.
20. Liu SG, Gao C, Zhang RD, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):37761-37772. doi: 10.18632/oncotarget.17781.
21. Yang FF, Xue TL, Gao C, et al. Effects of SLC01B1 on elimination and toxicities of high-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2022 Oct;23(15):821-834. doi: 10.2217/pgs-2022-0098.
22. Hao Q, Song Y, Fang Q, et al. Effects of genetic polymorphisms on methotrexate levels and toxicity in Chinese patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Sci*. 2022 Nov 11;5(1):32-38. doi: 10.1097/BS9.000000000000142.
23. Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, et al. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLC01B1. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):898-904. doi: 10.1182/blood-2012-08-452839.
24. den Hoed MA, Lopez-Lopez E, te Winkel ML, et al. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun;15(3):248-54. doi: 10.1038/tj.2014.63.



# Кардиотропные свойства соединения ZMEI-3 — потенциального ингибитора белков Ерас

Крыжановский С. А., Мокров Г. В., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б.,  
Столярук В. Н., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,  
Москва, Российская Федерация

## Аннотация

**Введение.** Известно, что аллостерическим эффектором цАМФ, помимо протеинкиназы А, являются регуляторные белки Ерас, которые в кардиомиоцитах играют ключевую роль в контроле электромеханического сопряжения и их ритмической активности. Однако в условиях патологии аномальная активность белков Ерас ответственна за гипертрофию и фиброз кардиомиоцитов и инициацию нарушений сердечного ритма.

**Цель исследования.** Изучение кардиотропной активности соединения N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил)бензолсульфонамида (шифр ZMEI-3), потенциально обладающего свойствами антагонистов белков Ерас, на моделях нарушений ритма сердца и алкогольной кардиомиопатии (АКМП).

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах. Антиаритмическую активность соединения ZMEI-3 оценивали на моделях аконитиновой и реперфузионной аритмий, а кардиопротективную активность на трансляционной модели АКМП, которая формируется через 24 недели принудительного приёма 10 % раствора этанола.

**Результаты.** На модели реперфузионных аритмий у крыс показано, что соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут. в течение 7 дней в/б) уменьшает частоту возникновения опасных для жизни аритмий, в том числе фибрилляций желудочков. В условиях сформировавшейся АКМП изучаемое соединение (2 мг/кг/сут. в течение 28 дней в/б) увеличивало инотропную функцию сердца, о которой судили по величине фракции выброса левого желудочка. Гистологический анализ показал, что в условиях сформировавшейся АКМП соединение ZMEI-3 уменьшает выраженность морфологических признаков алкогольного поражения сердца.

**Выводы.** Соединение ZMEI-3 при курсовом применении оказывает выраженное антиаритмическое действие и уменьшает тяжесть течения алкоголь-обусловленной сердечной недостаточности.

**Ключевые слова:** белки Ерас; антагонисты белков Ерас; соединение ZMEI-3; нарушения ритма сердца; алкогольная кардиомиопатия; сократимость миокарда; крысы

## Для цитирования:

Крыжановский С. А., Мокров Г. В., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Столярук В. Н., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Дурнев А. Д. Кардиотропные свойства соединения ZMEI-3 — потенциального ингибитора белков Ерас. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):39–48. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-39-48>. EDN: KITWGE

**Поступила:** 01.11.2024. **В доработанном виде:** 01.12.2024. **Принята к печати:** 15.12.2024. **Опубликована:** 30.12.2024.

## The cardiotropic properties of ZMEI-3 compound — a potential inhibitor of Epac proteins

Sergey A. Kryzhanovskii, Grigory V. Mokrov, Iosif B. Tsorin, Ekaterina O. Ionova, Marina B. Vititnova,  
Valeriy N. Stolyaruk, Irina A. Miroshkina, Alexandra V. Sorokina, Andrei D. Durnev

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Introduction.** It is known that the allosteric effector of cAMP, in addition to protein kinase A, is the Epac regulatory proteins, which in cardiomyocytes play a key role in the electromechanical coupling control and their rhythmic activity. However, under pathological conditions, abnormal activity of Epac proteins is responsible for the hypertrophy and fibrosis of cardiomyocytes and the initiation of cardiac arrhythmias.

**Objective.** To study the cardiotropic activity of the compound N,2,4,6-tetramethyl-N-(pyridin-4-yl)benzolsulfonamide (code ZMEI-3), which potentially has the properties of Epac protein antagonists, in models of cardiac arrhythmias and alcoholic cardiomyopathy (ACMP).

**Materials and methods.** Experiments were carried out on outbred male rats. The antiarrhythmic activity of the ZMEI-3 compound was assessed in models of aconitine and reperfusion arrhythmias, and the cardioprotective activity in a translational model of ACM, which is formed after 24 weeks of forced intake of 10 % ethanol.

**Results.** Using a model of reperfusion arrhythmias in rats, it was shown that the ZMEI-3 compound (2 mg/kg/day for 7 days i.p.) reduces the incidence of life-threatening arrhythmias, including ventricular fibrillation. In conditions of formed ACMP, the studied compound (2 mg/kg/day for 28 days i.p.) increased the inotropic function of the heart, which was judged by the value of the left ventricular ejection fraction. Histological analysis showed that in conditions of formed ACMP, the ZMEI-3 compound reduces the severity of morphological signs of alcoholic heart damage.

**Conclusions.** Compound ZMEI-3, when used in a course, has a pronounced antiarrhythmic effect and reduces the severity of alcohol-related heart failure.

**Keywords:** Epac proteins; Epac protein antagonists; compound ZMEI-3; cardiac arrhythmias; alcoholic cardiomyopathy; myocardial contractility; rats

## For citations:

Kryzhanovskii SA, Mokrov GV, Tsorin IB, Ionova EO, Vititnova MB, Stolyaruk VN, Miroshkina IA, Sorokina AV, Durnev AD. The cardiotropic properties of ZMEI-3 compound — a potential inhibitor of Epac proteins. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):39–48. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-39-48>. EDN: KITWGE

**Received:** 01.11.2024. **Revision received:** 01.12.2024. **Accepted:** 15.12.2024. **Published:** 30.12.2024.

## Введение / Introduction

Практически до конца XX века полагали, что единственным аллостерическим эффектором цАМФ является открытый в 1968 году Дональдом Уолшем фермент — цАМФ-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А (РКА) [1]. Однако в конце XX века появились публикации, свидетельствующие о том, что не все клеточные эффекты цАМФ могут быть опосредованы исключительно РКА, и было высказано предположение, что в клетках экспрессируется «неизвестная РКА-подобная молекула» [2, 3]. В декабре 1998 года голландские учёные из университета Утрехта в культивируемых эмбриональных фибробластах линии NIH/3T3 впервые идентифицировали цАМФ-зависимый белок, который без участия РКА активировал малые GEFазы (сАМР-GEFs) Rap суперсемейства белков Ras и назвали его цАМФ-регулируемый фактор обмена гуанидиновых нуклеотидов (сАМР-GEF) или обменный белок, напрямую активируемый цАМФ (exchange protein directly activated by cAMP, Ерас) [4]. Таким образом, было показано, что в клетках существует альтернативный, не зависящий от РКА, сопряжённый с цАМФ каскад регуляции внутриклеточных сигнальных путей.

Белки Ерас по своей структуре представляют единую полипептидную молекулу, тогда как РКА состоит из отдельных R- и C-субъединиц. Белки Ерас по сравнению с РКА эволюционно являются более «молодой» сигнальной молекулой, поскольку показано, что РКА экспрессируется и в организме одноклеточных эукариотов, например грибов (дрожжей) из класса сахаромыцетов (*Saccharomyces cerevisiae*), тогда как белки Ерас идентифицированы только у многоклеточных организмов, преимущественно у млекопитающих [5]. РКА и белки Ерас в одной и той же клетке могут действовать как синергисты и/или инициировать не зависящие друг от друга, в том числе и противоположные эффекты [6, 7].

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что белки Ерас играют ключевую роль в регуляции базисных внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за поддержание внутриклеточного гомеостаза, а их гипер/гипоэкспрессия лежит в основе патогенеза многих патологических процессов, что позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств [8].

Выделяют две изоформы сигнальных белков Ерас — Ерас1 или сАМР-GEF-I и Ерас2 или сАМР-GEF-II [9]. Обе эти изоформы экспрессируются в кардиомиоцитах, клетках гладкой мышцы и эндотелия сосудов [10, 11].

К настоящему времени накоплены убедительные данные, свидетельствующие о том, что белки Ерас играют существенную роль в регуляции деятельности

сердца, ангиогенеза, сосудистого тонуса и проницаемости сосудистой стенки, а также в поддержании целостности эндотелиального барьера [12, 13].

В кардиомиоцитах экспрессируются как белки Ерас1, так и белки Ерас2. В кардиомиоцитах локализация белков Ерас различна, с чем во многом и связаны различия в их функциональной активности: белки Ерас1 располагаются вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны, на мембране митохондрий, на перинуклеарной мембране и, возможно, в ядре клетки, тогда как белки Ерас2 локализуются в области Z-линий рядом с Т-трубочками, вблизи которых сосредоточено скопление цистерн саркоплазматического ретикула [14]. Показано, что экспрессия белков Ерас1 у взрослых животных по сравнению с новорождёнными увеличивается на 42 %, тогда как белков Ерас2 — в 3,7 раза, что позволяет полагать, что с возрастом белки Ерас2 в миокарде становятся доминирующей изоформой [15].

В нормальных физиологических условиях белки Ерас1 и сопряжённые с ними сигнальные каскады регулируют инотропную и луситропную функции сердечной мышцы, межклеточное взаимодействие и апоптоз кардиомиоцитов [14, 16–18].

Однако белкам Ерас1 принадлежит существенная роль и в генезе патологии кардиомиоцитов. Так, в условиях острой ишемии миокарда гиперактивность белков Ерас1, локализованных не в цитозоле кардиомиоцитов, а в области внутренней мембраны и матрикса митохондрий (митохондриальная изоформа белка Ерас1 — MitЕрас1), влечёт за собой ишемия-обусловленную гибель кардиомиоцитов [19].

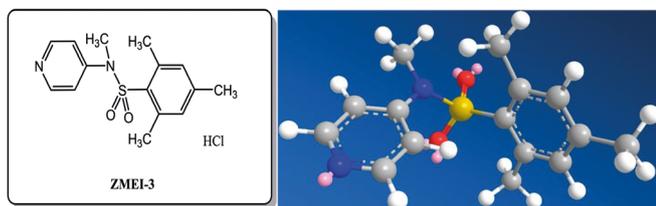
Аномальная активность белков Ерас1 в условиях хронической патологии сердечной мышцы ответственна за формирование гипертрофии, ремоделирования и фиброза миокарда [20–22].

Выше было отмечено, что белки Ерас2 локализуются в области Z-линий рядом с Т-трубочками, вблизи которых сосредоточено скопление цистерн саркоплазматического ретикула, в силу чего они играют одну из ключевых ролей в регуляции ритмической активности сердечной мышцы [23, 24]. Вместе с тем, избыточная активация белков Ерас2 и сопряжённых с ними сигнальных путей вызывает развитие нарушений ритма сердца [25, 26].

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать белки Ерас в качестве новой биомишени для разработки новых высокоэффективных лекарственных средств для лечения пациентов с нарушениями ритма сердца, хронической сердечной недостаточности, инфарктом миокарда и др. [27, 28].

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был проведён направленный синтез ряда производных арилсульфониламинопиридина, предположительно обладающих свойствами ингибиторов

белков Ерас. В результате проведённого скрининга было выявлено активное соединение лидер — гидрохлорид N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил)бензолсульфонамида, получившее шифр ZMEI-3 (рис. 1) [29].



**Рис. 1.** Структурная формула и пространственная конфигурация соединения ZMEI-3  
**Fig. 1.** Structural formula and spatial configuration of compound ZMEI-3

### Цель исследования / Objective

Изучение кардиотропной активности соединения ZMEI-3 на моделях нарушений ритма сердца и алкогольной кардиомиопатии.

### Материалы и методы / Materials and methods

**Животные.** Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах с изначальной массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин (15 дней) в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 am). Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных

биомедицинских и фармацевтических технологий» (Протокол №1 от 27 сентября 2016 г.). Эксперименты разрешены биоэтической комиссией (протокол №3 28 января 2022 г.).

**Рандомизация.** Животных рандомизировали на 7 групп: 1-я ( $n = 9$ ) — аконитиновая аритмия, контроль; 2-я ( $n = 6$ ) — крысы, у которых аконитиновую аритмию вызывали после введения соединения ZMEI-3; 3-я группа ( $n = 13$ ) — реперфузионные нарушения ритма сердца, контроль; 4-я группа ( $n = 13$ ) — реперфузионные нарушения ритма после 7 суток введения соединения ZMEI-3; 5-я группа ( $n = 9$ ) — интактные крысы — контроль для АКМП; 6-я группа ( $n = 8$ ) — АКМП контроль; 7-я группа ( $n = 17$ ) — АКМП + ZMEI-3 в течение 28 суток алкогольной депривации.

**Метод воспроизведения аконитиновой аритмии.** Наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине на подогреваемом операционном столике. Катетеризировали левую бедренную вену для введения аконитина и изучаемого соединения. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (стандартные отведения, калибровочный сигнал 20 мВ, скорость записи 100 мм/сек, продолжительность записи 60 секунд). В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» (Россия). Затем подбирали дозу аконитина ( $n = 9$ , в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах 1–2 минут после окончания его введения вызывает смешанную предсердно-желудочковую экстрасистолию; величина подобранной дозы — 30 мкг/кг. Соединение ZMEI-3 вводили в дозе 2 мг/кг в/в за 2 минуты до аконитина. Контрольным животным вводили изотонический 0,9 % раствор натрия хлорида в эквивалентном объёме. Непрерывную регистрацию ЭКГ начинали за 2 минуты до начала введения аконитина или исследуемого соединения и продолжали в течение 20 минут от момента окончания в/в введения аконитина.

В каждой экспериментальной группе подсчитывали количество животных, у которых возникала политопная экстрасистолия (ПЭС) в первые 10 минут после введения аконитина.

**Метод воспроизведения реперфузионных нарушений ритма сердца.** Наркотизированных (хлоралгидрат 350 мг/кг, в/б) крыс переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия), после чего производили тороко- и перикардотомию и под левую нисходящую коронарную артерию сразу же после её выхода из-под ушка подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии. Через 7 минут лигатуру снимали. Оценивали наличие/отсутствие фибрилляции желудочков сердца (ФЖ) и других нарушений ритма сердца в течение

3 минут от момента начала реперфузии. Соединение ZMEI-3 вводили в/в в дозе 2 мг/кг/сут в течение 7 дней в изотоническом 0,9 % растворе натрия хлорида, в контрольной серии — эквивалентный объём растворителя. Регистрацию ЭКГ (II стандартное отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. В работе использовали цифровой электрокардиограф Поли-Спектр-8В (Нейрософт, Россия). Для оценки противofiбрилляторного и антиаритмического действия в каждой группе подсчитывали количество животных, у которых возникали: фибрилляции желудочков сердца (ФЖ), опасные для жизни аритмии (ОЖА: фибрилляция желудочков или желудочковая тахикардия), экстрасистолия.

*Трансляционная модель АКМП.* Алкогольная кардиомиопатия моделируется на крысах. Животные содержатся в индивидуальных клетках стандарта Т/3 в условиях вивария (температура 21–23 °С, относительная влажность воздуха 40–60 %) при регулируемом 12 ч/12 ч световом режиме (свет/темнота) с предоставлением брикетированного стандартного корма *ad libitum*. Животные подвергаются принудительной алкоголизации, основанной на предоставлении в качестве единственного источника жидкости 10 % раствора этанола. Среднесуточное потребление алкоголя в пересчёте на чистый этанол колебалось в пределах 5,0–6,5 г/кг. Показано, что через 24 недели принудительной алкоголизации у животных развивается алкогольная кардиомиопатия, воспроизводящая основные клинико-диагностические признаки этого заболевания — дилатация правого и левого желудочков сердца, снижение инотропной функции сердца, жировая дистрофия миокарда, снижение электрической стабильности кардиомиоцитов [30].

После 24 недель алкоголизации животным заменяли этанол на воду и регистрировали эхокардиограмму. Соединение ZMEI-3 вводили в/в в течение 28 суток алкогольной депривации в дозе 2 мг/кг/сут. Крысам контрольных групп вводили эквивалентный объём изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида. Все вводимые растворы были стерильными. Через сутки после последнего введения изучаемого соединения у животных регистрировали эхокардиограмму. Крыс подвергали эвтаназии, осуществляли забор сердец для морфогистологического исследования.

*Эхокардиография.* Наркотизированных крыс (кетамин 100 мг/кг, в/б) фиксировали на операционном столике в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-

диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца, затем по методу *Teicholz LE* [31] рассчитывали такие показатели насосной функции сердца, как фракция выброса (ФВ) и фракция укорочения (ФУ) левого желудочка.

Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [32]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц).

*Морфогистологические исследования.* В процессе патологоанатомического вскрытия и изучения состояния внутренних органов осуществляли вскрытие и забор сердца. Сердце извлекали и помещали в фиксирующий раствор — забуференный формалин в 10 % концентрации при соблюдении объёмного соотношения 1:20. По окончании фиксации из сердца вырезали фронтальные сегменты, захватывающие желудочки. Вырезанные фрагменты помещали в заливочные кассеты, затем осуществляли гистологическую проводку по стандартному протоколу с помощью Автоматического тканевого процессора карусельного типа (Leica TP 1020, Leica Microsystems, ФРГ). По завершении проводки участки миокарда заливали в гомогенизированную парафиноподобную среду Paraplast (Leica Biosystems Richmond, США). Для заливки в парафин использовали модульную Систему заливки тканей с графическим дисплеем (Tissue-Tek® ТЕК, Sakura, Япония). Гистологические срезы толщиной 5–6 микрон получали с помощью специально оборудованного Рабочего места для микротомии (Bio-Optica Milano SPA, Италия) и ротационного микротома (Accu-Cut SRM 200, Sakura, Япония). Предметные стекла с помещёнными на них срезами просушивали. В дальнейшем депарафинированные и окрашенные галлоцианин-эозином срезы помещали под покровные стекла, используя при этом синтетическую монтирующую среду Bio Mount (Bio-Optica Milano SPA, Италия).

Готовые микропрепараты представленных фрагментов желудочков исследовали в проходящем свете с помощью микроскопа Nikon Eclipse 55 I (Япония) при увеличении 40, 100, 200 и 400. Документировали изображения фотокамерой Nikon DS-Fi1c с применением программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

*Статистический анализ.* Данные, измеренные в категориальных шкалах, обрабатывали с помощью критерия точной вероятности Фишера. Нормальность распределения и гомогенность дисперсий данных, измерённых в количественных шкалах, проверяли с помощью критериев Шапиро–Уилка и Левена, соответственно. Так как распределение выборок было близко к нормальному, а выборки

гомогенны, то статистическую значимость различий определяли с помощью дисперсионного анализа повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану.

**Использованные вещества.** Кетамин ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия; уретан “Acros organics”, Индия; хлоралгидрат “Merck”, Швейцария; раствор натрия хлорида 0,9 % изотонический, ООО «Мосфарм», Россия; соединение ZMEI-3 (гидрохлорид N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил) бензосульфонамида, т.пл. 140–142 °C (из этанола); Rf (этилацетат-гексан (1:3), алюминиевые силикагелевые пластины DC-Kieselgel 60 G/F254 (Merck, Германия) с обнаружением в УФ-свете) = 0,08), ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Россия.

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ результатов экспериментов на модели нарушений ритма сердца, вызываемых аконитина у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б), показал, что в этих условиях соединение ZMEI-3 (однократно, 2,0 мг/кг, в/в, за 2 мин до в/в введения аконитина) не обладало антиаритмическим действием. Так, в контрольной серии опытов аконитина вызывал ПЭС в 100 % случаев (у 9 крыс из 9), у животных, получавших изучаемое соединение за 2 минуты до введения аконитина, нарушения ритма сердца также возникали в 100 % случаев (у 6 крыс из 6,  $p = 1,0$ ).

Такой результат представляется предсказуемым: известно, что аномальная проаритмическая активность белков Ерас2 реализуется посредством нарушения функциональной активности специфичных для кардиомиоцитов риадиноновых рецепторов 2 типа (RyR2), результатом чего является перегрузка цитоплазмы ионами  $Ca^{2+}$  вследствие их утечки из цистерн саркоплазматического ретикулума во время диастолы, что и является источником аритмий [33, 34]. Также известно, что для нарушения функциональной активности RyR2, опосредованного белками Ерас2, необходима активация сопряжённого с ними Ерас2/PI3K/Akt/NOS1/CaMKII $\delta$ /RyR2 сигнального каскада [35].

Поскольку трудно предположить, что блокада этого сигнального каскада произойдёт практически мгновенно после однократного введения соединения ZMEI-3, в следующей серии экспериментов была предпринята попытка гарантировано заблокировать и/или белки Ерас2, и/или сопряжённые с ними проаритмогенные сигнальные каскады: мы попытались оценить антиаритмическую активность соединения ZMEI-3 на фоне его курсового применения в течение 7 дней (2,0 мг/кг, в/б). В качестве приемлемой модели была выбрана модель реперфузионных арит-

мий у крыс, патогенез которых во многом связан с перегрузкой цитозоля кардиомиоцитов ионами  $Ca^{2+}$  [36, 37].

Как следует из полученных данных, соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 7 дней, в/б) в условиях 7-минутной окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии проявляет выраженную противофибрилляторную и антиаритмическую активность. Так, если в контроле фибрилляции желудочков возникали у 9 из 13 животных (70 % случаев), а опасные для жизни аритмии у 13 из 13, то у крыс, получавших соединение ZMEI-3, только у 3 из 13 (23 % случаев,  $p = 0,047$ ) и у 8 из 13 ( $p = 0,039$ ), соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Антиаритмическая и противофибрилляторная активность соединения ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 7 дней в/б) в условиях модели реперфузионных аритмий у наркотизированных крыс (хлоралгидрат 350 мг/кг в/б)

Table 1

Antiarrhythmic and antifibrillatory activity of the compound ZMEI-3 (2 mg/kg/day for 7 days i.p.) in a model of reperfusion arrhythmias in anesthetized rats (chloralhydrate 350 mg/kg i.p.)

Вещество	Количество животных в группе	Количество животных с опасными для жизни аритмиями	Количество животных с фибрилляциями желудочков
Контроль	13	13	9
ZMEI-3	13	8 $p = 0,039$	3 $p = 0,047$

*Примечание: p* указано по отношению к контролю.  
*Note: p* is indicated in relation to control.

Таким образом, результаты предыдущих экспериментов свидетельствуют о том, что для реализации целевой активности соединения ZMEI-3 необходимо его курсовое применение.

Исходя из этих данных, для оценки кардиопротективных эффектов соединения ZMEI-3 на разработанной нами трансляционной модели АКМП у крыс мы использовали его курсовое применение (2 мг/кг/сут в течение 28 дней, в/б). Экспериментальную терапию соединением ZMEI-3 начинали у крыс с подтверждённой полномасштабной АКМП, которая формируется через 24 недели принудительного приёма 10 % алкоголя, и продолжали на фоне алкогольной депривации в течение 28 дней.

Согласно данным эхокардиографии, у крыс, которые в течение 24 недель потребляли в качестве единственного источника жидкости 10 % раствор этанола, по сравнению с интактными крысами такого же возраста, значительно снижена инотропная функция левого желудочка сердца, о чем свидетельствует статистически значимое снижение его фракции укорочения (ФУ) и фракции выброса (ФВ)

(табл. 2). Так, например, если у интактных крыс ФВ в среднем составляла  $87,4 \pm 1,4$  %, то у крыс с АКМП этот показатель составлял  $66,4 \pm 1,5$  % ( $p = 0,0001$ ). Хорошо известно, что снижение сократительной функции сердца свидетельствует о развитии хронической сердечной недостаточности, которая является одним из патогномоничных признаков АКМП [37, 38]. Следует отметить, что ранее мы показали, что при предоставлении крысам в течение 24 недель в качестве единственного источника жидкости 10 % раствора этилового спирта, наряду с эхокардиографическими признаками АКМП, наблюдаются и другие патогномоничные для этой патологии диагностические признаки, такие как жировая дистрофия миокарда, полиморфизм клеток сердечной мышцы (одновременное присутствие гипертрофированных и дистрофических кардиомиоцитов), снижение электрической стабильности кардиомиоцитов и т. д. [30].

Также согласно данным эхокардиографии, в течение 4-недельной алкогольной депривации сократительная функция левого желудочка сердца у крыс с АКМП, так же как и у интактных животных,

практические не изменялась. Так, например, ФВ левого желудочка у крыс с АКМП составила, соответственно,  $66,4 \pm 1,5$  % и  $65,0 \pm 1,8$  % ( $p = 0,29$ ), а у интактных животных, соответственно,  $87,4 \pm 1,4$  и  $86,9 \pm 1,7$  ( $p = 0,28$ ). Принципиально иная картина наблюдается у животных, получавших соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в/б) на фоне алкогольной депривации в течение 28 дней. У этих животных наблюдалось статистически значимое увеличение инотропной функции левого желудочка сердца (табл. 2). Так, например, ФВ у животных, получавших соединение ZMEI-3, за период наблюдения увеличилась с  $69,0 \pm 1,0$  % до  $76,5 \pm 1,2$  % ( $p = 0,0001$ ).

Таким образом, систематическая терапия соединением ZMEI-3, начатая в условиях сформированной АКМП, способствует статистически значимому увеличению инотропной функции левого желудочка сердца и, следовательно, уменьшению тяжести течения сопутствующей АКМП хронической сердечной недостаточности.

Через сутки после окончания эхокардиографического исследования крысы подверглись эвтаназии, а их сердца были изъяты для проведения гистологического изучения.

Микроскопическое исследование сердца интактных крыс не выявило патологических изменений в миокарде желудочков. Миокард, имевший типичную гистоархитектонику, был представлен связанными между собой поперечнополосатыми мышечными клетками — кардиомиоцитами, расположенными послойно. Поперечная исчерченность саркоплазмы мышечных волокон была хорошо заметна, ядра кардиомиоцитов, расположенные по большей части центрально, имели незначительный полиморфизм. Между мышечными структурами миокарда обнаруживались тонкие прослойки соединительной ткани, кровеносные сосуды, местами были заметны единичные эритроциты (рис. 2).

В отличие от интактного контроля, в миокарде всех крыс с АКМП наблюдались заметные дегенеративные изменения. У подавляющего большинства животных отмечалось выраженное расстройство кровообращения — диффузное и очаговое венозное полнокровие разной степени выраженности, а также капиллярное полнокровие с эритростазами и сладжами эритроцитов, петехиальными кровоизлияниями. Был замечен периваскулярный и межмышечный отёк. Следует отметить, что просветы сосудов в большинстве случаев были расширены. Морфологические признаки периваскулярного отёка и васкулита были выражены у всех крыс этой экспериментальной группы. В саркоплазме большинства кардиомиоцитов и межмышечной строме были заметны вакуоли и мелкие капли жира (рис. 3).

В миокарде большинства крыс группы АКМП контроль обнаруживались участки волнообразной деформации кардиомиоцитов, с потерей их по-

Таблица 2

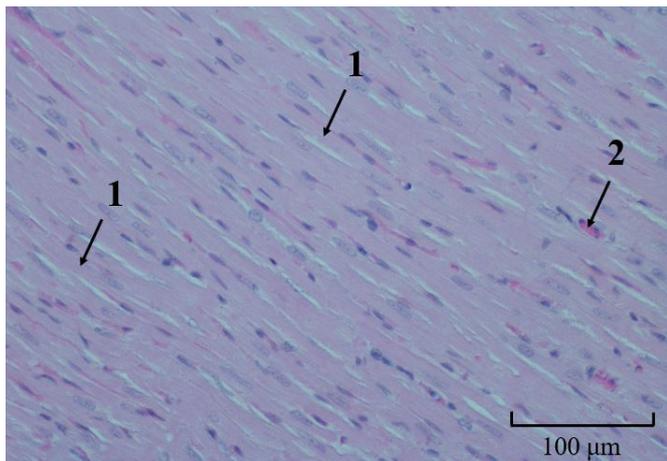
**Влияние соединения ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 28 дней, в/б) на сократительную функцию сердца крыс в условиях 28-дневной алкогольной депривации после 24 недель потребления алкоголя**

Table 2

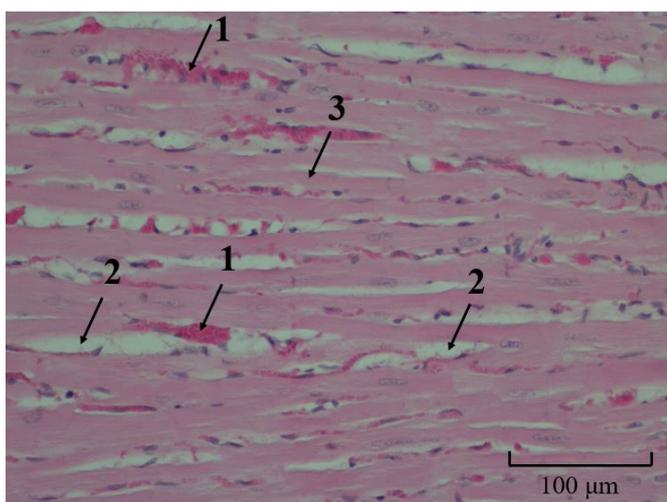
**Effect of compound ZMEI-3 (2 mg/kg/day for 28 days, i.p.) on the contractile function of the heart of rats during 28-day alcohol deprivation after 24 weeks of alcohol consumption**

Группа	n	Показатель	До начала депривации	После 28 суток депривации
Интактные крысы	9	ФУ, %	$51,3 \pm 1,1$ $p = 0,0001$	$50,5 \pm 1,5$ $p = 0,0001$ $p_1 = 0,13$
		ФВ, %	$87,4 \pm 1,4$ $p = 0,0001$	$86,9 \pm 1,7$ $p = 0,0001$ $p_1 = 0,28$
Алкоголи- зиро- ванный контроль	8	ФУ, %	$31,6 \pm 1,2$	$30,8 \pm 1,6$ $p_1 = 0,52$
		ФВ, %	$66,4 \pm 1,5$	$65,0 \pm 1,8$ $p_1 = 0,29$
Крысы, получав- шие соеди- нение ZMEI-3	17	ФУ, %	$33,9 \pm 0,8$ $p = 0,19$	$40,0 \pm 1,1$ $p = 0,0002$ $p_1 = 0,0001$
		ФВ, %	$69,0 \pm 1,0$ $p = 0,21$	$76,5 \pm 1,2$ $p = 0,0002$ $p_1 = 0,0001$

*Примечания:* Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; ФУ — фракция укорочения левого желудочка; ФВ — фракция выброса левого желудочка;  $p$  — указано по отношению к алкоголизируемому контролю;  $p_1$  — указано к уровню до начала депривации.  
*Notes:* Arithmetic means and standard mean errors are shown; SF — left ventricular shortening fraction; EF — left ventricular ejection fraction;  $p$  — indicated in relation to the alcoholized control;  $p_1$  — indicated to the level before the start of deprivation.



**Рис. 2.** Микрофотография фрагмента левого желудочка интактной крысы, галлоцианин/эозин,  $\times 200$ . 1 — неизменённые кардиомиоциты. 2 — единичные эритроциты.  
**Fig. 2.** Microphoto of the left ventricle fragment of the intact rat, gallocyanin/eosin,  $\times 200$ . 1 — unchanged cardiomyocytes. 2 — single erythrocytes.



**Рис. 3.** Микрофотография фрагмента левого желудочка алкоголированной крысы (AMKP контроль) галлоцианин/эозин,  $\times 200$ . Стрелками обозначены: 1 — диффузное полнокровие миокарда; 2 — вакуоли и капли жира; 3 — кардиомиоциты с гомогенной цитоплазмой и лизированным ядром.  
**Fig. 3.** Microphoto of the left ventricle fragment of the alcoholized rat (AMKP control) gallocyanin/eosin,  $\times 200$ . The arrows indicate: 1 — diffuse myocardial plethora; 2 — vacuoles and droplets of lipid; 3 — cardiomyocytes with homogeneous cytoplasm and lysed nucleus.

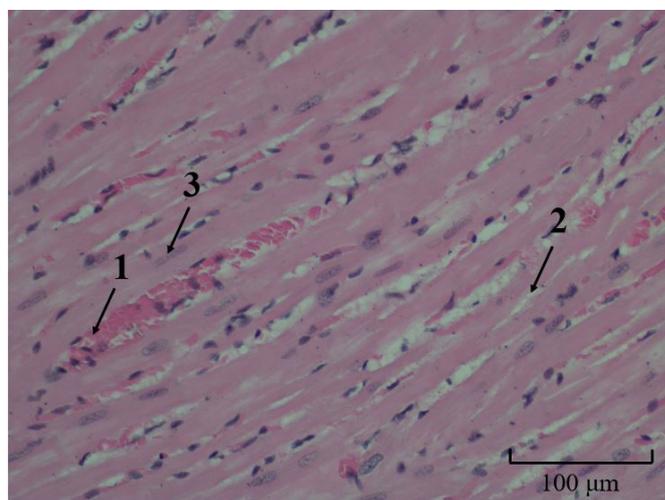
перечной исчерченности. В большинстве случаев фиксировались очаги плазмолиза, фрагментация мышечных волокон. Был замечен выраженный полиморфизм кардиомиоцитов. Часть из них имела гомогенную цитоплазму и уменьшенное в размерах овальное или округлое, гиперхромное, реже лизированное ядро. Другая часть кардиомиоцитов,

имеющая крупное овальное или округлое, чаще центрально расположенное ядро с хорошо визуализирующимся хроматином, находилась в состоянии умеренной гипертрофии (рис. 3). Жировая дистрофия миокарда и полиморфизм кардиомиоцитов являются патогномичными признаками АКМП [37].

Патоморфологические изменения в миокарде крыс, получавших соединение ZMEI-3 на фоне сформировавшейся АКМП, были менее выражены по сравнению с таковыми у крыс группы АКМП контроль.

В миокарде крыс, получавших соединение ZMEI-3, как и в миокарде контрольных крыс с АКМП, визуализировалось расстройство кровообращения в виде диффузного венозного и капиллярного полнокровия, частично с эритростазом, однако по сравнению с контролем АКМП эти изменения были менее выражены (рис. 4):

- признаки периваскулярного отёка и инфильтрация лимфомакрофагами были заметны лишь вокруг крупных сосудов;
- поперечная исчерченность мышечных волокон по большей части была сохранена;
- частота обнаружения волнообразной деформации и фрагментации кардиомиоцитов была заметно меньше;
- у большинства крыс, получавших соединение ZMEI-3, вакуоли и мелкие капли жира регистрировались только в межмышечной строме, но не в



**Рис. 4.** Микрофотография фрагмента левого желудочка алкоголированной крысы, получавшей соединение ZMEI-3, галлоцианин/эозин,  $\times 200$ . Стрелками обозначены: 1 — диффузное полнокровие миокарда; 2 — вакуоли и мелкие капли жира; 3 — полиплоидные кардиомиоциты.

**Fig. 3.** Microphotograph of the left ventricle fragment of the alcoholized rat receiving the compound ZMEI-3, gallocyanine/eosin,  $\times 200$ . Arrows indicate: 1 — diffuse myocardial plethora; 2 — vacuoles and small droplets of lipid; 3 — polyploid cardiomyocytes.

саркоплазме кардиомиоцитов, как это было отмечено у крыс группы АКМП контроль.

Полиморфизм кардиомиоцитов, наблюдаемый в миокарде крыс, леченных соединением ZMEI-3, визуально был менее выражен, по сравнению с контролем АКМП. Часть кардиомиоцитов также находилась в состоянии гипертрофии. В отличие от контроля АКМП, мышечные клетки, имеющие светлую гомогенную цитоплазму и уменьшенные в размерах гипохромные ядра, встречались только в отдельных случаях (рис. 4).

Таким образом, микроскопическое исследование миокарда желудочков алкоголизированных крыс, леченных соединением ZMEI-3, позволило установить значительное уменьшение морфологических признаков, характерных для АКМП. У леченных животных расстройства кровообращения были менее выраженными, а число регрессивных форм кардиомиоцитов заметно снижалось. Вакуолизация и инфильтрация жиром шли, главным образом, по интерстицию миокарда.

## Заключение / Conclusion

Как следует из полученных данных, соединение ZMEI-3 при курсовом применении оказывает выраженное антиаритмическое действие и уменьшает тяжесть течения алкоголь-обусловленной сердечной недостаточности путём повышения инотропной функции левого желудочка сердца, что, возможно, связано с уменьшением интенсивности жировой дистрофии миокарда.

Поскольку известно, что аномальная активность регуляторных белков Eras инициирует развитие нарушений сердечного ритма [25, 39, 40] и играет важную роль в формировании хронической сердечной недостаточности [39, 41], можно полагать, что кардиотропные эффекты соединения ZMEI-3 могут быть связаны с его антагонистическим влиянием в отношении белков Eras1/Eras2.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Крыжановский Сергей Александрович** — д. м. н., зав. лабораторией фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
*Автор, ответственный за переписку*  
e-mail: kryzhanovskij\_sa@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>  
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

**Sergey A. Kryzhanovskii** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
*Corresponding author*  
e-mail: kryzhanovskij\_sa@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>  
RSCI SPIN code: 6596-4865

**Мокров Григорий Владимирович** — к. х. н., руководитель лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>  
РИНЦ SPIN-код: 8755-7666

**Grigory V. Mokrov** — PhD, Cand. Sci. (Chemical), Head of the Fine Organic Synthesis Laboratory at the Drug Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>  
RSCI SPIN code: 8755-7666

**Цорин Иосиф Борисович** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>  
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

**Iosif B. Tsorin** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>  
RSCI SPIN code: 4015-3025

**Ионова Екатерина Олеговна** — к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>  
SPIN-код: 5042-1952

**Ekaterina O. Ionova** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>  
RSCI SPIN code: 5042-1952

**Вититнова Марина Борисовна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>  
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

**Marina B. Vititnova** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>  
RSCI SPIN code: 1901-8919

**Столярук Валерий Николаевич** — к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>  
РИНЦ SPIN-код: 3405-8229

**Valeriy N. Stolyaruk** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher Scientist of of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>  
RSCI SPIN code: 3405-8229

**Мирошкина Ирина Александровна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>  
SPIN-код: 4697-7938

**Irina A. Miroshkina** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Drug Toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>  
SPIN code: 4697-7938

**Сорокина Александра Валериановна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

**Alexandra V. Sorokina** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Drug Toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

**Дурнев Андрей Дмитриевич** — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>  
РИНЦ SPIN-код: 8426-0380

**Andrei D. Durnev** — Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>  
RSCI SPIN code: 8426-0380

Список литературы / References

- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1968 Jul 10; 243(13):3763-5.
- Renström E, Eliasson L, Rorsman P. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1997 Jul 1;502 ( Pt 1)(Pt 1):105-18. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.105bl.x.
- Anciaux K, Van Dommelen K, Nicolai S, et al. Cyclic AMP-mediated induction of the glial fibrillary acidic protein is independent of protein kinase A activation in rat C6 glioma. *J Neurosci Res.* 1997 May 15;48(4):324-33.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998 Dec 3;396(6710):474-7. doi: 10.1038/24884.
- Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian *rapgef3* gene: Structure, function and therapeutics. *Gene.* 2015 Oct 10;570(2):157-67. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.063.
- Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, et al. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol.* 2005 Jan 15; 174(2):595-9. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.595.
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008 Jul;40(7):651-62. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x.
- Muñoz-Llanca P, Henríquez DR, Wilson C, et al. Exchange Protein Directly Activated by cAMP (EPAC) Regulates Neuronal Polarization through Rap1B. *J Neurosci.* 2015 Aug 12;35(32):11315-29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3645-14.2015.
- Lin HB, Cadete VJ, Sra B, et al. Inhibition of MMP-2 expression with siRNA increases baseline cardiomyocyte contractility and protects against simulated ischemic reperfusion injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:810371. doi: 10.1155/2014/810371.
- Gong W, Ma Y, Li A, Shi H, Nie S. Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction. *Cardiovasc Ther.* 2018 Oct;36(5):e12460. doi: 10.1111/1755-5922.12460.
- Dai ZL, Song YF, Tian Y, et al. Trimetazidine offers myocardial protection in elderly coronary artery disease patients undergoing non-cardiac surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021 Oct 1;21(1):473. doi: 10.1186/s12872-021-02287-w.
- Lee LC, Maurice DH, Baillie GS. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Future Med Chem.* 2013 Mar;5(4):451-64. doi: 10.4155/fmc.12.216.
- Belacel-Ouari M, Zhang L, Hubert F, et al. Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2017 Jul;35:118-128. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.03.025.
- Pereira L, Rehmann H, Lao DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 31;112(13):3991-6. doi: 10.1073/pnas.1416163112.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnam E, et al. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Sep;293(3):H1662-72. doi: 10.1152/ajpheart.00159.2007.
- Cazorla O, Lucas A, Poirier F, et al. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):14144-9. doi: 10.1073/pnas.0812536106.
- Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, et al. Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jan;52(1):283-91. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.10.016.
- Wu XM, Ou QY, Zhao W, et al. The GLP-1 analogue liraglutide protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis by activating the Epac-1/Akt pathway. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Nov;122(10):608-14. doi: 10.1055/s-0034-1384584.
- Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res.* 2017 Feb 17;120(4):645-657. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309859.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2008 Apr 25;102(8):959-65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164947.
- Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, et al. Specific interactions between Epac1,  $\beta$ -arrestin2 and PDE4D5 regulate  $\beta$ -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal.* 2013 Apr;25(4):970-80. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.12.007.
- Chen C, Du J, Feng W, et al.  $\beta$ -Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKC $\delta$ /p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):676-88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01785.x.
- Neef S, Heijman J, Otte K, et al. Chronic loss of inhibitor-1 diminishes cardiac RyR2 phosphorylation despite exaggerated CaMKII activity. *Nauryn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2017 Aug;390(8):857-862. doi: 10.1007/s00210-017-1376-1.
- Lezcano N, Mariangelo JIE, Vittone L, et al. Early effects of Epac depend on the fine-tuning of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Jan;114:1-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.10.005.
- Pereira L, Cheng H, Lao DH, et al. Epac2 mediates cardiac  $\beta$ 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and arrhythmia. *Circulation.* 2013 Feb 26;127(8):913-22. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.12.148619.
- Yang Z, Kirton HM, Al-Owais M, et al. Epac2-Rap1 Signaling Regulates Reactive Oxygen Species Production and Susceptibility to Cardiac Arrhythmias. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Jul 20;27(3):117-132. doi: 10.1089/ars.2015.6485.
- Tan YQ, Li J, Chen HW. Epac, a positive or negative signaling molecule in cardiovascular diseases. *Biomed Pharmacother.* 2022 Apr;148:112726. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112726.
- Slika H, Mansour H, Nasser SA, et al. Epac as a tractable therapeutic target. *Eur J Pharmacol.* 2023 Apr 15;945:175645. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175645.
- Мокров Г.В., Крыжановский С.А., Воробьева Т.Ю. и др. Производные пиридинол со свойствами Ерас-ингибиторов. Заявка на патент РФ № 2023131685. Дата приоритета: 04.12.2023. [Mokrov GV, Kryzhanovskii SA, Vorobyova TYu, et al. Pyridine derivatives with Epac inhibitor properties. Application for RF patent No. 2023131685. Priority date: 12/04/2023. (In Russ.)].
- Kryzhanovskii SA, Kolik LG, Tsorin IB, et al. Alcoholic Cardiomyopathy: Translation Model. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Sep;163(5):627-631. doi: 10.1007/s10517-017-3865-0.
- Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 1976 Jan;37(1):7-11. doi: 10.1016/0002-9149(76)90491-4.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Dec;18(12):1440-63. doi: 10.1016/j.echo.2005.10.005.
- Ruiz-Hurtado G, Morel E, Dominguez-Rodriguez A, et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 May;58:162-71. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.021.
- Pereira L, Bare DJ, Galice S, et al.  $\beta$ -Adrenergic induced SR Ca<sup>2+</sup> leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Jul;108:8-16. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.04.005.
- Крыжановский С.А., Никифорова Т.Д., Вититнова М.Б., Дурнев А.Д. Роль регуляторных белков Ерас в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Часть II. Роль белков Ерас в физиологии и патологии сердца. *Физиология человека.* 2020; 46(4):111-134. [Kryzhanovskii SA, Nikiforova TD, Vititnova MB, Durnev AD. EPAC Proteins and Their Role in the Physiological and Pathological Processes in the Cardiovascular System. Part II. The Role of EPAC Proteins in the Physiology and Pathology of the Heart. *Hum Physiol.* 2020;46(4):111-134. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0131164620040074.
- Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, et al. Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Feb;79:69-78. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.011.
- Драпкина О.М., Ашихмин Я.И., Ивашкин В.Т. Проблема алкогольной кардиомиопатии. *Врач.* 2005;8:48-50. [Drapkina OM, Ashihmin YaI, Ivashkin VT. The problem of alcoholic cardiomyopathy. *Vrach.* 2005;8:48-50. (In Russ.)].
- Ерохин Ю.А., Хритинин Д.Ф. Поражение сердца при хронической алкогольной интоксикации. *Вестник новых медицинских технологий.* 2003;10(4):19-20. [Erokhin YuA, Khritinin DF. Cardiac disturbances in the case of chronic alcohol intoxication. *Journal of New Medical Technologies.* 2003;10(4):19-20. (In Russ.)].
- Laudette M, Coluccia A, Sainte-Marie Y, et al. Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress. *Cardiovasc Res.* 2019 Oct 1;115(12):1766-1777. doi: 10.1093/cvr/cvz076.
- Insel PA, Murray F, Yokoyama U, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):447-56. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x.
- Cai W, Fujita T, Hidaka Y, et al. Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jun 17;475(1):1-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.123.

УДК: 615.03  
DOI: 10.37489/2587-7836-2024-4-49-54  
EDN: GMJBBI

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ  
ANALYTICAL ARTICLE



# Гепатопротекторные эффекты аскорбата лития на модели неалкогольной жировой болезни печени с перегрузкой железом

Богачева Т. Е.<sup>1</sup>, Калачева А. Г.<sup>1</sup>, Громова О. А.<sup>2</sup>, Торшин И. Ю.<sup>2</sup>, Гришина Т. Р.<sup>1</sup>, Гаранин А. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

## Аннотация

Аскорбат лития — соль лития с нормотимическими и нейропротекторными свойствами. На экспериментальной модели неалкогольной жировой болезни печени с мультиорганный патологией, вызванной сочетанным потреблением избыточного количества насыщенных жиров, углеводов и неорганической соли железа, применение аскорбата лития показало выраженные гепатопротекторные эффекты. Введение аскорбата лития снижало уровень ферритина и насыщение трансферрином, содержание сывороточного железа, АСТ, АЛТ, сывороточного креатинина, лейкоцитов и нормализовало уровень сывороточного белка и скорость клубочковой фильтрации. Аскорбат лития уменьшал повышенное содержание ретикулоцитов и тромбоцитов до контрольных значений, восстанавливал уровни витаминов С, В<sub>12</sub> в крови и снижал количество клеток Купфера в печени, которые были перегружены железом. Гепатопротекторный эффект аскорбата лития подтвержден гистологически. Способность нейропротектора аскорбата лития снижать уровень гемосидероза можно использовать при лечении пациентов с печёночной энцефалопатией.

**Ключевые слова:** нейропротекторы; жировая болезнь печени; гепатопротекция; перегрузка железом; гемосидероз; аскорбат лития

## Для цитирования:

Богачева Т. Е., Калачева А. Г., Громова О. А., Торшин И. Ю., Гришина Т. Р., Гаранин А. А. Гепатопротекторные эффекты аскорбата лития на модели неалкогольной жировой болезни печени с перегрузкой железом. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):49–54. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-49-54>. EDN: GMJBBI

Поступила: 31.10.2024. В доработанном виде: 30.11.2024. Принята к печати: 10.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

## Hepatoprotective effects of lithium ascorbate on a model of nonalcoholic fatty liver disease with iron overload

Tatiana E. Bogacheva<sup>1</sup>, Alla G. Kalacheva<sup>1</sup>, Olga A. Gromova<sup>2</sup>, Ivan Yu. Torshin<sup>2</sup>, Tatiana R. Grishina<sup>1</sup>, Alexey A. Garanin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ivanovo State Medical University of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal Research Center "Computer Science and Control", RAS, Moscow, Russian Federation

## Abstract

Lithium ascorbate is a lithium salt with normothymic and neuroprotective properties. In an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease with multiorgan pathology caused by combined consumption of excessive amounts of saturated fats, carbohydrates and inorganic iron salt, the use of lithium ascorbate showed pronounced hepatoprotective effects. The introduction of lithium ascorbate reduced the level of ferritin and transferrin saturation, the content of serum iron, AST, ALT, serum creatinine, leukocytes and normalized the level of serum protein and the rate of glomerular filtration. Lithium ascorbate reduced the increased content of reticulocytes and platelets to control values, restored the levels of vitamins C, B<sub>12</sub> in the blood and reduced the number of Kupffer cells in the liver, which were overloaded with iron. The hepatoprotective effect of lithium ascorbate was confirmed histologically. The ability of the neuroprotector lithium ascorbate to reduce the level of hemosiderosis can be used in the treatment of patients with hepatic encephalopathy.

**Keywords:** neuroprotectors; fatty liver disease; hepatoprotection; iron overload; hemosiderosis; lithium ascorbate

## For citations:

Bogacheva TE, Kalacheva AG, Gromova OA, Torshin IYu, Grishina TR, Garanin AA. Hepatoprotective effects of lithium ascorbate on a model of nonalcoholic fatty liver disease with iron overload. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):49–54. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-49-54>. EDN: GMJBBI

Received: 31.10.2024. Revision received: 30.11.2024. Accepted: 10.12.2024. Published: 30.12.2024.

## Введение / Introduction

Ионы лития участвуют в развитии нейропротекторного действия, вызывают повышение уровней эндогенных нейротрофических факторов. В проведённых исследованиях изучались фармакологические свойства соли лития с органическим анионом — аскорбата лития (LiAsc). Нейроцитологическое исследование показало прямое нейропротекторное действие LiAsc на культивируемые нейроны в условиях глутаматного стресса и уменьшение ишемического повреждения головного мозга, а также повышение сохранности миелиновых оболочек нейронов на модели алкогольной интоксикации у крыс [1].

Результаты экспериментальных исследований указывают на более широкий спектр фармакологических свойств LiAsc, чем просто нейропротекция. LiAsc может оказывать противовоспалительное действие за счёт модуляции метаболизма простагландинов, индукции липополисахаридной продукции TNF-альфа; антикоагулянтный, антигиперлипидемический и гипергликемический эффекты. Хемореактомный анализ показал, что анион аскорбата в LiAsc может быть гораздо более эффективным, чем анионы никотината и оксibuтирата в соответствующих солях лития, для снижения толерантности к глюкозе (за счёт активации рецептора PPAR, известного как белка-мишени для противодиабетических препаратов) [2]. Последний эффект подтверждён в сравнительном исследовании эффектов аскорбата и карбоната лития на модели аллоксанового диабета: применение LiAsc было статистически значимо связано с увеличением выживаемости животных и снижением гипергликемии [3].

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — широко распространённое заболевание, возникающее в результате нарушения питания (избыток жиров и простых углеводов, дефицит микроэлементов), токсической нагрузки на печень и т. д. Диета с чрезмерным потреблением пальмового масла способствовала развитию гистологически подтверждённого стеатогепатоза, характеризующегося жировой дистрофией гепатоцитов, локализующихся преимущественно в перипортальной зоне печёночной дольки [4]. В сочетании с другими факторами, например, при переизбытке железа по ятрогенным или генетическим причинам, НАЖБП развивается быстрее и прогрессирует в полиорганную патологию, связанную с повреждением печени, почек, сердца, головного мозга и других органов. Перегрузка железом является одним из наиболее трудно поддающихся лечению осложнений НАЖБП, поскольку инициирует образование активных форм кислорода (АФК) и окислительный стресс, резистентность к инсулину и провоспалительные реакции [5, 6].

Известно, что НАЖБП и перегрузка печени железом усугубляются высоким потреблением фруктозы [7]. Избыток пищевой фруктозы стимулирует быстрое накопление внутривнутрипечёночного жира, окислительный

стресс, митохондриальную дисфункцию гепатоцитов [8] и развитие резистентности к инсулину [9]. Пациенты с НАЖБП и/или ожирением потребляют почти в 2 раза больше безалкогольных напитков по сравнению со здоровыми людьми [10–14]. Следовательно, использование рациона, богатого фруктозой, также является важным направлением для разработки моделей НАЖБП.

Целью данной работы было разработка модели НАЖБП с полиорганной патологией, вызванной сочетанным потреблением избыточного количества насыщенных жиров, углеводов с перегрузкой железом и изучение гепатопротекторных эффектов LiAsc.

## Материалы и методы / Materials and methods

Разработка модели НАЖБП с перегрузкой железом была основана на модели НАЖБП, вызванной пальмовым маслом [5]. Эксперименты были проведены на 24 белых крысах-самцах массой 300–400 г. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утверждённым санитарным врачом РФ от 29.08.2014 №51 об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Животные были разделены на 3 группы. Первая группа ( $n = 6$ ) — интактный контроль (на стандартной диете и чистой питьевой воде). Во второй ( $n = 12$ ) и третьей ( $n = 6$ ) группах животных воспроизводилась модель перегрузки печени железом в условиях добавления в диету насыщенных жиров и фруктозы. Для воспроизведения модели особям внутрибрюшинно вводили химически чистое двухвалентное сернокислое железо (пр-во АО «ЛенРеактив», паспорт № 070051-81) в дозе 50 мг/кг/сутки в течение 12 дней. Одновременно в рацион питания добавляли твёрдую фракцию пальмового масла (CandleM, Индонезия) в дозе 30 г/кг/сутки. Раствор фруктозы (ООО «Компания «Сладкий мир», ТУ 10.86.10-027-72315488-2019. партия 210723) в дозе 1 г/кг/сутки использовался вместо питьевой воды в течение 12 суток. На 13-й день исследования животных первой и второй групп ( $n = 6$ ) наркотизировали, проводили забор крови для биохимического исследования и секционного материала (печени, почек, мозг, сердце) для патогистологического исследования. После воспроизведения модели в группах 2 и 3 животные переводились на стандартную диету и обычный питьевой режим. В третьей группе крысам с 13-го дня исследования вводили LiAsc в дозе 30 мг/кг/сутки перорально в течение 4 недель. На 41-й день исследования животных второй и третьей групп наркотизировали, проводили забор крови и секционного материала.

За животными наблюдали ежедневно, регистрировали их общее состояние, аппетит, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной

активности, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, количество и консистенцию кала.

В сыворотке крови определялись более 20 биохимических показателей: ферритин, насыщение трансферрина, железо сыворотки, ретикулоциты, фракции ретикулоцитов, лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, гематокрит, объём эритроцита, гемоглобин эритроцита, содержание гемоглобина в эритроците, тромбоциты, индекс mentzer, индекс sirdah, фолаты сыворотки, белок сыворотки, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), креатинин сыворотки, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), билирубин общий и прямой, витамины В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub>.

Лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, гематокрит, средний объём эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, тромбоциты, ретикулоциты определялись проточной цитофлуориметрией (цитофлуориметр BC-6200, Mindray, Китай). Остальные биохимические показатели определялись на универсальном анализаторе крови Cobas 6000 (пр-во Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием различных подходов. Ферритин и трансферрин определялись иммунотурбидиметрией; железо сыворотки, общий белок, билирубин общий и прямой — колориметрией; АСТ и АЛТ — УФ кинетическим тестом, креатинин сыворотки и СКФ — «кинетическим» методом Яффе; витамин В<sub>12</sub> — иммунохемилюминесценцией, витамин В<sub>9</sub> (фолаты) — твердофазным хемилюминесцентным иммуноферментным анализом.

Материал для гистологического исследования получали в ходе аутопсии экспериментальных животных. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Биовитрум» окрашены по Перльсу для выявления в тканях трёхвалентного железа, результатом проведённой реакции должно быть образование окрашенной в синий цвет соли — берлинской лазури; был проведён морфометрический анализ посредством подсчёта среднего числа купферовских клеток, в цитоплазме которых содержится берлинская лазурь, на одно поле зрения.

Результаты были обработаны с использованием программных пакетов Excel 2013 и Statistica 10.0.

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

### Клиническое наблюдение за общим состоянием животных / Clinical observation of the general condition of animals

Основная последовательность эксперимента включала клиническое наблюдение за общим состоянием животных. Животные первой группы имели чистую, белую, гладкую шерсть. Животные были активны, неагрессивны, а потребление ими пищи и воды не было ниже установленных норм кормления. Наблюдался нормальный мышечный тонус. Во второй и третьей

группах, начиная с 3-го дня после воспроизведения модели, животные стали потреблять меньше корма, пить больше раствор фруктозы; у них появились признаки полиурии (мокрая, “взъерошенная” шерсть, что вызывало необходимость частой смены наполнителя из опилок), обезвоживания (сухая, тусклая кожа и слизистые оболочки глаз); отмечалось снижение аппетита и двигательной активности. Крысы становились более агрессивными. У животных третьей (LiAsc) группы, начиная с 15-го дня исследования, наблюдалось повышение двигательной активности и нормализация мышечного тонуса. На четвёртой неделе исследования в третьей группе не было обнаружено признаков полиурии и обезвоживания, шерсть крыс была чистой и сухой. Крысы стали спокойнее. Потребление корма и воды было не ниже установленных норм кормления.

### Показатели обмена железа / Indicators of iron metabolism

Анализ показателей обмена железа показал, что значения трёх “быстрых” параметров метаболизма железа (ферритин, коэффициент насыщения трансферрином, сывороточное железо) в модели резко возросли по сравнению с интактным контролем: ферритин повысился с  $201 \pm 45$  мкг/л до  $229 \pm 13$  мкг/л (13-й день,  $p < 0,0001$ ) и далее до  $254 \pm 12$  мкг/л (модель, 41-й день,  $p < 0,0001$ ). Значения коэффициента насыщения трансферрином увеличились с  $57 \pm 8$  % (интактные) до  $88 \pm 15$  % (13-й день,  $p < 0,0001$ ) и незначительно снизились на 41-й день — до  $81 \pm 27$  % ( $p < 0,0001$ ). Уровень железа в сыворотке крови повысился с  $28 \pm 5$  мкмоль/л (интактный) до  $50 \pm 10$  мкмоль/л на 13- и 41-й дни ( $p < 0,0001$ ).

На 41-й день исследования применение LiAsc привело к значительному снижению уровня ферритина ( $203 \pm 4$  мкг/л,  $p < 0,0001$ ), коэффициента насыщения трансферрином ( $16 \pm 8$  %,  $p < 0,00005$ ) и уровня сывороточного железа ( $13 \pm 4$  мкмоль/л,  $p < 0,0001$ ).

В то же время характер изменений уровней «медленного» показателя гемоглобина в крови существенно отличался от изменений «быстрых» показателей: при воспроизведении модели уровни гемоглобина значительно снижались (интактные  $148,8 \pm 4,5$  г/л, модель день 13:  $130,2 \pm 17,5$  г/л,  $p = 0,02$ ), восстанавливаясь к 41-му дню ( $143,2 \pm 5,7$  г/л). LiAsc не способствовали восстановлению уровня гемоглобина ( $p > 0,1$ ).

Данные гистоморфометрии (количество/процент клеток Купфера, в цитоплазме которых было обнаружено окрашивание на железо) представляют собой ещё один независимый показатель эффективности удаления избытка железа с помощью LiAsc. По сравнению с интактной группой ( $16,7 \pm 1,4$ ) количество клеток, окрашенных берлинской лазурью, после воспроизведения модели значительно увеличилось уже на 13-й день ( $24,2 \pm 3,1$ ;  $p = 0,00048$ ), незначительно снижаясь к 41-му дню ( $21,7 \pm 3,9$ ). LiAsc способствовал

снижению количества клеток Купфера, окрашенных берлинской лазурью ( $18,8 \pm 2,5$ ;  $p = 0,1$  по сравнению с интактной группой).

#### **Показатели общего анализа крови / Indicators of the general blood test**

При воспроизведении модели было отмечено заметное снижение общего количества эритроцитов (в интактном состоянии  $8,7 \pm 0,8$  трлн клеток/л, модель на 13-й день —  $7,4 \pm 1,2$  трлн/л,  $p = 0,022$ , на 41-й день —  $7,1 \pm 1,4$  трлн/л). В то же время средний объём эритроцитов не изменился (интактный  $52,6 \pm 1,4$  фл, модель, дни 13/41 —  $50 \pm 5$  фл); отмечено значительное увеличение среднего количества гемоглобина в эритроците (интактный  $15,8 \pm 0,3$  пг, модель, 13/41 день —  $16,2 \pm 0,1$  пг,  $p = 0,013$ ) и тенденция к увеличению средней концентрации гемоглобина в эритроците (интактный  $286 \pm 31$  г/л, модель 13/41 сутки —  $308 \pm 6$  г/л,  $p = 0,06$ ). Применение LiAsc привело к значительному снижению среднего объёма эритроцитов ( $39,3 \pm 16$  фл,  $p = 0,05$ ) на фоне снижения среднего количества гемоглобина в эритроцитах по отношению к норме ( $273 \pm 17$  г/л,  $p = 0,001$ ).

Все три показателя, характеризующие различные аспекты содержания ретикулоцитов в показателях крови (процент ретикулоцитов, содержание ретикулоцитов, фракция ретикулоцитов), значительно увеличились после воспроизведения модели: процент ретикулоцитов увеличился (интактные  $3,1 \pm 0,7$  %, модель 13-й день —  $5,2 \pm 1,0$  %,  $p = 0,00115$ ), общее количество ретикулоцитов (в интактном состоянии  $288 \pm 61$  млрд/л, модель 13-й день —  $433 \pm 116$  млрд/л,  $p = 0,014$ ), фракция ретикулоцитов (в интактном состоянии  $43,3 \pm 6,1$  %, модель 13-й день —  $54,5 \pm 7,0$  %,  $p = 0,007$ ), и статистически незначимое снижение всех трёх показателей к 41-му дню ( $p > 0,08$ ). На 41-й день LiAsc стимулировал снижение общего количества ретикулоцитов и фракции ретикулоцитов в пределах нормы (количество ретикулоцитов  $291 \pm 45$  млрд/л,  $p = 0,0052$ ; фракция ретикулоцитов  $51 \pm 6$  %,  $p = 0,0275$ ).

#### **Биохимические показатели полиорганной дисфункции / Biochemical parameters of multiple organ dysfunction**

Анализ других биохимических показателей, связанных с характеристикой полиорганной дисфункции (воспаление и тромбообразование, функция почек, печени) показал положительный эффект при лечении LiAsc.

#### **Воспаление и образование тромбов / Inflammation and formation of blood clots**

Уровень лейкоцитов у интактных животных составлял  $4,6 \pm 1,3$  млрд клеток/л, а во второй группе он увеличивался в среднем на  $+1,6$  млрд/л в сутки 13 ( $6,2 \pm 1,0$  млрд/л,  $p = 0,022$ ) с тенденцией к повышению к 41-му дню ( $6,9 \pm 0,8$  млрд/л,  $p = 0,067$ ).

В третьей группе введение LiAsc привело к снижению уровня лейкоцитов до нормального уровня, наблюдаемого у интактных животных, более выраженное снижение количества лейкоцитов наблюдалось на 41-й день ( $3,7 \pm 0,6$  млрд/л,  $p < 0,0001$ ) с тенденцией к значительному отличию от показателей у интактных животных ( $p = 0,068$ ).

Уровень тромбоцитов в интактной группе составил  $509,7 \pm 121,6$  млрд/л и увеличился до  $860,8 \pm 156,2$  млрд/л ( $p = 0,00083$ ) на 13-й день после воспроизведения модели, с незначительным снижением к 41-му дню ( $820,2 \pm 50,5$  млрд/л,  $p > 0,1$ ). LiAsc способствовал нормализации уровня тромбоцитов ( $681 \pm 23$  млрд/л,  $p = 0,00024$ ).

#### **Функция почек / Kidney function**

Уровень креатинина в сыворотке крови и скорость клубочковой фильтрации (СКФ) являются показателями функции почек. При воспроизведении модели уровни креатинина и СКФ значительно снизились к 13-му дню без существенных изменений к 41-му дню, что указывает на развитие повреждения почек вследствие перегрузки железом на фоне перегрузки липидного и углеводного обмена. Уровень креатинина в сыворотке крови снизился с  $35,7 \pm 1,2$  мкмоль/л у интактных животных до  $22,5 \pm 2,4$  мкмоль/л у опытных животных второй группы на 13-й день ( $p < 0,00001$ ), не изменившись к 41-му дню ( $23,3 \pm 1,4$  мкмоль/л). LiAsc способствовал восстановлению функции почек. Эффект LiAsc на 41-й день был ещё более выраженным ( $19,2 \pm 1,2$  мкмоль/л,  $p = 0,00011$ ).

У интактных животных СКФ составляла  $169 \pm 5$  мл/мин/ $1,73 \text{ м}^2$ , а при воспроизведении модели она снизилась до  $142,4 \pm 12,3$  мл/мин/ $1,73 \text{ м}^2$  на 13-й день ( $p = 0,0011$ ) с частичным улучшением на 41-й день ( $154,1 \pm 7,1$  мл/мин/ $1,73 \text{ м}^2$ ,  $p = 0,04$ ). LiAsc способствовал значительному восстановлению СКФ, увеличивая её до  $198,1 \pm 8,5$  мл/мин/ $1,73 \text{ м}^2$  ( $p < 0,00001$ ), что было даже выше, чем у интактных животных ( $p = 0,00005$ ).

#### **Функция печени / Liver function**

Уровень АСТ у интактных животных составил  $114,9 \pm 27,3$  ед/л. При воспроизведении модели было отмечено более чем двукратное повышение АСТ до  $299,9 \pm 27,9$  ед/л ( $p < 0,000001$ ) на 13-й день и без изменений на 41-й день ( $301,3 \pm 30,3$  ед/л). LiAsc способствовал достижению уровней АСТ, аналогичных таковым у интактных животных на 41-й день ( $121,9 \pm 2,0$  ед/л,  $p = 0,000013$ ).

Уровни АЛТ изменялись аналогичным образом: по сравнению с интактными ( $22,8 \pm 3,2$  Ед/л) воспроизведение модели привело к значительному повышению АЛТ на 13-й день ( $54,1 \pm 9,8$  ед/л,  $p = 0,00014$ ), без изменений на 41-й день ( $58,7 \pm 5,5$  ед/л). LiAsc способствовал нормализации АЛТ ( $34,8 \pm 1,7$  ед/л,  $p = 0,000027$ ).

Воспроизведение модели привело к снижению уровня общего белка на 13-й день (интактные  $57,0 \pm 4,7$  г/л, модель  $45,5 \pm 5,8$  г/л,  $p = 0,002$ ), без изменений на 41-й день ( $46,2 \pm 4,6$  г/л). Аскорбат лития положительно влиял на биосинтетическую функцию печени, способствуя восстановлению уровня общего белка к 41-му дню ( $52,5 \pm 1,0$  г/л,  $p = 0,01$ ).

Во второй группе уровень фолиевой кислоты в крови показал тенденцию к повышению к 13-му дню ( $62,4 \pm 5,6$  нмоль/л, интактные  $52,5 \pm 15,0$  нмоль/л,  $p = 0,078$ ). Динамика повышения уровня фолиевой кислоты достигла статистической значимости к 41-му дню ( $67,6 \pm 3,1$  нмоль/л,  $p = 0,043$ ). К 41-му дню LiAsc способствовал её снижению до нормального уровня ( $49,6 \pm 2,9$  нмоль/л,  $p < 0,000005$  по сравнению с моделью,  $p > 0,1$  — по сравнению с интактной группой).

Повышение уровня фолиевой кислоты во второй группе животных сочеталось со снижением уровня витамина  $B_{12}$  в крови (интактные  $264,5 \pm 58,1$  пг/мл, модель, 13-й день  $190,5 \pm 7,1$  пг/мл,  $p = 0,013$ , без динамики к 41-му дню —  $189,7 \pm 4,8$  пг/мл). LiAsc способствовал нормализации уровня витамина  $B_{12}$  до уровня, значительно превышающего уровень у интактных животных ( $325,3 \pm 23,1$  пг/мл,  $p < 0,00001$  по сравнению с моделью на 41-й день,  $p < 0,001$  — по сравнению с интактными животными).

Таким образом, введение LiAsc снижало уровень ферритина, насыщения трансферрином, сывороточного железа, АСТ, АЛТ, сывороточного креатинина, лейкоцитов и нормализовало уровень сывороточного белка и скорость клубочковой фильтрации. LiAsc уменьшал повышенное содержание ретикулоцитов и тромбоцитов до контрольных значений, нормализовал уровни витаминов С,  $B_{12}$  в крови и снижал количество клеток Купфера в печени, которые были перегружены железом.

Во всех наблюдениях контрольной группы микроскопическая структура ткани печени, почек, мозга и

миокарда соответствовала нормальному состоянию. При воспроизведении модели наблюдалась жировая дистрофия гепатоцитов, макрофагальная активность звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера), воспалительный клеточный инфильтрат; в почках — инфильтрация железосодержащих продуктов в цитоплазме нефроцитов; в головном мозге и миокарде наблюдались очаговые зоны накопления мелких комочков берлинской лазури при отсутствии морфологических признаков токсического воздействия этих органов. В третьей группе к 41-му дню исследования обнаружено: уменьшение количества клеток Купфера; единичные лимфоциты в ткани печени; в цитоплазме нефроцитов — небольшие скопления частиц, окрашенных берлинской лазурью; в периваскулярном пространстве нервной ткани коры головного мозга — небольшие комочки берлинской лазури; в миокарде отсутствие железосодержащих продуктов.

### Заключение / Conclusion

При воспроизведении модели неалкогольной жировой болезни печени с перегрузкой железом были установлены изменения в печени, почках, головном мозге и миокарде, характерные для полиорганной патологии. Аскорбат лития предотвращал образование стабильных железосодержащих аддуктов (например, гемосидерина), снижал воспаление, гипераккумуляцию липидов и перегрузку организма железом в различных органах. В целом, в представленном исследовании показаны гепатопротекторные эффекты нейропротекторной соли аскорбата лития. Результаты могут быть полезны при лечении неврологических пациентов, у которых также имеются склонность к перегрузке железом и к повреждению печени (что имеет место, например, при печёночной энцефалопатии).

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Богачева Татьяна Евгеньевна** — к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: [tatiana.boga4iova@yandex.ru](mailto:tatiana.boga4iova@yandex.ru)

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

**Калачева Алла Геннадьевна** — к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6144-5781>

**Tatiana E. Bogacheva** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

*Corresponding autor*

e-mail: [tatiana.boga4iova@yandex.ru](mailto:tatiana.boga4iova@yandex.ru)

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5042-4886>

**Alla G. Kalacheva** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6144-5781>

**Громова Ольга Алексеевна** — д. м. н., профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
РИНЦ SPIN-код: 6317-9833

**Olga A. Gromova** — Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
RSCI SPIN code: 6317-9833

**Торшин Иван Юрьевич** — к. ф-м. н., к. х. н., в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>  
РИНЦ SPIN-код: 1375-1114

**Ivan Yu. Torshin** — PhD, Cand. Sci. (Physics and Mathematics), Cand. Sci. (Chemistry), Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>  
RSCI SPIN code: 1375-1114

**Гришина Татьяна Романовна** — д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИВГМА Минздрава России, Иваново, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-2348-5793>

**Tatiana R. Grishina** — Dr. Sci. (Med.), Professor Associate Professor of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-2348-5793>

**Гаранин Алексей Алексеевич** — ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-6673-554X>

**Alexey A. Garanin** — Assistant Professor, Chair of Pharmacology FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-6673-554X>

## Список литературы / References

1. Torshin IY, Gromova OA, Ostrenko KS, et al. Lithium Ascorbate as a Promising Neuroprotector: Fundamental and Experimental Studies of an Organic Lithium Salt. *Molecules*. 2022 Mar 30;27(7):2253. doi: 10.3390/molecules27072253.
2. Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., и др. Хемореактомное моделирование эффектов аскорбата, никотината, оксибутирата, комената и карбоната лития. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(3):47-57. [Torshin IYu, Sardaryan IS, Gromova OA, et al. Chemoreactome modeling the effects of anions of lithium salts ascorbate, nicotinate, hydroxybutyrate komenata and lithium carbonate. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016;(3):47-57. (In Russ.)].
3. Назаренко О.А., Демидов В.И., Громова О.А., и др. Сравнительное изучение нейропротекторной активности соединений лития и их влияния на течение экспериментального аллоксанового сахарного диабета у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(3):40-47. [Nazarenko OA, Demidov VI, Gromova OA, et al. Comparative study of the neuroprotective activity of lithium compounds and their effect on the course of experimental alloxan diabetes mellitus in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(3):40-47. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2020-3-40-47.
4. Богачева Т.Е., Калачева А.Г., Громова О.А., и др. Изучение эффективности препарата Лаеннек при повреждении печени пальмовым маслом у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):23-31. [Bogacheva TE, Kalacheva AG, Gromova OA, et al. Study of the effectiveness of the drug Laenек in case of liver damage by palm oil in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):23-31. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2023-4-23-31.
5. Zhuo Z, Fang S, Hu Q, et al. Digital gene expression profiling analysis of duodenum transcriptomes in SD rats administered ferrous sulfate or ferrous glycine chelate by gavage. *Sci Rep*. 2016 Nov 30;6:37923. doi: 10.1038/srep37923.

6. Luo G, Xiang L, Xiao L. Acetyl-CoA Deficiency Is Involved in the Regulation of Iron Overload on Lipid Metabolism in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Molecules*. 2022 Aug 4;27(15):4966. doi: 10.3390/molecules27154966.
7. Hilton C, Sabaratnam R, Drakesmith H, Karpe F. Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. *Int J Obes (Lond)*. 2023 Jul;47(7):554-563. doi: 10.1038/s41366-023-01299-0.
8. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018 May;68(5):1063-1075. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019.
9. Ma J, Sloan M, Fox CS, et al. Sugar-sweetened beverage consumption is associated with abdominal fat partitioning in healthy adults. *J Nutr*. 2014 Aug;144(8):1283-90. doi: 10.3945/jn.113.188599.
10. DiStefano JK. Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Jun;77(11):2079-2090. doi: 10.1007/s00018-019-03390-0. P
11. Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2525-31. doi: 10.1002/hep.26299.
12. Kanerva N, Sandboge S, Kaartinen NE, et al. Higher fructose intake is inversely associated with risk of nonalcoholic fatty liver disease in older Finnish adults. *Am J Clin Nutr*. 2014 Oct;100(4):1133-8. doi: 10.3945/ajcn.114.086074.
13. Ma J, Fox CS, Jacques PF, et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol*. 2015 Aug;63(2):462-9. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.032.
14. Шептулина А.Ф., Голубева Ю.А., Драпкина О.М. Фруктоза и ее влияние на обмен веществ и риск развития неалкогольной жировой болезни печени. *Доказательная гастроэнтерология*. 2023;12(1):85-92. [Sheptulina AF, Golubeva YuA, Drapkina OM. Fructose consumption as a risk factor for metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2023;12(1):85-92. (In Russ.)]. doi: 10.17116/dokgastro20231201185.

УДК: 577.112.6:615.214.31  
DOI: 10.37489/2587-7836-2024-4-55-62  
EDN: ZPSOJM

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ  
ANALYTICAL ARTICLE



# Вовлечённость TRK-рецепторов в ноотропный эффект цикло-пролилглицина

Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Поварнина П. Ю.,  
Гудашева Т. А., Дорощеев В. Л.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,  
Москва, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Нейропептид цикло-пролилглицин (ЦПГ) — эндогенный дипептидный аналог ноотропа пирacetам. Экспериментально показано, что ЦПГ (сконструирован и синтезирован в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий») обладает спектром фармакологических эффектов, характерным для пирacetам. В исследованиях, направленных на изучение механизмов действия ЦПГ, было установлено, что глутаматные AMPA-рецепторы и нейротрофиновые Trk-рецепторы вовлечены в анксиолитический, нейропротекторный и антигипоксический эффекты ЦПГ. Однако механизм ноотропного действия ЦПГ не изучен.

**Цель работы.** Проверить гипотезу о вовлечённости Trk-рецепторов в ноотропный эффект ЦПГ на модели амнезии у мышей, вызванной введением скополамина.

**Материалы и методы.** Ноотропную активность ЦПГ (1 мг/кг, в/б) изучали на модели амнезии у мышей, вызванной скополамином (0,75 мг/кг, подкожно). Использовали метод фармакологического ингибиторного анализа с применением блокатора Trk-рецепторов K252a (5 мкг/кг, в/б). Выраженность амнезии оценивали в тесте «Распознавание нового объекта (РНО)».

**Результаты.** Было установлено, что скополамин нарушает распознавание нового объекта у мышей в тесте РНО. ЦПГ препятствует развитию амнезии, вызванной скополамином, а блокатор Trk-рецепторов K252a блокирует этот эффект.

**Выводы.** Trk-рецепторы вовлечены в ноотропный эффект нейропептида ЦПГ.

**Ключевые слова:** цикло-пролилглицин; ноотропная активность; скополаминовая амнезия; распознавание нового объекта; K252a; Trk

## Для цитирования:

Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А., Дорощеев В. Л. Вовлечённость TRK-рецепторов в ноотропный эффект цикло-пролилглицина. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):55–62. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-55-62>. EDN: ZPSOJM

Поступила: 12.11.2024. В доработанном виде: 11.12.2024. Принята к печати: 23.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

## Involvement of TRK receptors in the nootropic effect of cycloprolylglycine

Olga N. Vorontsova, Anna G. Alyaeva, Ksenia N. Koliashnikova, Polina Yu. Povarnina, Tatiana A. Gudashева, Vladimir L. Dorofeev  
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Background.** The neuropeptide cycloprolylglycine (CPG) is an endogenous dipeptide analogue of the nootropic piracetam. It has been experimentally shown that CPG (designed and synthesized at the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center of Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies") has a spectrum of pharmacological effects characteristic of piracetam. In studies aimed at studying the mechanisms of action of CPG, it was found that glutamate AMPA receptors and neurotrophin Trk receptors are involved in the anxiolytic, neuroprotective and antihypoxic effects of CPG. However, the mechanism of nootropic action of CPG has not been studied.

**Objective.** To test the hypothesis about the involvement of Trk receptors in the nootropic effect of CPG in a model of amnesia in mice induced by the administration of scopolamine.

**Material and methods.** The nootropic activity of CPG (1 mg/kg, i.p.) was studied in a model of amnesia in mice induced by scopolamine (0.75 mg/kg, subcutaneously). A pharmacological inhibitory assay was used with the Trk receptor blocker K252a (5 µg/kg, i.p.). The severity of amnesia was assessed using the Novel Object Recognition (NOR) test.

**Results.** Scopolamine was found to impair novel object recognition in mice in the NOR test. CPG prevents the development of amnesia induced by scopolamine, and Trk receptor blocker K252a blocks this effect.

**Conclusion.** Trk receptors are involved in the nootropic effect of the neuropeptide CPG.

**Keywords:** cyclo-prolylglycine; nootropic activity; scopolamine amnesia; novel object recognition; K252a; Trk

## For citations:

Vorontsova ON, Alyaeva AG, Koliashnikova KN, Povarnina PYu, Gudashева TA, Dorofeev VL. Involvement of TRK receptors in the nootropic effect of cycloprolylglycine. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):55–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-55-62>. EDN: ZPSOJM

Received: 12.11.2024. Revision received: 11.12.2024. Accepted: 23.12.2024. Published: 30.12.2024.

## Введение / Introduction

Цикло-пролилглицин (ЦПГ) — эндогенный дипептидный аналог классического ноотропа пиретама [1]. Экспериментально было показано, что ЦПГ, подобно пиретаму, обладает ноотропным [1], анксиолитическим [2], антидепрессантоподобным [3], нейротропным и антигипоксическим [4] эффектами.

На основе электрофизиологических данных, полученных на изолированных нейронах, была высказана гипотеза, что ЦПГ является положительным модулятором AMPA-рецепторов [5]. Впоследствии в экспериментах *in vitro* было установлено, что ЦПГ, аналогично другим ампакинам (синтетические положительные модуляторы AMPA-рецепторов), увеличивает уровень мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в норме и на различных моделях повреждения нейронов [6]. Методами вычислительной биологии показано, что ЦПГ способен непосредственно взаимодействовать с сайтами связывания пиретама AMPA-рецепторов, но с более высокой аффинностью [7]. С помощью фармакологического ингибиторного анализа была выявлена вовлечённость AMPA- и нейротрофиновых Trk-рецепторов в анксиолитический, нейротропный и антигипоксический эффекты ЦПГ: введение как конкурентных антагонистов AMPA-рецепторов (DNQX или GYKI 52466), так и блокатора Trk-рецепторов K252a, препятствовало проявлению этих эффектов [8–10]. Однако механизм ноотропного действия ЦПГ не был изучен.

Холинергический дефицит, индуцируемый скополамином, широко используется для моделирования когнитивных дисфункций, характерных для болезни Альцгеймера [11]. Недавно нами показано [12], что ЦПГ предотвращает у крыс амнезию, вызванную введением скополамина, в тесте распознавания нового объекта (РНО).

Целью данной работы было изучение вовлечённости Trk-рецепторов в ноотропное действие ЦПГ в тесте РНО на мышах в условиях скополаминовой амнезии с помощью фармакологического ингибиторного анализа с использованием блокатора Trk соединения K252a.

## Материалы и методы / Materials and methods

**Вещества.** Циклический дипептид цикло-L-пролилглицин (ЦПГ; т.пл. 204–207 °С,  $[\alpha]^{20D} -202^\circ$  (с 1, вода), ПМР спектр (ДМСО- $d_6$  + CF<sub>3</sub>COOD),  $\delta$ , м.д.: 1,8–2,2 (4H, м, C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>2</sub>(Pro), C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>(Pro)), 3,37 (2H, м, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>(Pro)), 3,54 и 4,0 (2H, 2 д, C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>2</sub>(Gly)), 4,11 (1H, д.д., C <sup>$\alpha$</sup> H(Pro)), 8,09 (1H, уш с, NH)) был синтезирован в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» как описано ранее [13].

Скополамин (scopolamine hydrobromide trihydrate) получен из Acros organics BVBA (Бельгия), K252a из

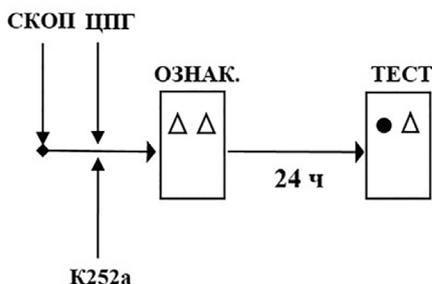
Sigma-Aldrich» (США), ДМСО «х.ч.» из ТД «Химмед» (Россия).

**Животные.** Исследование выполнено на мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 20–22 г, полученных в филиале «Андреевка» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Эксперименты с животными проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственными стандартами серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите Позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол № 2 от 30 января 2023 г.).

**Схема эксперимента.** В серии предварительных экспериментов были определены доза и режим введения скополамина для индукции амнезии у мышей в тесте РНО; доза ЦПГ, противодействующая скополаминовой амнезии в тесте РНО; доза K252a, в которой соединение само по себе не влияет на поведение мышей в данном тесте.

Скополамин вводили мышам за 30 мин до этапа ознакомления с объектами в дозе 0,75 мг/кг, подкожно (п/к) в физиологическом растворе. Нейропептид ЦПГ вводили мышам через 15 минут после введения скополамина в дозе 1 мг/кг, в/б в дистиллированной воде. K252a вводили мышам одновременно с введением ЦПГ (в другое место брюшины) в дозе 5 мкг/кг, в/б в 0,1 % растворе ДМСО. Контрольные животные получали растворители: физиологический раствор (п/к), воду и ДМСО (в/б) вместо активных веществ согласно схеме эксперимента (рис. 1). Каждая экспериментальная группа состояла из 10–12 особей.

**Тест распознавания нового объекта.** Узнавание объектов и поддерживающая его эпизодическая память является жизненно важной когнитивной функцией, позволяющей животным и человеку отличать новые раздражители от тех, с которыми они сталкивались ранее. Распознавание объекта с одной пробы включает в себя процессы запоминания характеристик одного типа объектов и обнаружения принципиально нового объекта. Узнавание (отнесение к категории «знакомый») происходит в момент повторного восприятия объекта. Известно, что грызуны обследуют новый объект дольше, чем знакомый. «Безусловное» предпочтение нового объекта указывает на то, что представление знакомого объекта уже существует в памяти. Психические процессы у грызунов, связанные



**Рис. 1.** Схема эксперимента

**Fig. 1.** Study design

*Примечания:* Животным вводили Скополамин (0,75 мг/кг, п/к), а через 15 минут ЦПГ (1 мг/кг, в/б) и К252а (5 мкг/кг, в/б). Ещё через 15 мин животных помещали в arenas для ознакомления с двумя идентичными объектами на 5 мин (этап ознакомления). Через 24 часа животных снова помещали в arenas с одним знакомым и одним новым объектом на 7 мин (этап тестирования).

*Notes:* Animals were injected with scopolamine (0.75 mg/kg, s.c.), followed by an injection of CPG (1 mg/kg, i.p.) and K252a (5 µg/kg, i.p.) 15 minutes later. Another 15 minutes after that, the animals were placed in arenas with identical objects for 5 minutes (familiarization phase). Twenty-four hours after that, the animals were again placed in arenas with two objects: one new and one familiar for 7 minutes (testing phase).

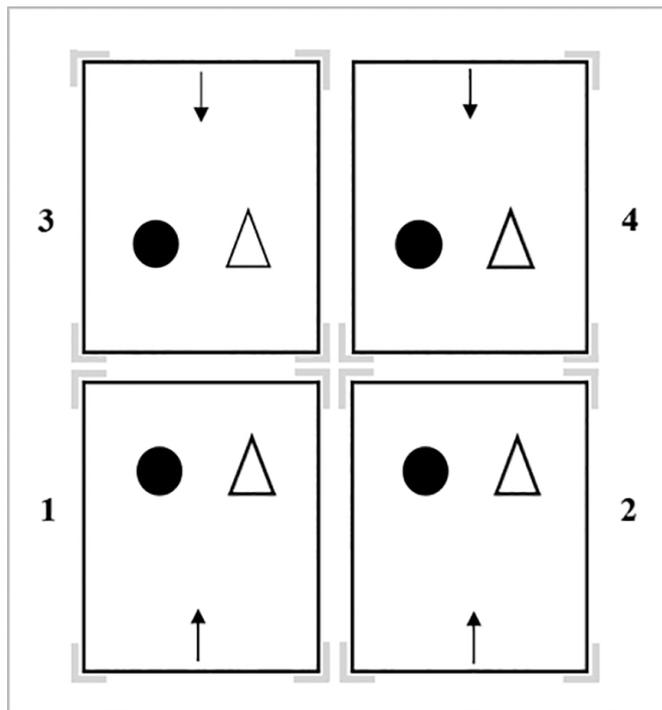
с распознаванием нового объекта с одной пробы, изучают в тесте РНО [14].

Для проведения теста РНО использовали установку «Мультиарена», состоящую из 4 непрозрачных арен (ванночек от клеток содержания) и прозрачных крышек с отверстиями для циркуляции воздуха (рис. 2). При подготовке к каждому этапу теста чистые arenas наполняли свежим знакомым подстилом (толщина подстила 0,5 см) для облегчения исследовательского поведения мышей. После тестирования каждого животного из арен вынимали подстил, arenas протирали водным раствором перекиси водорода (3 %), далее промывали водой и насухо протирали салфетками.

В эксперименте использовали 3 вида объектов, различающихся по форме, размеру и внешнему виду (рис. 3). После каждого применения объекты опускали в водный раствор перекиси водорода (3 %), далее промывали водой и насухо протирали салфетками.

**Этап ознакомления.** Животное вынимали из домашней клетки и помещали в арену с подстилом и двумя одинаковыми предустановленными объектами (например, O1/O1). Сверху арену накрывали прозрачной крышкой. Через 5 мин с момента посадки крышку снимали и животное аккуратно перемещали обратно в домашнюю клетку.

**Этап тестирования.** Через 24 ч после ознакомления с объектами в чистой арене размещали один ранее предъявляемый объект и один новый объект (например, O1/O2). Животное вынимали из домашней клетки, помещали в арену с чистым подстилом и двумя разными предустановленными объектами на 7 мин. Увеличение времени тестирования на 2 мин по сравнению со временем этапа ознакомления связано



**Рис. 2.** Установка «мультиарена»

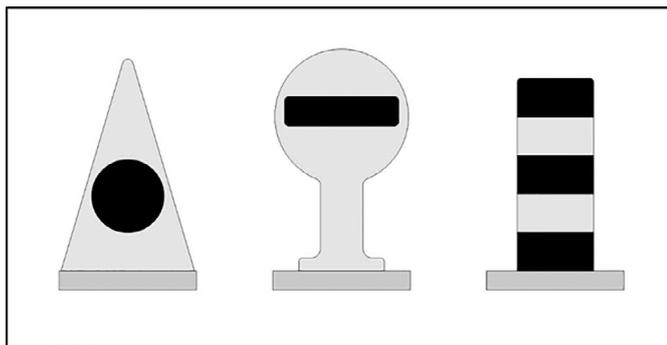
**Fig. 2.** "Multi-arena"

*Примечания:* на общую платформу установлены 4 ванночки-арены (1–4). Во время эксперимента arenas находятся в стабильном положении относительно комнаты. Объекты прочно закреплены на полу внутри арен. Тёмным кружком обозначен новый объект (этап тестирования). Стрелками показаны места и направления посадки животного в каждую арену: для животных в arenas 1 и 2 новый объект находится слева, а для животных в arenas 3 и 4 — справа от места посадки. Каждое животное попадает в арену под одним номером и на этапе ознакомления, и на этапе тестирования.

*Notes:* Four basin-arenas (1–4) are installed on a common platform. During the experiment, the arenas remain in a stable position relative to the room. Objects are securely fixed to the floor inside the arenas. The new object (testing phase) is marked with a dark circle. Arrows indicate the locations and directions of the animals' placement in each arena: for animals in Arenas 1 and 2, the new object is to the left of the placement point, while for animals in Arenas 3 and 4, it is to the right. Each animal is placed in the arena with the same number during both the familiarization phase and the testing phase.

с тем, что при повторном помещении в арену животные начинают обследовать объекты не сразу, а спустя примерно 2 мин.

Поведение животных на обоих этапах эксперимента фиксировали на видеокамеру. Обработку видеозаписей осуществляли с помощью компьютерной программы RealTimer (Openscience, Россия). За акт обследования принимали касание носа животного самого объекта и/или его основания. Регистрировали длительность обследования (Т) и число подходов к каждому объекту на обоих этапах эксперимента. Иные способы взаимодействия с объектами (стойки с опорой на объекты без приближения носа к объекту, попытки залезания на объекты, кусание или закапывание объектов) не регистрировали. Если животное обследовало два объекта на этапе «Ознакомление»



**Рис. 3.** Объекты для теста «Спонтанное распознавание нового объекта»

**Fig. 3.** Objects for the “Spontaneous novel object recognition” test

*Примечания:* Объекты (O1, O2, O3; производитель Openscience, Россия) выполнены из медицинского двухцветного пластика HPL (верхний слой серый, внутренний — чёрный). У каждого объекта чёрные элементы рисунка повторены с двух сторон. Высота объектов варьирует от 6 до 7 см, максимальная ширина 3,6 см, толщина всех объектов 1 см.

*Notes:* Objects (O1, O2, O3; manufactured by Openscience, Russia) are made of medical-grade two-colored HPL plastic (gray outer layer and black inner layer). Each object has black design elements mirrored on both sides. The height of the objects ranges from 6 to 7 cm, the maximum width is 3.6 cm, and the thickness of all objects is 1 cm.

менее 3 с, при обработке результатов его показатели удаляли из всех выборок.

Степень предпочтения нового объекта знакомому на этапе «Тест» отражает расчётный показатель — коэффициент дискриминации:

$$\text{КД} = (\text{Тнов}) / (\text{Тнов} + \text{Тзнак}) \times 100 \%,$$

где Тнов — длительность обследования нового объекта, Тзнак — длительность обследования знакомого объекта. Значение КД больше 50 % означает, что животное дольше обследует новый объект [15].

**Статистическую обработку** полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали W-критерий Шапиро—Уилка (Shapiro—Wilk test). Значимость различий между выборками оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Даннетта (Dunnett's multiple comparison test) в качестве *post hoc* анализа. Данные представлены в виде средних значений выборки  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

## Результаты и их обсуждение / Results and Discussion

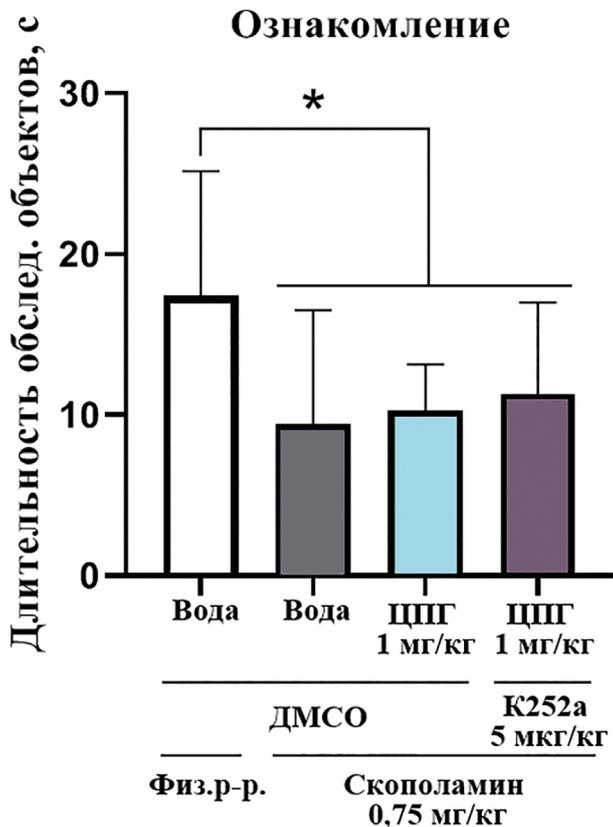
Тест РНО основан на врождённом стремлении грызунов исследовать незнакомые объекты и изменения в окружающей среде. При одновременном предъявлении двух объектов грызуны изучают новый объект дольше, чем знакомый [16]. В настоящее время данный тест широко применяется для изучения различных аспектов обучения и памяти у грызунов [17].

На этапе ознакомления животным предъявляли два идентичных объекта и регистрировали длительность обследования этих объектов. В соответствии с данными литературы [18], из дальнейшего эксперимента исключались животные, которые обследовали объекты менее 3 с: нами были исключены 2 мыши из группы «скополамин» и одна мышь из группы «скополамин + ЦПГ». Поскольку на показатель длительности обследования двух объектов могут влиять соединения, вводимые животным перед этапом ознакомления, мы провели межгрупповые сравнения по этому показателю. Установлено, что длительность обследования объектов статистически значимо снижена у всех групп мышей, получивших скополамин, по сравнению с контрольной группой: «контроль» vs «скополамин» ( $p = 0,01$ ), «контроль» vs «скополамин + ЦПГ» ( $p = 0,03$ ), «контроль» vs «скополамин + ЦПГ + K252a» ( $p = 0,04$ ) (рис. 4). Снижение длительности обследования объектов у мышей в тесте РНО после введения скополамина соответствует данным литературы и предположительно объясняется неохобией [19].

На этапе тестирования (рис. 5) все мыши обследовали объекты более 3 с. Не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий по суммарной длительности обследования двух объектов (нового и знакомого). Таким образом, через 24 ч эффекты острого введения скополамина на этот параметр пропали, неохобии по отношению к объектам не наблюдалось.

Коэффициенты дискриминации (КД) нового объекта на этапе тестирования для каждой группы животных приведены на рис. 6. Дисперсионный анализ выявил достоверные межгрупповые различия показателя. Согласно *post hoc* анализу, КД у животных, получивших скополамин, достоверно ниже по сравнению с показателем контрольной группы ( $p = 0,0006$ ). Введение ЦПГ привело к достоверному повышению КД у животных, получивших скополамин ( $p = 0,04$ ), что свидетельствует о ноотропном действии пептида. Однако в присутствии K252a анти-скополаминового эффекта ЦПГ не наблюдалось: «Скополамин + ЦПГ» vs «Скополамин + ЦПГ + K252a» ( $p = 0,003$ ).

Результаты, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что ЦПГ предотвращает развитие амнезии у мышей, вызванной введением скополамина: животные, получившие ЦПГ после скополамина, распознают старый объект и предпочитают исследовать новый. Ранее аналогичные результаты были получены на крысах [12]. Антиамнестическое действие ЦПГ пропадало при введении блокатора Trk рецепторов K252a. Хорошо известно [15], что в основе скополаминового амнезии лежит холинергический дефицит, а белки семейства нейротрофинов, включая BDNF, стимулируют холинергическую нейротрансмиссию, и это их действие опосредовано Trk-рецепторами [20–22]. Ранее в нашем Центре было показано, что ЦПГ способствует увеличению уровня BDNF [6, 8]. Можно предположить, что выявленный

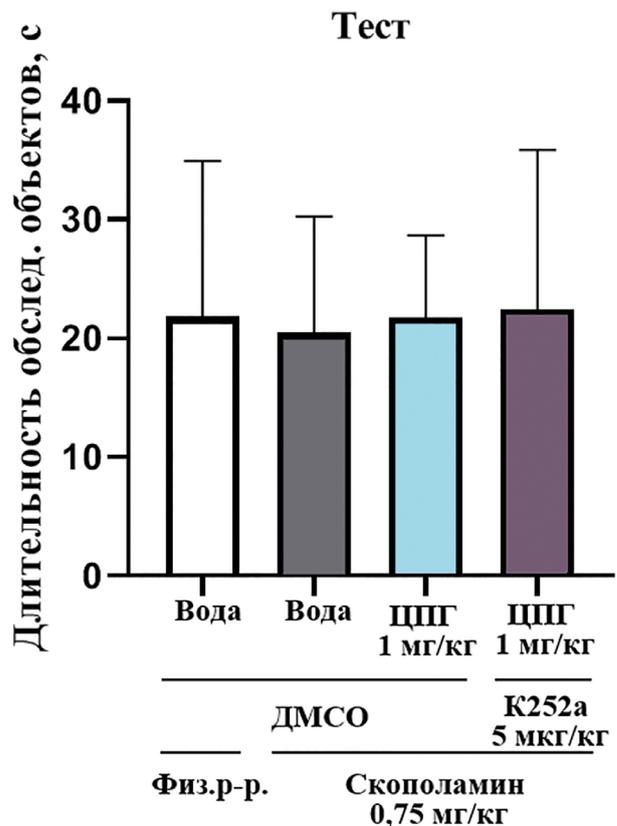


**Рис. 4.** Этап ознакомления: влияние скополамина на длительность обследования двух идентичных объектов у мышей

**Fig. 4.** Familiarization phase: the effect of scopolamine on the duration of exploration of two identical objects in mice

*Примечания:* животные получали инъекцию скополамина (0,75 мг/кг, п/к), а через 15 мин — инъекцию ЦПГ (1 мг/кг, в/б) и К252а (5 мкг/кг, в/б). Ещё через 15 мин животных помещали в arenas с идентичными объектами на 5 мин. Регистрировали длительность обследования каждого объекта, с. На рисунке представлена суммарная длительность обследования двух объектов в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение (SD); One-way ANOVA: средние значения групп достоверно различаются [ $F(3, 42) = 3,92; p = 0,02$ ]. Тест Даннетта: \* $p < 0,05$  «контроль» vs «скополамин» ( $p = 0,01$ ), «контроль» vs «скополамин + ЦПГ» ( $p = 0,03$ ), «контроль» vs «скополамин + ЦПГ + К252а» ( $p = 0,04$ ).

*Notes:* Animals were injected with scopolamine (0.75 mg/kg, s.c.), followed by an injection of CPG (1 mg/kg, i.p.) and K252a (5 µg/kg, i.p.) 15 minutes later. Another 15 minutes after that, the animals were placed in arenas with identical objects for 5 minutes. The duration of exploration of each object (in seconds) was recorded. The figure presents the total exploration time for both objects as mean values  $\pm$  standard deviation (SD); One-way ANOVA: the group means significantly differed [ $F(3, 42) = 3.92; p = 0.02$ ]; Dunnett's test: \*  $p < 0.05$ , "control" vs "scopolamine" ( $p = 0.01$ ), "control" vs "scopolamine + CPG" ( $p = 0.03$ ), "control" vs "scopolamine + CPG + K252a" ( $p = 0.04$ ).



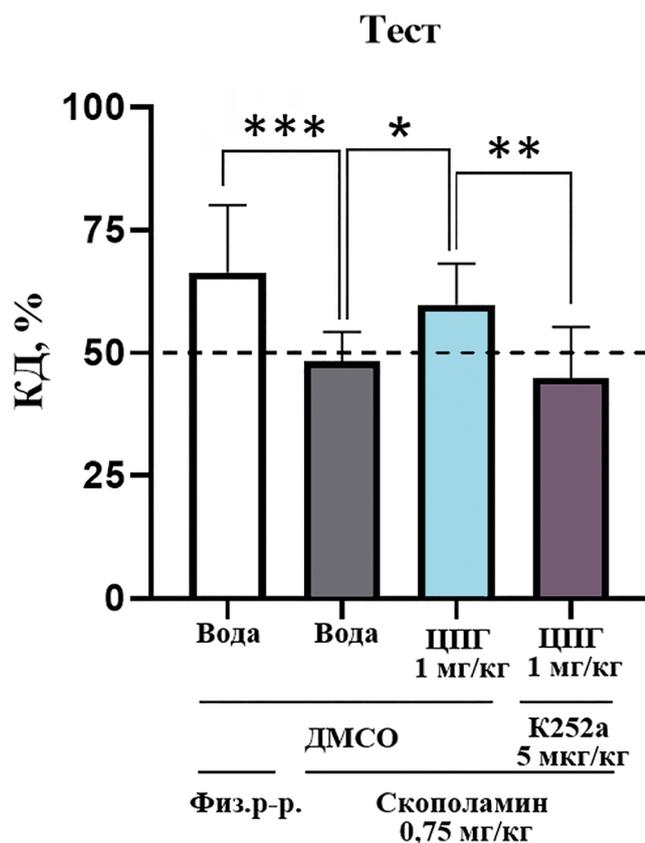
**Рис. 5.** Этап тестирования: суммарная длительность обследования знакомого и нового объектов у мышей

**Fig. 5.** Test phase: total duration of exploration of the new and the familiar objects in mice 24 h after scopolamine administration

*Примечания:* животные получали инъекцию скополамина (0,75 мг/кг, п/к), а через 15 мин — инъекцию ЦПГ (1 мг/кг, в/б) и К252а (5 мкг/кг, в/б). Через 24 ч после этапа ознакомления животных снова помещали в arenas с двумя объектами: новым и знакомым. Регистрировали длительность обследования каждого объекта, с. На рисунке представлена суммарная длительность обследования двух объектов в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение (SD). One-way ANOVA: различий между группами не обнаружено [ $F(3, 42) = 0,06; p = 0,98$ ].

*Notes:* Animals were injected with scopolamine (0.75 mg/kg, s.c.), followed by an injection of CPG (1 mg/kg, i.p.) and K252a (5 µg/kg, i.p.) 15 minutes later. Twenty-four hours after the familiarization phase, the animals were again placed in arenas with two objects: one new and one familiar. The duration of exploration of each object (in seconds) was recorded. The figure presents the total exploration time for both objects as mean values  $\pm$  standard deviation (SD);

One-way ANOVA: no significant differences were found between groups [ $F(3, 42) = 0.06; p = 0.98$ ].



**Рис. 6.** Этап тестирования: КД нового объекта у мышей через 24 ч после введения скополамина

**Fig. 6.** Testing phase: discrimination index of a new object in mice 24 h after scopolamine administration

*Примечания:* Животные получали инъекцию скополамина (0,75 мг/кг, п/к), а через 15 мин — инъекцию ЦПГ (1 мг/кг, в/б) и К252а (5 мкг/кг, в/б). Через 24 ч после этапа ознакомления животных снова помещали в арены с двумя объектами: новым и знакомым. Регистрировали длительность обследования каждого объекта, с. На рисунке представлен коэффициент дискриминации нового объекта (KD, %) в виде средних значений ± стандартное отклонение (SD). КД рассчитывали по формуле:  $(T_{нов} / (T_{нов} + T_{знак})) \times 100\%$ , где  $T_{нов}$  — длительность обследования нового объекта,  $T_{знак}$  — длительность обследования знакомого объекта. One-way ANOVA: выборки достоверно различаются [ $F(3, 42) = 2,79; p < 0,0001$ ]; Тест Даннетта: \* —  $p < 0,05$  «скополамин» vs «скополамин + ЦПГ»; \*\* —  $p < 0,01$  «скополамин + ЦПГ» vs «Скополамин + ЦПГ + К252а»; \*\*\* —  $p < 0,001$  «контроль» vs «скополамин».

*Notes:* Animals were injected with scopolamine (0.75 mg/kg, s.c.), followed by an injection of CPG (1 mg/kg, i.p.) and K252a (5 µg/kg, i.p.) 15 minutes later. Twenty-four hours after the familiarization phase, the animals were again placed in arenas with two objects: one new and one familiar. The duration of exploration of each object (in seconds) was recorded. The figure presents the discrimination index (DI, %) for the new object as mean values ± standard deviation (SD). DI was calculated using the formula:  $(T_{new} / (T_{new} + T_{fam})) \times 100\%$ , where  $T_{new}$  is the exploration time of the new object, and  $T_{fam}$  is the exploration time of the familiar object. One-way ANOVA: significant differences were found between the groups [ $F(3, 42) = 2.79; p < 0.0001$ ]; Dunnett's test: \* —  $p < 0.05$  "scopolamine" vs "scopolamine + CPG"; \*\* —  $p < 0.01$  "scopolamine + CPG" vs "scopolamine + CPG + K252a"; \*\*\* —  $p < 0.001$  "control" vs "scopolamine".

в настоящем исследовании ноотропный эффект ЦПГ связан со стимуляцией активации Trk рецепторов за счёт увеличения экспрессии BDNF.

### Заключение / Conclusion

Таким образом, полученные результаты подтверждают вовлечённость Trk-рецепторов в механизм ноотропного действия ЦПГ.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией

#### Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема FGFG-2022-0005)

### ADDITIONAL INFORMATION

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

#### Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication

#### Funding

This study was conducted under the government contract of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project FGFG-2022-0005)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Воронцова Ольга Николаевна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2088>

**Аляева Анна Григорьевна** — м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>

**Колясникова Ксения Николаевна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
**Автор, ответственный за переписку**  
e-mail: [kolyasnikova\\_kn@academpharm.ru](mailto:kolyasnikova_kn@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>  
РИНЦ SPIN-код: 5682-2035

**Поварнина Полина Юрьевна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

**Гудашева Татьяна Александровна** — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
РИНЦ SPIN-код: 4970-0006

**Olga N. Vorontsova** — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Scientist of Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2088>

**Anna G. Alyaeva** — Junior Research Scientist of Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>

**Ksenia N. Kolyasnikova** — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Department of Drug Chemistry Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
**Corresponding author**  
e-mail: [kolyasnikova\\_kn@academpharm.ru](mailto:kolyasnikova_kn@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>  
RSCI SPIN code: 5682-2035

**Polina Yu. Povarnina** — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
RSCI SPIN code: 5498-6724

**Tatiana A. Gudasheva** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
RSCI SPIN code: 4970-0006

**Дорофеев Владимир Львович** — д. фарм. н., профессор, и/о генерального директора ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

**Vladimir L. Dorofeev** — PhD, Dr. Sci. (Pharm), Professor, Acting General Director of Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584>

## Список литературы / References

- Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5;391(1-2):149-52. doi: 10.1016/0014-5793(96)00722-3.
- Seredenin SB, Gudasheva TA, Boiko SS, et al. Endogenous dipeptide cycloprolylglycine shows selective anxiolytic activity in animals with manifest fear reaction. *Bull Exp Biol Med*. 2002 Apr;133(4):360-2. doi: 10.1023/a:1016293904149.
- Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. A New Component in the Mechanism of Regulation of Endogenous Depressive-Like States. *Dokl Biochem Biophys*. 2019 Sep;488(1):324-326. doi: 10.1134/S1607672919050107.
- Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и др. Сходство цикло-пролилглицина с пираретамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(9):3-6. [Koliasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. [Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antihypoxic and neuroprotective effects]. *Eksp Klin Farmakol*. 2012;75(9):3-6. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6.
- Gudasheva TA, Grigoriev VV, Koliasnikova KN, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2016 Nov;471(1):387-389. doi: 10.1134/S160767291606003X.
- Gudasheva TA, Koliasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;469(1):273-6. doi: 10.1134/S1607672916040104.
- Akparov VKh, Timofeev VB, Koliasnikova KN. The neuropeptide cycloprolylglycine can form a complex with AMPA receptors. *Mendeleev Communications*. 2022;32(4):436-438. doi: 10.1016/j.mencom.2022.07.003.
- Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Аляева А.Г. и др. Нейропротекторный эффект нейропептида циклопролилглицина зависит от активации AMPA- и TRK-рецепторов. *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*. 2022;507(1):483-487. [Gudasheva TA, Povarnina PYu, Koliasnikova KN, et al. Neuroprotective effect of cycloprolylglycine neuropeptide depends on AMPA- and TRKB-receptor activation. *Dokl Biochem Biophys*. 2022;507(1):483-487. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738922060099.
- Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н. и др. Анксиолитический эффект нейропептида циклопролилглицина опосредован AMPA- и TrkB-рецепторами. *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*. 2020;493(1):364-366. [Gudasheva TA, Povarnina PYu, Koliasnikova KN, et al. The anxiolytic effect of the neuropeptide cycloprolylglycine is mediated by AMPA and TrkB receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;493(1):190-192. doi: 10.1134/S1607672920040067. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738920040113.
- Колясникова К.Н., Григорьевич О.С., Аляева А.Г., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности TrkB-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022;25(1):39-42. [Koliasnikova KN, Grigorkevich OS, Alyaeva AG, Gudasheva TA. Study of the involvement of TrkB receptors in the antihypoxic effect of the neuropeptide cyclo-prolyl-glycine. *Problems of*

*biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2022;25(1):39-42. (In Russ.)]. doi: 10.29296/25877313-2022-01-06.

11. Tang KS. The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sci*. 2019 Sep 15;233:116695. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116695.

12. Воронцова О.Н., Аляева А.Г., Колясникова К.Ю., и др. Нейропептид цикло-Л-пролилглицин противодействует скополамин-индуцированному нарушению долговременной памяти у крыс в тесте «Распознавание нового объекта». *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2023;(3):50-55. [Vorontsova ON, Alyaeva AG, Koliasnikova KN, et al. Neuropeptide cyclo-L-prolylglycine counteracts scopolamine-induced long-term memory impairment in rats in the novel object recognition test. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(3):50-55. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2023-3-50-55.

13. Колясникова К.Н., Голубятникова А.К., Ребеко А.Г., и др. Синтез цикло-Л-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2019;(3):19-26. [Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeke AG, et al. Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2019;(3):19-26. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10051.

14. Auld DS, Mennicken F, Day JC, Quirion R. Neurotrophins differentially enhance acetylcholine release, acetylcholine content and choline acetyltransferase activity in basal forebrain neurons. *J Neurochem*. 2001 Apr;77(1):253-62. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00234.x.

15. Kim SK, Kwon DA, Kim YS, et al. Standardized Extract (HemoHIM) Protects against Scopolamine-Induced Amnesia in a Murine Model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Mar 17;2021:8884243. doi: 10.1155/2021/8884243.

16. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988 Nov 1;31(1):47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x.

17. Ennaceur A. Chapter 1 - Object Novelty Recognition Memor. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 2018;27:1-22. doi: 10.1016/b978-0-12-812012-5.00001-x.

18. Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2014 Oct 8;69:8.31.1-17. doi: 10.1002/0471142301.ns0831s69.

19. Ozawa T, Yamada K, Ichitani Y. d-Cycloserine reverses scopolamine-induced object and place memory deficits in a spontaneous recognition paradigm in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019 Dec;187:172798. doi: 10.1016/j.pbb.2019.172798.

20. Knüsel B, Hefti F. K-252b is a selective and nontoxic inhibitor of nerve growth factor action on cultured brain neurons. *J Neurochem*. 1991 Sep;57(3):955-62. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08243.x.

21. Knüsel B, Hefti F. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J Neurochem*. 1992 Dec;59(6):1987-96. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10085.x.

22. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012 May;13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.

