

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

# ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых  
научных журналов ВАК РФ



№3.2025



## 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 30.09.2025 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 ФГБУ «НИИ фармакологии  
имени В.В. Заскусова». 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, информацион-  
ных 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

## ПОИСК НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ГК-2 — дипептидный миметик 4-й петли NGF — увеличивает  
содержание BDNF и активен на клеточной модели болезни  
Паркинсона  
Антипова Т. А., Николаев С. В. .... 3

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Оценка пролиферативной активности дипептидных  
миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового  
нейротрофического фактора *in vitro*  
Логвинов И. О., Николаев С. В., Антипова Т. А. .... 9

О селективном антибактериальном действии соединений  
цинка на патогенную и полезную микробиоту  
Громова О. А., Торшин И. Ю., Галенко-Ярошевский П. А.,  
Громов А. Н., Семенов В. А. .... 13

Оценка препаратов рубрикатора АТХ методом  
хемореактивного скрининга для профилактики  
дефицитов магния и пиридоксина  
Торшин И. Ю., Калачева А. Г., Громова О. А.,  
Розозин М. А. .... 21

## ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Доксорубин дозозависимо вызывает нарушение  
когнитивных функций и тревожность у крыс в тестах  
условного рефлекса пассивного избегания  
и приподнятого крестообразного лабиринта  
Котельникова С. О., Алексеев И. В., Крайнева В. А.,  
Воронина Т. А., Колик Л. Г. .... 30

Нейрохимические аспекты фармакологической  
активности кардиотропного соединения АЛМ-802S  
Цорин И. Б., Колик Л. Г., Вититнова М. Б., Барчуков В. В.,  
Мокров Г. В., Кудрин В. С., Крыжановский С. А. .... 39

## МЕТОДЫ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Количественное определение димерного дипептидного  
миметика с антидепрессантоподобной активностью  
в плазме крови крыс методом высокоэффективной  
жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим  
детектированием  
Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б.,  
Литвин А. А., Дворянинов Д. А., Жердев В. П.,  
Дорофеев В. Л. .... 47

## ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на  
активность белка-транспортёра BCRP *in vitro*  
Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В.,  
Якушева Е. Н. .... 57

## ПОИСК НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Альтернативная модель *Danio rerio* для скрининговой оценки  
термо- и фригопротекторного действия фармакологических  
соединений  
Ревякин А. О. .... 65





## 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. Starodubtsev**

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** 30.09.2025. **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. Baltiyskay, 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

## NEW DRUGS DISCOVERY

GK-2 — dipeptide mimetic of 4th loop NGF increases the level of BDNF and is active in the cell model of Parkinson's disease  
*Antipova TA, Nikolaev SV* ..... 3

## MECHANISM OF ACTION

Evaluation of proliferative activity of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor *in vitro*  
*Logvinov IO, Nikolaev SV, Antipova TA* ..... 9

On the selective antibacterial action of zinc compounds on pathogenic and beneficial microbiota  
*Gromova OA, Torshin IYu, Galenko-Yaroshevsky PA, Gromov AN, Semenov VA* ..... 13

Evaluation of ATX rubricator drugs by chemoreactome screening method for prevention of magnesium and pyridoxine deficiencies  
*Torshin IYu, Kalacheva AG, Gromova OA, Rogozin MA* ..... 21

## PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Doxorubicin dose-dependently induces cognitive impairment and anxiety in conditioned passive avoidance and elevated plus-maze tests in rats  
*Kotel'nikova SO, Alekseev IV, Kraineva VA, Voronina TA, Kolik LG* ..... 30

Neurochemical aspects of the cardiotropic compound ALM-802S pharmacological activity  
*Tsorin IB, Kolik LG, Vititnova MB, Barchukov VV, Mokrov GV, Kudrin VS, Kryzhanovskiy SA* ..... 39

## METHODS OF PHARMACOKINETIC STUDIES

Quantification of a dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity in rat blood plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry  
*Kravtsova OYu, Gribakina OG, Kolyvanov GB, Litvin AA, Dvoryaninov DA, Zherdev VP, Dorofeev VL* ..... 47

## PHARMACOKINETIC STUDIES

Evaluation of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the activity of the BCRP transporter protein *in vitro*  
*Povetko MI, Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Yakusheva EN* ..... 57

## SCREENING FOR NEW PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Alternative model *Danio rerio* for screening evaluation of thermo- and frigoprotective action of pharmacological compounds  
*Revyakin AO* ..... 65



# ГК-2 — дипептидный миметик 4-й петли NGF — увеличивает содержание BDNF и активен на клеточной модели болезни Паркинсона

Антипова Т. А., Николаев С. В.

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

## Аннотация

NGF в концентрации 100 нг/мл при добавлении за 24 ч до 6-гидроксидофамина и после повреждения полностью предотвращал развитие повреждающего действия нейротоксина. Дипептид ГК-2 в концентрации  $10^{-5}$  М, подобно NGF, проявлял защитный эффект на клеточной модели болезни Паркинсона. По данным Вестерн-блот анализа NGF через 24 ч после внесения увеличивал содержание BDNF в клетках HT-22 в 1,6 раза по сравнению с контролем, а дипептид ГК-2 в концентрации  $10^{-8}$  М — в 1,4 раза по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; 6-гидроксидофамин; нейропротекция; NGF; BDNF; димерный дипептидный миметик ГК-2

## Для цитирования:

Антипова Т. А., Николаев С. В. ГК-2 — дипептидный миметик 4-й петли NGF — увеличивает содержание BDNF и активен на клеточной модели болезни Паркинсона. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):3–8. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-3-8>. EDN: ZRAIYQ

**Поступила:** 03.08.2025. **В доработанном виде:** 15.09.2025. **Принята к печати:** 24.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## GK-2 — dipeptide mimetic of 4th loop NGF increases the level of BDNF and is active in the cell model of Parkinson's disease

Tatyana A. Antipova, Sergey V. Nikolaev

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

## Abstract

NGF at a concentration of 100 ng / ml when added 24 hours before 6-OHDA and after damage completely prevented the development of the damaging effect of neurotoxin. Dipeptide GK-2 at a concentration of  $10^{-5}$  M, similar to NGF, showed a protective effect on the cellular model of Parkinson's disease. According to the Western blot analysis NGF increased the level of BDNF in the HT-22 cells 1.6 times compared to the control, and dipeptide GK-2 at a concentration of  $10^{-8}$  M — 1.4 times compared to the control.

**Keywords:** Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine; neuroprotection; NGF; BDNF; dimeric dipeptide mimetic GK-2

## For citations:

Antipova TA, Nikolaev SV. GK-2 — dipeptide mimetic of 4th loop NGF increases the level of BDNF and is active in the cell model of Parkinson's disease. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):3–8. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-3-8>. EDN: ZRAIYQ

**Received:** 03.08.2025. **Revision received:** 15.09.2025. **Accepted:** 24.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был сконструирован и синтезирован димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов (NGF), гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший лабораторный шифр ГК-2 [1]. Этот дипептид активировал специфический для NGF тирозинкиназный рецептор TrkA и обладал нейропротекторной активностью в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* на моделях нейродегенеративных заболеваний [2]. Для ГК-2 были также выявлены антипаркинсонические эффекты в экспериментах *in vivo* на моделях галоперидоловой каталепсии и паркинсонического синдрома, индуцированного МФТП или 6-гидроксидофамином

(6-ОНДА) [3]. Болезнь Паркинсона характеризуется гибелью дофаминергических нейронов, на которых отсутствуют TrkA рецепторы, но экспрессируются специфические для BDNF рецепторы TrkB [4]. BDNF также способен защищать нейроны от гибели и проявлять антипаркинсонический эффект [5]. Поскольку известно, что NGF повышает экспрессию BDNF в нейронах, то мы предположили, что способность миметика NGF дипептида ГК-2 проявлять антипаркинсоническую активность связана с его способностью влиять на содержание BDNF в нейронах.

Для доказательства нашего предположения о связи антипаркинсонического эффекта ГК-2 с индукцией синтеза BDNF, в настоящей работе мы показали, что ГК-2 активен на клеточной модели болезни Паркинсона и способен увеличивать содержание BDNF в культуре нейрональных клеток.



## Материалы и методы / Materials and methods

### 1. Препараты

Дипептид ГК-2 был синтезирован в отделе химии лекарственных средств «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» как описано ранее [6]. Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y были получены из ФГБНУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина», иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии HT-22 из клеточного банка Утрехтского университета (Голландия).

Для изучения влияния ГК-2 на содержание BDNF миметик использовали в виде стерильного водного раствора в конечной концентрации  $10^{-8}$  М, установленной в экспериментах по нейропротекторному действию этого соединения на культуре гиппокампальных клеток линии HT-22 [7].

Для изучения антипаркинсонической активности на клетках SH-SY5Y использовали ГК-2 в виде стерильного водного раствора в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  М.

В качестве положительного контроля использовали NGF (мышинный NGF 7S, Thermo Fisher Scientific, США) в конечной концентрации  $10^{-9}$  М (100 нг/мл).

### 2. Культивирование клеток

Клетки культивировали в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в среде DMEM с добавлением 15 % FBS в случае клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y, в случае гиппокампальных клеток линии HT-22 — 5 % FBS при температуре 37 °С в газовой смеси, содержащей 95 % воздуха и 5 % CO<sub>2</sub>. Затем клетки рассевали в 96-луночные планшеты (15 тыс. на лунку, SH-SY5Y) или на 6-луночные планшеты (200 тыс. на лунку, HT-22), обработанные поли-D-лизин (BD Biosciences, San Jose, USA; 5 мкг/см<sup>2</sup>), и инкубировали в той же среде до образования монослоя при 37 °С в газовой смеси, содержащей 95 % воздуха и 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3. Клеточная модель болезни Паркинсона

В культуру клеток SH-SY5Y вносили 6-ОНДА в конечной концентрации 100 мкМ [8] через 24 ч или 48 ч после рассевания клеток с плотностью

15 тыс. на лунку в 96-луночные планшеты, предварительно обработанные поли-D-лизин. После 24 ч инкубации среду с 6-ОНДА заменяли на обычную среду культивирования. ГК-2 добавляли в клеточную среду за 24 ч до 6-ОНДА или после него. Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч с помощью МТТ-теста [9]. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

### 4. Исследование содержания BDNF с использованием Вестерн-блот анализа

ГК-2 и NGF вносили через 24 ч после рассевания клеток HT-22 на 6-луночные планшеты. Содержание BDNF определяли через 24 ч после внесения ГК-2 и NGF. К клеткам добавляли лизирующий буфер (50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1 % Triton X-100, pH = 7,5) при температуре 4 °С и лизировали в течение 5 мин на льду, затем соскребали, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 13000 об/с и 4 °С. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина–Лоури [10]. Белки разделяли электрофорезом в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ; Bio-Rad, Hercules, USA) в присутствии додецилсульфата натрия. Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF (Bio-Rad, Hercules, USA) осуществляли электроэлюцией в течение 45 минут [11]. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в буфере TBS с 1 % Tween-20 и 5 % (масса/объем) обезжиренным молоком (Bio-Rad, Hercules, USA) (TBS-T) в течение ночи. Затем мембраны инкубировали в присутствии первичных кроличьих поликлональных антител против BDNF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:1000 или против бета-актина (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:5000 в течение 1 часа. Бета-актин использовали в качестве контроля загрузки. Затем после отмывки в буфере TBS-T и 0,5 % (масса/объем) обезжиренным молоком мембраны инкубировали в присутствии вторичных козьих антител (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1: 2000), в течение 1 ч. Детектирование белков

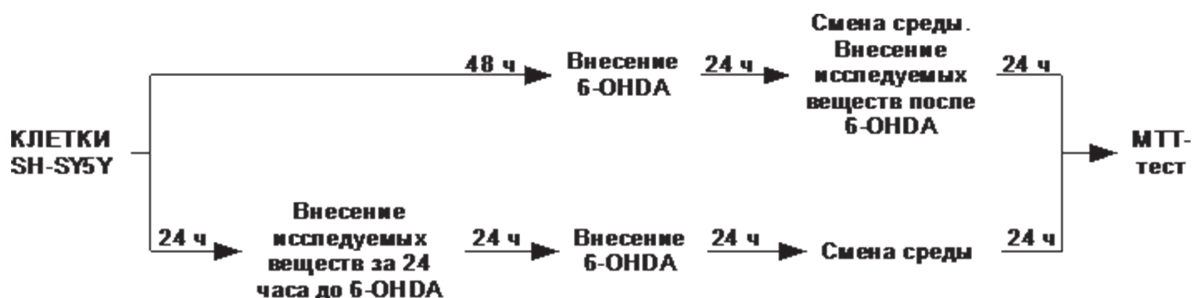


Рис. 1. Схема внесения нейротоксина 6-ОНДА и исследуемых соединений в клетки SH-SY5Y

Fig. 1. Scheme of 6-6-OHDA neurotoxin and test compounds application to SH-SY5Y cells

осуществляли после отмывки от вторичных антител в буфере TBS-T и 0,5 % (масса/объем) обезжиренным молоком в реакции с ECL-реагентами (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), используя гель-документирующую систему Alliance UVITEC (UK). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

### 5. Статистический анализ

Для оценки межгрупповых различий при сравнении двух групп при подсчете результатов Вестерн-блот анализа использовали U-критерий Манна–Уитни и критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA) при обработке данных МТТ-теста. Данные считались достоверными при  $p \leq 0,05$ . Результаты представлены в  $m \pm s.d.$

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

### Дипептид ГК-2 активен на клеточной модели БП

Нейротоксин 6-ОНДА, внесённый в культуру клеток SH-SY5Y в концентрации 100 мМ, через 48 ч приводил к статистически значимому снижению их жизнеспособности (табл. 1). NGF в концентрации 100 нг/мл при добавлении за 24 ч до 6-ОНДА полностью предотвращал развитие повреждающего действия нейротоксина, а при добавлении через 24 ч после 6-ОНДА обладал 100 % лечебным эффектом. Дипептид ГК-2 в концентрации  $10^{-5}$  М, подобно NGF, проявлял статистически достоверный как профилактический, так и терапевтический защитный эффект. Однако эти эффекты были менее вы-

раженными по сравнению с эффектами полноразмерного нейротрофина. В меньших концентрациях ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ М) ГК-2 был неактивен (табл. 1).

Таким образом, низкомолекулярный миметик NGF дипептид ГК-2 обладает активностью на клеточной модели болезни Паркинсона.

### Дипептид ГК-2 увеличивает содержание BDNF в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22

По данным Вестерн-блот анализа NGF в конечной концентрации  $10^{-9}$  М через 24 ч после внесения достоверно ( $p \leq 0,05$ ) увеличивал содержание BDNF в клетках HT-22 в 1,6 раза по сравнению с контролем с  $2,3 \pm 0,1$  до  $3,6 \pm 0,3$  о.д.е (относительные денситометрические единицы). Дипептид ГК-2 в концентрации  $10^{-8}$  М также достоверно ( $p \leq 0,05$ ) увеличивал содержание BDNF в этих же клетках в 1,4 раза по сравнению с контролем, с  $2,3 \pm 0,1$  до  $3,2 \pm 0,6$  о.д.е (рис. 2).

Таким образом, дипептид ГК-2 подобно NGF увеличивает содержание BDNF в культуре нейронов HT-22.

Поскольку дофаминергические нейроны человека трудно получить и поддерживать в качестве первичной культуры, исследования болезни Паркинсона в основном выполняются с использованием моделей нейрональных клеток, в частности линии нейробластомы SH-SY5Y. Эту клеточную линию часто выбирают из-за её происхождения (человек), катехоламинергических нейрональных свойств и простоты культивирования [12]. Клетки SH-SY5Y экспрессируют ряд дофаминергических нейрональных маркеров. В этих клетках синтезируется тирозингидроксилаза, фермент, критически важный для катализа дофамина и далее норадреналина и адреналина [13]. Важно отметить, что клетки SH-SY5Y экспрессируют транспортер дофамина, а также подтипы рецепторов дофамина 2 и 3, что делает их адекватной системой *in vitro* для исследования нейротоксичности в дофаминергических нейронах [14].

Гиппокампальные нейроны и нейрональные клетки гиппокампа мыши линии HT-22 экспрессируют и TrkA, и TrkB рецепторы [15, 16]. По данным литературы известно, что дофаминергические нейроны не экспрессируют TrkA рецепторы, но на этих нейронах присутствуют специфические для BDNF рецепторы TrkB [4]. Кроме того, NGF может регулировать экспрессию BDNF [17]. Эксперименты по аксотомии показывают, что нейротрофины чаще всего действуют не в месте их синтеза, а в целевых компартментах, куда транспортируются с помощью ретроградного и антероградного аксонального транспорта [18–20]. Поэтому защитный эффект ГК-2 на клеточной модели болезни Паркинсона может быть связан и с его влиянием на синтез BDNF.

Таким образом, димерный дипептидный миметик ГК-2, подобно NGF, увеличивает уровень BDNF в гиппокампальных клетках HT-22, что может быть

Таблица 1

Влияние дипептида ГК-2 на жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y при 6-гидроксидофаминовом повреждении (результаты МТТ-теста)

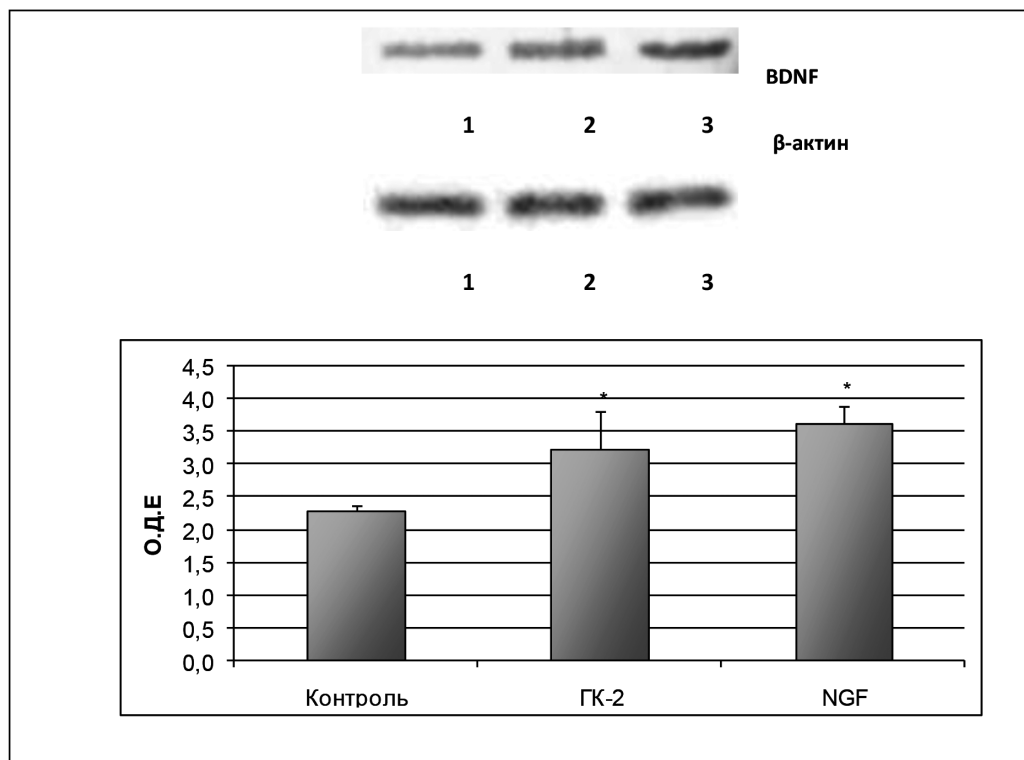
Table 1

Effect of the dipeptide GK-2 on the viability of human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 6-hydroxydopamine damage (MTT test results)

Название групп, $n = 12$	% от контроля	
	Внесение за 24 ч до 6-ОНДА	Внесение после 6-ОНДА
Контроль	100±7	100±4
6-ОНДА (100 мМ)	78±3*	85±1*
NGF (100 нг/мл)	100±8^	100±3*
ГК-2 ( $10^{-5}$ М)	89±3^	92±4^
ГК-2 ( $10^{-6}$ М)	86±6	91±5
ГК-2 ( $10^{-7}$ М)	86±5	90±6
ГК-2 ( $10^{-8}$ М)	86±5	90±4

Примечания: \* —  $p \leq 0,05$ . Достоверность отличий от 6-ОНДА: ^ —  $p \leq 0,05$ . Критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA).

Notes: \* —  $p \leq 0.05$ . Significance of differences from 6-OHDA: ^ —  $p \leq 0.05$ . Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test (ANOVA).



**Рис. 2.** Влияние ГК-2 ( $10^{-8}$ М) и NGF ( $\sim 10^{-9}$ М) на содержание BDNF в культуре клеток HT-22  
**Fig. 2.** Effect of GK-2 ( $10^{-8}$ М) and NGF ( $\sim 10^{-9}$ М) on the BDNF level in HT-22 cell culture

*Примечания:* Результаты денситометрии оригинального Вестерн-блота. Дорожки: 1 — контроль; 2 — ГК-2; 3 — NGF; статистически значимые отличия ( $p \leq 0,05$ , U-критерий Манна–Уитни): \* — относительно контроля, о.д.е. — относительные денситометрические единицы.

*Notes:* The results of densitometry of the original Western blot. Runs: 1 — control; 2 — GK-2; 3 — NGF; statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ , Mann–Whitney U-test): \* — compared to the control, о.д.е. — compared densitometric units.

одним из механизмов антипаркинсонического действия ГК-2. В настоящей работе мы показали, что ГК-2 обладает активностью и на клеточной модели болезни Паркинсона, в которой используются клетки нейробластомы человека, что соответствует ранее полученным данным по антипаркинсоническому эффекту ГК-2 в опытах *in vivo*. Тот факт, что ГК-2 был эффективен на модели болезни Паркинсона с использованием человеческих клеток, позволяет предполагать его перспективность в качестве терапевтического средства.

## Выводы / Conclusions

1. Димерный дипептидный миметик ГК-2, подобно NGF, увеличивает уровень BDNF в гиппокампальных клетках HT-22.

2. ГК-2 обладает активностью на клеточной модели болезни Паркинсона в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

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

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The team of authors declares that there is no conflict of interest in the preparation of this article.



#### Участие авторов

Антипова Т. А. — разработка модели, выполнение вестерн-блот анализа, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи; Николаев С. В. — выполнение экспериментальных работ с культурами клеток, редактирование, финальное утверждение рукописи.

#### Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

#### Authors' participation

Antipova TA — development of a model, execution of a western blot analysis, analysis and interpretation of the results, writing the text, editing, and final approval of the manuscript; Nikolaev SV — performing experimental work with cell cultures, editing, and final approval of the manuscript.

#### Funding

The work was carried out without sponsorship.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Антипова Татьяна Алексеевна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории молекулярной фармакологии, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: antipova\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>  
РИНЦ SPIN-код: 7723-6008

**Николаев Сергей Владимирович** — н. с. лаборатории молекулярной фармакологии, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
**Автор, ответственный за переписку**  
e-mail: nikolaev\_sv@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4584-746X>  
РИНЦ SPIN-код: 1144-0269

**Tatyana A. Antipova** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading researcher, Molecular pharmacology laboratory, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: antipova\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>  
RSCI SPIN code: 7723-6008

**Sergey V. Nikolaev** — Research Scientist Molecular pharmacology laboratory, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
**Corresponding author**  
e-mail: nikolaev\_sv@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4584-746X>  
RSCI SPIN code: 1144-0269

### Список литературы / References

1. Патент РФ на изобретение №2410392C2/ 27.01.11 Середенин (RU) С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. [Patent Russ. №RU2410392C2/ 27.01.11 [Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. (In Russ.).] Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2410392C2/ru>. Ссылка активна на 15.09.2025.
2. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Создание фармакологически активной малой молекулы, обладающей свойствами фактора роста нервов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(6):63-70. [Seredenin SB, Gudasheva TA. The development of a pharmacologically active low-molecular mimetic of the nerve growth factor. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(6):63-70. (In Russ.).] doi: 10.17116/jnevro20151156163-70.
3. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., и др. Антипаркинсонические свойства дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 в экспериментах *in vivo*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011;151(6):634-637. [Povarnina PYu, Gudasheva TA, Vorontsova ON, et al. Antiparkinsonian properties of a nerve GROWTH FACTOR dipeptide mimetic GK-2 *in vivo* experiments. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2011;151(6):634-637. (In Russ.).] EDN: NXLJAX
4. Berg-von der Emde K, Dees WL, Hiney JK, et al. Neurotrophins and the neuroendocrine brain: different neurotrophins sustain anatomically and

- functionally segregated subsets of hypothalamic dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 1995 Jun;15(6):4223-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-06-04223.1995.
5. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004 Sep;22(3):123-31. doi: 10.1080/08977190410001723308.
6. Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Курилов Д.В., и др. Синтез димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2, потенциального нейропротективного препарата. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(7):10-19. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Kurilov DV, et al. Synthesis of two-dimensional dipeptide mimetic of nerve growth factor: new potential neuroprotective drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(7):10-19. (In Russ.).]
7. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование *in vitro* нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;150(11):538-541. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. *In vitro* study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2010;150(11):538-541. (In Russ.).] EDN: MVUWEP
8. Riveles K, Huang LZ, Quik M. Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology*. 2008 May;29(3):421-7. doi: 10.1016/j.neuro.2008.02.001.
9. Ueda Y, Walsh E, Nakanishi H, Yoshida K. A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity *in vitro*. *Neurosci Lett*. 1994 Jan 3; 165(1-2):203-7. doi: 10.1016/0304-3940(94)90745-5.

10. Alam A. A model for formulation of protein assay. *Anal Biochem.* 1992 May 15;203(1):121-6. doi: 10.1016/0003-2697(92)90051-8.
11. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 Sep;76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
12. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017 Jan 24;12(1):10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.
13. Kume T, Kawato Y, Osakada F, et al. Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett.* 2008 Oct 10;443(3):199-203. doi: 10.1016/j.neulet.2008.07.079.
14. Arun P, Madhavarao CN, Moffett JR, Namboodiri AM. Antipsychotic drugs increase N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2008 Aug;106(4):1669-80. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05524.x.
15. Chong PN, Sangu M, Huat TJ, et al. Trkb-IP3 Pathway Mediating Neuroprotection in Rat Hippocampal Neuronal Cell Culture Following Induction of Kainic Acid. *Malays J Med Sci.* 2018 Nov;25(6):28-45. doi: 10.21315/mjms2018.25.6.4.
16. Yoo JM, Lee BD, Sok DE, et al. Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells. *Redox Biol.* 2017 Apr;11:592-599. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.034.
17. Yu SJ, Grider JR, Gulick MA, et al. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor is regulated by extracellular signal-regulated protein kinase 5 and by nerve growth factor retrograde signaling in colonic afferent neurons in colitis. *Exp Neurol.* 2012 Dec;238(2):209-17. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.08.007.
18. R. Levi-Montalcini. The Saga of the Nerve Growth Factor: Preliminary Studies, Discovery, Further Development. Singapore: World Scientific; 1997.
19. Salehi A, Delcroix JD, Mobley WC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2003 Feb;26(2):73-80. doi: 10.1016/S0166-2236(02)00038-3.
20. Lazo OM, Mauna JC, Pissani CA, et al. Axotomy-induced neurotrophic withdrawal causes the loss of phenotypic differentiation and downregulation of NGF signalling, but not death of septal cholinergic neurons. *Mol Neurodegener.* 2010 Jan 19;5:5. doi: 10.1186/1750-1326-5-5.



# Оценка пролиферативной активности дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора *in vitro*

Логвинов И. О., Николаев С. В., Антипова Т. А.

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

## Аннотация

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния димерных дипептидных миметиков 1-, 2- и 4-й петель BDNF — ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-моносукцинил-метионил-серина), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис-гексаноил-серил-лизина) и ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-серил-лизина) на пролиферацию гиппокампальных клеток линии HT-22 с использованием МТТ-теста. Установлено, что миметики 1-, 2- и 4-й петель BDNF после инкубации с клетками HT-22 в течение 48 и 72 часов не влияли на их пролиферативную активность.

**Ключевые слова:** пролиферация; BDNF; димерные дипептидные миметики; ГСБ-214; ГТС-201; ГСБ-106

## Для цитирования:

Логвинов И. О., Николаев С. В., Антипова Т. А. Оценка пролиферативной активности дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора *in vitro*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):9–12. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-9-12>. EDN: CYYCGD

**Поступила:** 02.08.2025. **В доработанном виде:** 07.09.2025. **Принята к печати:** 22.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## Evaluation of proliferative activity of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor *in vitro*

Ilya O. Logvinov, Sergey V. Nikolaev, Tatyana A. Antipova

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

## Abstract

The purpose of this work was to study the effect of dimeric dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of BDNF – GSB-214 (heptamethylenediamide bis-monosuccinyl-methionyl-serine), GTS-201 (hexamethylenediamide bis-hexanoyl-seryl-lysine) and GSB-106 (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-seryl-lysine) on the proliferation of the HT-22 hippocampal cells using MTT-assay. It has been established that the mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of BDNF after incubation with HT-22 cells for 48 and 72 hours did not affect their proliferative activity.

**Keywords:** proliferation; BDNF; dimeric dipeptide mimetics; GSB-214; GTS-201; GSB-106

## For citations:

Logvinov IO, Nikolaev SV, Antipova TA. Evaluation of proliferative activity of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor *in vitro*. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):9–12. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-9-12>. EDN: CYYCGD

**Received:** 02.08.2025. **Revision received:** 07.09.2025. **Accepted:** 22.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов. Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов, нейротрофины рассматриваются как перспективные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний. BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он регулирует развитие нейронов, синаптическую пластичность, нейрогенез и другие важные функции центральной нервной системы, улучшает выживание и предупреждает дегенерацию нейронов. Нарушение физиологической нормы содержания BDNF сопровождается многими нейродеге-

неративные и психические заболевания [1, 2]. Кроме того, на моделях депрессии *in vivo* показано снижение уровня BDNF. При центральном введении BDNF проявляет выраженный антидепрессивный эффект [3]. Несмотря на многообещающие данные доклинических исследований, клинические испытания BDNF в качестве потенциального лекарственного средства не увенчались успехом, в первую очередь из-за таких фармакокинетических ограничений, как малый период полужизни в кровотоке, низкая способность проникать через гематоэнцефалический барьер и наличие нежелательных побочных эффектов [4, 5].

В рамках развития направления по созданию низкомолекулярных миметиков отдельных петель



нейротрофинов в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» были синтезированы димерные дипептидные миметики 1-, 2- и 4-й петли BDNF — ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-моносукцинил-метионил-серина), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис-гексаноил-серил-лизина) и ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-серил-лизина). Ранее было показано, что миметики проявляли нейропротекторную и антидепрессивную активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также активировали специфический для BDNF рецептор TrkB [6, 7].

Из данных литературы известно, что BDNF имеет большое влияние на стимуляцию роста и пролиферацию нейронов [8]. Цель настоящей работы состояла в оценке влияния на пролиферативную активность клеток линии HT-22 миметиков BDNF для исключения гиперпролиферации.

## Материалы и методы / Materials and methods

### 1. Культура гиппокампальных клеток линии HT-22

В настоящей работе использовали пролиферирующие клетки гиппокампа мыши линии HT-22 [9]. До исследования клетки культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 5 % телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, США) и 2 mM L-глутамина (ICN, Германия), и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки рассевали на 96-луночные планшеты, обработанные поли-Д-лизином (BD Biosciences, США; 5 мкг/см<sup>2</sup>), с плотностью 3,5 тыс. на лунку.

### 2. МТТ-тест

Влияние исследуемых миметиков на пролиферацию клеток определяли с использованием МТТ-теста. Принцип метода основан на способности сукцинатдегидрогеназы, фермента мембраны митохондрий, восстанавливать жёлтую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Таким образом, повышенная жизнеспособность клеток приводит к увеличению активности митохондриальных дегидрогеназ в образце, что можно количественно измерить по увеличению интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме. Гиппокампальные нейроны HT-22 инкубировали с ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 (10<sup>-5</sup>–10<sup>-8</sup>М) в течение 48 и 72 часов, после чего среду удаляли, в лунки вносили 50 мкл готового раствора МТТ (5 мг/мл). После 45 мин инкубации, в лунки вносили на 200 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и инкубировали дополнительные 30 мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Multiscan EX» (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

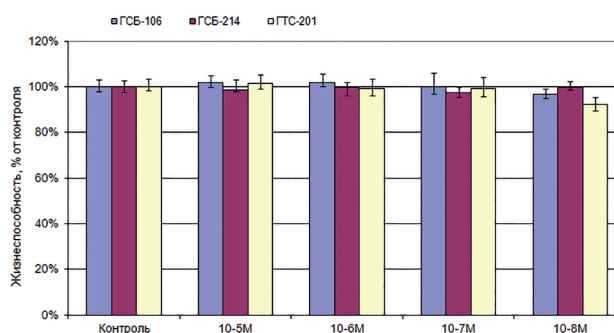
### 3. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса

с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде медианы и квартильных размахов. Результаты считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Анализ пролиферативной активности показал, что при инкубации с миметиками 1-й петли — ГСБ-214, 2-й петли — ГТС-201 и 4-й петли — ГСБ-106 в конечных концентрациях 10<sup>-5</sup>–10<sup>-8</sup>М в течение 48 часов, гиппокампальные нейроны HT-22 пролиферировали подобно интактным клеткам (рис. 1).



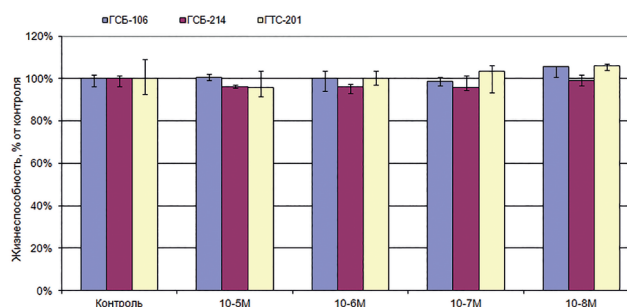
**Рис. 1.** Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 (инкубация в течение 48 ч) на пролиферацию гиппокампальных нейронов линии HT-22 (результаты МТТ-теста)

**Fig. 1.** Effect of various concentrations of GSB-214, GTS-201, and GSB-106 (48-hour incubation) on the proliferation of HT-22 hippocampal neurons (MTT test results)

Примечание: \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

Note: \* —  $p \leq 0.05$  compared to control.

Аналогичные результаты были получены через 72 часа культивирования клеток HT-22 в присутствии миметиков BDNF (рис. 2). Достоверных отличий от контрольных значений выявлено не было.



**Рис. 2.** Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 (инкубация в течение 72 ч) на пролиферацию гиппокампальных нейронов линии HT-22 (результаты МТТ-теста).

**Fig. 2.** Effect of various concentrations of GSB-214, GTS-201, and GSB-106 (72-hour incubation) on the proliferation of HT-22 hippocampal neurons (MTT test results)

Примечание: \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

Note: \* —  $p \leq 0.05$  compared to control.

Таким образом, в данной работе в экспериментах *in vitro* с помощью МТТ-теста нами было показано, что димерные дипептидные миметики, созданные на основе бета-изгибов 1-й петли (ГСБ-214), 2-й петли (ГТС-201) и 4-й петли (ГСБ-106) BDNF, при инкубации в течение 48 и 72 часов не оказывают влияние на пролиферативную активность гиппокампальных нейронов НТ-22. Различий в проявлении пролифе-

ративного эффекта у изученных дипептидов также выявлено не было.

### Заключение / Conclusion

Установлено, что миметики 1-, 2- и 4-й петель BDNF в концентрациях  $10^{-5}$ — $10^{-8}$  М не оказывают влияния на пролиферативную активность клеток НТ-22.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Участие авторов

Логвинов И. О. — выполнение экспериментальных работ с культурами клеток, написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи; Николаев С. В. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, редактирование, финальное утверждение рукописи; Антипова Т. А. — анализ и интерпретация результатов, редактирование, финальное утверждение рукописи. 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 conflicts of interest.

#### Authors' participation

Logvinov IO — performing experimental work with cell cultures, writing the text, editing, and final approval of the manuscript; Nikolaev SV — developing the model, analyzing and interpreting the results, editing, and final approval of the manuscript; Antipova TA — analyzing and interpreting the results, editing, and final approval of the manuscript. 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

**Логвинов Илья Олегович** — н. с. лаборатории молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: logvinov\_io@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

РИНЦ SPIN-код: 9909-9630

**Ilya O. Logvinov** — Research Scientist Molecular pharmacology laboratory, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author**

e-mail: logvinov\_io@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

RSCI SPIN code: 9909-9630

**Николаев Сергей Владимирович** — н. с. лаборатории молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

e-mail: nikolaev\_sv@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4584-746X>

РИНЦ SPIN-код: 1144-0269

**Sergey V. Nikolaev** — Research Scientist Molecular pharmacology laboratory, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: nikolaev\_sv@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4584-746X>

RSCI SPIN code: 1144-0269

**Антипова Татьяна Алексеевна** — к. б. н., в. н. с.  
лаборатории молекулярной фармакологии,  
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных  
биомедицинских и фармацевтических техноло-  
гий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: antipova\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>  
РИНЦ SPIN-код: 7723-6008

**Tatyana A. Antipova** — PhD, Cand. Sci. (Biology),  
Leading researcher, Molecular pharmacology labo-  
ratory, Federal Research Center for Innovator and  
Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technol-  
ogies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: antipova\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>  
RSCI SPIN code: 7723-6008

## Список литературы / References

1. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2009 Jun;5(6):311-22. doi: 10.1038/nrneurol.2009.54.
2. Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Nov;35(12):2378-91. doi: 10.1038/npp.2010.114.
3. Castrén E, Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*. 2010 Apr;70(5):289-97. doi: 10.1002/dneu.20758.
4. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*. 1999 Apr 22;52(7):1427-33. doi: 10.1212/wnl.52.7.1427.
5. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Mar;36(2):280-6. doi: 10.1016/0169-328x(95)00250-v.
6. 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, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):280-290. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1068162012030053.
7. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М. и др. Новый дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора селективно активирует сигнальный путь MAPK-Erk. *Доклады Академии наук*. 2017;47(1):108-112. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Sazonova NM, et al. A novel dimeric dipeptide mimetic of the BDNF selectively activates the MAPK-Erk signaling pathway. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;47(1):291-295. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869565217250235.
8. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Apr;4(4):299-309. doi: 10.1038/nrn1078.
9. Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res*. 1994 Jul 25;652(1):169-73. doi: 10.1016/0006-8993(94)90334-4.





# О селективном антибактериальном действии соединений цинка на патогенную и полезную микробиоту

Громова О. А.<sup>1</sup>, Торшин И. Ю.<sup>1</sup>, Галенко-Ярошевский П. А.<sup>2</sup>, Громов А. Н.<sup>1</sup>, Семенов В. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Российская Федерация

## Аннотация

Антибактериальные свойства цитрата цинка важны для лечения и профилактики патологий, вызываемых бактериальными и вирусными патогенами. Микроэлемент цинк оказывает подавляющее воздействие на патогенную микробиоту и поддерживает разные аспекты жизнедеятельности полезной микрофлоры. Однако механизмы такого «двойного» действия цинка на микробиоту недостаточно изучены. Анализ 5103 публикаций по антибактериальным эффектам солей цинка позволил провести логическое обоснование селективного бактериостатического и бактерицидного действия цинка против патогенной флоры: (1) соли цинка (например, цитрат цинка), поступающие в составе пробиотиков (например, Аципол Форте) поддерживают полезную микробиоту (лакто- и бифидобактерии), которая, в свою очередь, вытесняет патогенную; (2) поддержка цинком гуморального и клеточного иммунитета организма-хозяина; (3) дифференцированное, генетически-обусловленное воздействие соединений цинка на определённые штаммы бактериальных патогенов и полезной микробиоты.

**Ключевые слова:** микробиом человека; микроэлементы; цинк; антибактериальный иммунитет; антибиотическое действие; бактериальный геном

## Для цитирования:

Громова О. А., Торшин И. Ю., Галенко-Ярошевский П. А., Громов А. Н., Семенов В. А. О селективном антибактериальном действии соединений цинка на патогенную и полезную микробиоту. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):13–20. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-13-20>. EDN: MSACJA

**Поступила:** 28.07.2025. **В доработанном виде:** 01.09.2025. **Принята к печати:** 25.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## *On the selective antibacterial action of zinc compounds on pathogenic and beneficial microbiota*

Olga A. Gromova<sup>1</sup>, Ivan Yu. Torshin<sup>1</sup>, Pavel A. Galenko-Yaroshevsky<sup>2</sup>, Andrey N. Gromov<sup>1</sup>, Vladimir A. Semenov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center "Computer Science and Control" RAS, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>3</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

## Abstract

The antibacterial properties of zinc citrate are important for the treatment and prevention of pathologies caused by bacterial and viral pathogens. The trace element zinc exerts a suppressive effect on pathogenic microbiota and supports various aspects of beneficial microflora. However, the mechanisms of this "dual" action of zinc on microbiota are poorly understood. An analysis of 5,103 publications on the antibacterial effects of zinc salts provided a logical justification for zinc's selective bacteriostatic and bactericidal action against pathogenic flora: (1) zinc salts (e.g., zinc citrate), included in probiotics (e.g., Acipol Forte), support beneficial microbiota (lacto- and bifidobacteria), which, in turn, displace pathogenic microbiota; (2) zinc supports humoral and cellular immunity in the host; (3) differentiated, genetically determined effects of zinc compounds on specific strains of bacterial pathogens and beneficial microbiota.

**Keywords:** human microbiome; trace elements; zinc; antibacterial immunity; antibiotic action; bacterial genome

## For citations:

Gromova OA, Torshin IYu, Galenko-Yaroshevsky PA, Gromov AN, Semenov VA. On the selective antibacterial action of zinc compounds on pathogenic and beneficial microbiota. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):13–20. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-13-20>. EDN: MSACJA

**Received:** 28.07.2025. **Revision received:** 01.09.2025. **Accepted:** 25.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

Соединения цинка характеризуются выраженным антибактериальным эффектом. Препараты на основе солей цинка широко используются в терапии, в т. ч. в гастроэнтерологии. При этом, очевидно, что ионы цинка должны подавлять рост именно патогенных бактерий и, наоборот, поддерживать рост полезной микробиоты. В то же время нельзя исключить, что достаточно высокие уровни цинка могут быть токсичны и для полезных бактерий, а некоторые патогены могут характеризоваться механизмами, позволяющими им выживать в условиях повышенных уровней цинка. Основной вопрос заключается в том, посредством каких именно *молекулярно-генетических механизмов* микроэлемент цинк подавляет рост патогенных бактерий и в то же время поддерживает рост полезной микробиоты.

Поиски по базе данных PUBMED показали, что по антибактериальным эффектам цинка имеется 8403 публикации (запрос «zinc and antibacterial», данные на август 2025 года). Исключение публикаций, связанных с оксидом цинка (который используется в составе антибактериальных кремов и мазей), приводит к нахождению 5103 по всем остальным антибактериальным эффектам цинка (запрос «zinc and antibacterial NOT ZnO NOT zinc oxide»). При этом имеется достаточно большое число исследований (более 900), в которых антибактериальные эффекты различных соединений цинка были оценены количественно, посредством измерений минимальных подавляющих концентраций (МПК) и минимальных бактерицидных концентраций (МБК, запрос «zinc AND ("minimum inhibitory concentration" OR MIC OR "minimum bactericidal concentration" OR MBC)», 929 публикаций).

Анализ указанных выше массивов публикаций позволил сформулировать три основных механизма того, каким именно образом цинк оказывает избирательное подавляющее воздействие на патогенную микробиоту, поддерживая при этом полезную микробиоту:

*Во-первых*, при поступлении цинка в составе препарата ионы цинка поддерживают полезную микробиоту, и последняя вытесняет патогенную.

*Во-вторых*, цинк стимулирует иммунитет человека, клеточные и гуморальные компоненты которого атакуют именно патогенную микробиоту, но не затрагивают нормобиоту.

*В-третьих*, может быть разная токсичность соединений цинка по отношению к определённым штаммам патогенной и полезной микробиоты. Рассмотрим эти механизмы более подробно.

**При поступлении цинка в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) в составе препарата ионы цинка поддерживают полезную микробиоту, вытесняя патогенную / When zinc enters the gastrointestinal tract (GIT)**

## as part of the preparation, zinc ions support beneficial microbiota, displacing pathogenic ones

Цинк может поступать в организм в составе комплексных пробиотических препаратов, направленных на поддержку здоровой микробиоты. Хорошо известно, что бактерии с пробиотическими свойствами используются для оздоровления микробиома пациента. Эффекты бактерий-пробиотиков усиливаются как посредством дополнительных веществ-пребиотиков (фруктоолигосахариды, инулин и др.), так и посредством эссенциальных микронутриентов (прежде всего, цинка).

Например, фармакоинформационное исследование синергизма воздействия на микробиоту кишечника пробиотиков *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) ATCC 53103 (LGG), *Bifidobacterium longum* (*B. Longum*) CECT 7894 и цитрата цинка (являющегося высокоусвояемым источником микроэлемента цинка) позволил выявить системно-биологический синергизм между изученными штаммами пробиотиков (в составе препарата Аципол форте) и микроэлементом цинком.

Установлено, что аннотированный сегмент протеома *L. rhamnosus* GG содержит 103 цинк-зависимых белка, а протеома *B. longum* CECT 7894 — 204 белка. Выделены функциональные группы белков пробиотических бактерий, реализующих метаболические процессы: (1) преимущественно в *L. rhamnosus* (обмен сахаров, аминокислот метионина и гистидина, протеолиз, витамин-PP-зависимые функции); (2) преимущественно в *B. longum* (окислительно-восстановительные процессы, нуклеотидный обмен, обмен фруктозы, биосинтетические процессы, детоксикационные процессы, в т. ч. защита от тяжёлых металлов) и (3) в одинаковой степени в *L. rhamnosus* и *B. longum* (ремонт ДНК, обработка информации, кодированной в бактериальной ДНК, метаболизм аминокислот серина и глицина, энергетический метаболизм, обмен фолатов, синтез короткоцепочечных жирных кислот — пропионата, бутирата и др.). Микроэлемент цинк, поддерживая метаболизм *L. rhamnosus* GG и *B. longum* CECT 7894, усиливает пробиотические свойства обеих бактерий (что подтверждается результатами фундаментальных и клинических исследований) [1].

Лакто- и бифидобиотики, поддержанные цинком, оздоравливают микробиоту ЖКТ, что включает вытеснение болезнетворных бактерий из микробиома конкретного пациента. В частности, посредством выработки специальных *адгезионных белков* (в т. ч. составе «бактериальных щупалец» — т. н. пилей), LGG, поддерживаемый ионами цинка, конкурирует с патогенными бактериями за колонизацию поверхности ЖКТ с образованием нормофизиологических биоплёнок, тем самым не позволяя заселение ЖКТ бактериями-патогенами [2].

Заметим, что цитрат цинка — источник эссенциального микроэлемента цинка, характеризующийся самой высокой растворимостью, хорошей биодо-

ступностью и биоусвояемостью. Цитрат цинка не раздражает слизистую ЖКТ и не вызывает тошноту. Цитрат-анион является частью метаболома (эндогенной молекулой организма), которая формируется и используется в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Благодаря высокой растворимости и биоусвояемости цитраты эссенциальных микроэлементов, в т. ч. цинка, являются одними из наилучших форм для компенсации микроэлементных дефицитов [1] и, соответственно, для поддержки нормобиоты.

**Цинк стимулирует иммунитет человека, клеточные и гуморальные компоненты которого атакуют патогенную микробиоту / Zinc stimulates human immunity, the cellular and humoral components of which attack pathogenic microbiota**

Эссенциальный микроэлемент цинк проявляет свои антибактериальные свойства *in vivo*, т. е. в организме хозяина (человек, животные). Цинк играет важную роль в поддержании целостности эпителиального барьера (в т. ч. кишечного), предотвращая проникновение патогенных бактерий и способствуя общему иммунному ответу на инфекцию. Физиологические дозы цинка в пище или в виде органических солей в составе витаминно-минеральных комплексов необходимы для непрерывной регенерации слизистой кишечника.

Цинк является важным фактором разнообразия пейзажа полезной микробиоты кишечника, снижающий процессы системного воспаления организма-хозяина. Помимо воздействия на микробиом ЖКТ, цинк важен для функционирования организма человека в целом. В протеоме человека найдены более 1800 Zn-зависимых белков, так что функции каждой из 12 систем органов зависят от десятков или сотен этих Zn-связывающих белков. Таким образом, восполнение дефицита цинка будет иметь благоприятное воздействие на все системы органов, в особенности при хроническом дефиците цинка [3]. Адекватная обеспеченность цинком важна для:

- обмена жиров и углеводов, профилактики инсулинорезистентности и атеросклероза;
- поддержки функции ЖКТ (снижение продолжительности диареи, нормализация профиля микробиома ЖКТ);
- терапии и профилактики острых респираторных заболеваний (ОРЗ) [4, 5];
- профилактики врождённых пороков развития плода [6];
- модуляции микробиоты кишечника [7, 8];
- поддержки иммунного ответа при инвазии бактериальных и вирусных патогенов и др.

Влияние цинка на иммунную систему человека многогранно и включает взаимодействия «вирус—рецептор», активацию Т-лимфоцитов, антиапоптотическое действие и корректировку секреции цитокинов [5]. Микроэлемент цинк необходим для поддержания

врождённого и приобретённого противовирусного иммунитета; продемонстрированы противовоспалительные и противоопухолевые свойства органических солей цинка [9].

Цинк поддерживает количество периферийных и тимусных Т-клеток, улучшая функционирование Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток [10]. Цинк ингибирует про-апоптотические каспазы-3, -6 и -9, так что это *антиапоптотическое действие* ионов цинка приводит к увеличению числа Т-клеток, укрепляя *иммунностимулирующий эффект препаратов цинка* [10]. Другим возможным путём активации Т-клеток цинком является воздействие гормона тимулина (цинк-связывающий нонапептидный гормон, регулирующий дифференцировку незрелых Т-клеток в вилочковой железе и улучшающий функционирование зрелых Т-клеток) [8], стимулируя также биосинтез интерферонов [10].

Таким образом, поддерживая иммунитет, цинк способствует повышению эффективности атак клеточного и гуморального иммунитета против бактериальных и вирусных патогенов. В то же время полезная (нормофизиологическая) микробиота не вызывает столь выраженной реакции иммунной системы на себя. Следовательно, цинк, *поддерживая иммунитет организма-хозяина*, будет в целом способствовать выживанию полезной микробиоты и ингибировать рост патогенных бактерий посредством именно иммунологических механизмов.

**Дифференцированная токсичность соединений цинка по отношению к определённым штаммам патогенной и полезной микробиоты**

Эксперименты *in vitro* показали прямое бактерицидное действие соединений цинка на бактериальные патогены [11] и также вирусные патогены (например, ионы  $Zn^{2+}$  проявляют противовирусную активность посредством ингибирования РНК-полимеразы вируса SARS-CoV2 [12]).

Ионы цинка участвуют в повреждении мембран бактериальных патогенов, оказывают множественное ингибирующее действие на метаболизм патогенных бактерий, нарушая гликолиз (через ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, киназы пируватдегидрогеназы), биосинтез полисахаридов, трансмембранный перенос протонов и кислотоустойчивость бактерий. Ионы цинка, в зависимости от генетического профиля конкретного штамма патогена, могут повышать протонную проницаемость мембран, *снижая синтез аденозинтрифосфата* (АТФ) [13].

Ионы цинка характеризуются воздействием на конкретные сигнальные пути бактерий-патогенов. Например, наночастицы ZnO и растворы солей цинка показали различия в профилях избирательной чувствительности патогенов, связанные с конкретными сигнальными путями этих бактерий: т. н. «двухкомпонентной сигнализацией» (которая позволяет бак-



териям реагировать на факторы окружающей среды путём связывания белка-сенсора гистидинкиназы с белком-регулятором ответа бактерии) и биосинтезом моносахаридов [14].

В то же время публикаций, в которых бы были представлены результаты систематического изучения сравнительных эффектов соединений цинка на патогенные и на полезные штаммы бактерий, нами не было обнаружены. Одной из основных трудностей при проведении такого рода исследований является существенная зависимость эффектов цинка от генетического профиля микроорганизмов (т. е. от конкретных штаммов бактерий).

Результаты отдельных исследований показали, что ионы цинка модулируют состояние микробиоты, напрямую снижая уровень патогенных бактерий, т. е. без участия иммунной системы организма-хозяина. Более того, цинк может модулировать выживаемость различных вариантов генома патогенных бактерий. Например, анализ 179 штаммов *E. coli* показал, что патогенные штаммы, содержащие гены, связанные с вирулентностью, энтеротоксичностью и энтеропатогенностью патогенов, были менее распространены в популяциях бактерий на фоне дотаций цинка [7].

Установлена связь между сниженной обеспеченностью цинком и специфическими изменениями микробиома ЖКТ. Например, для пациентов с шизофренией характерно наличие делеции Zn-транспортера ZIP8 и снижение численности родов *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Lachnospira*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* [8].

Воздействие цинка на геном бактериальных патогенов связано как с выживаемостью соответствующих генетических вариантов (штаммов) бактерий, так и с прямым воздействием на процесс т. н. «горизонтального переноса» генов резистентности к цинку и к антибиотикам от бактерии к бактерии (в т. ч. через блокировку процессов мутагенеза бактериальной ДНК, приводящего к формированию резистентных мутантов) [15].

Известен т. н. «SOS-ответ» грамотрицательных и грамположительных бактерий на повреждение ДНК: при значительном повреждении геномной ДНК происходит активация склонных к ошибкам ДНК-полимераз, что индуцирует более высокую частоту мутаций. Этот процесс называется «фенотипом SOS-мутатора» или «гипермутацией». Показано, что ионы цинка блокируют такой гипермутационный ответ, вызванный хинолоновыми антибиотиками и митомицином C у *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Цинк блокирует SOS-индуцированное развитие резистентности к хлорамфениколу у *Enterobacter cloacae*. Цинк также блокирует горизонтальный перенос гена бета-лактамазы расширенного спектра от *Enterobacter* к штаммам *E. coli*. Цинк ингибирует развитие гипермутации у *E. cloacae*, вызванной ципрофлоксацином. Цинк блокировал способность белка *RecA E. coli*,

участвующего в ремонте повреждений ДНК, связываться с одноцепочечной ДНК (что является важным ранним этапом распознавания повреждений ДНК у кишечных бактерий). Важно отметить, что другие двухвалентные металлы, такие как железо и марганец, не ингибировали эти процессы. Это предполагает механизм специфического ингибирующего действия именно ионов цинка на бактериальные SOS-ответы, прежде всего, на ингибирование гипермутации [16].

Анализ 116 грамотрицательных штаммов показал, что 27 были чувствительны к антибиотикам, а 89 проявили множественную резистентность. Передача устойчивости к ртути, достигнутая в 56 % случаев, всегда сопровождалась передачей устойчивости к антибиотикам. МПК фенилртутибората, тиоловой ртути и других солей тяжёлых металлов (цинка, а также кобальта, никеля и др.) примерно одинакова для всех штаммов. Любопытно отметить, что соединения ртути могут играть роль в селекции и в горизонтальном переносе генов грамотрицательных бактерий, устойчивых к антибиотикам [17].

В целом, микроорганизмам и другим клеткам необходимо наличие двух групп молекулярных механизмов, связанных с цинком: (1) активация поглощения и удержания цинка при его дефиците внутри клетки и (2) прекращение поступления цинка и активация его элиминации при его избытке в клетке и окружающей среде. Конкретные микроорганизмы и их штаммы существенно различаются по наличию этих двух видов молекулярных механизмов [18].

Экспорт и поглощение цинка у бактерий осуществляется ABC-транспортёрами, АТФазами Р-типа, катализаторами диффузии катионов (CDF), белками резистентности деления клеток (RND). Экспрессия каждой из этих систем оттока цинка из клетки строго контролируется соответствующим регулятором транскрипции. Наиболее важными бактериальными сенсорами, участвующими в гомеостазе цинка, являются бактериальные белки групп Fur — Zur, Mar — AdcR (всасывание ионов металлов), ArsR — SmtB и MerR — ZntR (отток ионов металлов) [19].

#### Обзор конкретных бактериальных генов, влияющих на цинк-зависимое выживание соответствующих штаммов

У грамотрицательных бактерий, растущих в условиях избытка цинка, поглощение цинка в первую очередь опосредовано транспортёром ZurT. Реакция на дефицит цинка контролируется посредством скоординированной экспрессии набора генов, регулируемых транскрипционным фактором Zn-чувствительным Zur [20]. Наличие таких генов у бактерий будет способствовать выживанию в условиях повышенной концентрации цинка.

АТФазы Р-типа являются ключевыми элементами гомеостаза цинка и ионов других металлов. Эти белки суть АТФ-зависимые насосы, транспортирующие

ионы меди, цинка, кобальта (а также токсичных Cd и Pb) через мембраны и управляющиеся специальными транскрипционными факторами. Например, транспортёр **ZntA** в *E. coli* удаляет из клетки избыток ионов цинка и активируется фактором транскрипции **ZntR** при высоких концентрациях цинка [21].

Выживаемость микобактерий *M. tuberculosis* в условиях повышенного содержания цинка напрямую зависит от экспрессии АТФаз Р-типа, которые обеспечивают отток тяжёлых металлов и предотвращают внутриклеточное накопление цинка. Макрофаги человека контролируют микобактерии, повышая уровень цинка в фагосомах, содержащих бактерии. Этот процесс зависит от активных форм кислорода, генерируемых фагоцитами. НАДФН-оксидаза участвует в мобилизации цинка из внутриклеточных запасов [22].

Когда у микобактерий (или патогенной кишечной палочки, или других патогенных бактерий) отсутствует оттоковый насос **СтрС**, они демонстрируют сниженную способность к выживанию в условиях повышенных уровней цинка. Штаммы сальмонелл, лишённые генов **znuA/B/C**, демонстрируют такую же выраженную потерю вирулентности [18].

Существуют мутанты *M. tuberculosis* в генах АТФаз Р-типа (**стрV** и **стрС**), которые высокочувствительны к цинку. Более того, прямая инактивация гена **СтрС** значительно повышает чувствительность *M. tuberculosis* к ионам  $Zn^{2+}$  [22]. Поэтому, дотации цинка в форме органических солей (например, цитрата цинка) пациентам с туберкулёзом будут активировать макрофагальный иммунитет и существенно снижать выживаемость штаммов микобактерий с делециями **стрV**, **стрС** и других АТФаз Р-типа в организме хозяина.

**Катионные фасилитаторы диффузии (CDF)** являются транспортёрами, использующими протон-движущую силу антипортеров типа « $M^{2+}/H^{+}$ » (двухвалентный металл-протон) для переноса ионов металлов из цитозоля (либо за пределы клетки, либо в другие клеточные компартменты). Примерами бактериальных CDF являются **ZitB** и **Yiip** у *Escherichia coli*, **CzcD** у *Cupriavidus metallidurans* и *Bacillus subtilis*, **CzrB** в *Thermus thermophilus*. Очень важным экспортёром в *E. coli* является **ZitB** из класса CDF, повышающий жизнеспособность клеток в условиях высокой концентрации цинка в окружающей среде. Исследования направленного мутагенеза показали влияние остатков гистидина на функцию **ZitB**: при отсутствии остатков **His** **ZitB** функционально не активен [18].

**Белки системы оттока цинка RND** включают центральный антипортер RND-субстрата, белок слияния периплазматической мембраны (MFP) и фактор внешнего мембранного канала. Периплазматическая часть бактерии соединена с тримерным фактором внешнего мембранного канала, образуя единую трубку. Эта трубка с одной стороны открыта во внеклеточное пространство, а второй конец соединён с отверстием

на вершине RND-белка. Система RND работает как трёхсторонний эффлюксный насос, образуя функциональный комплекс, достигающий как внутренней, так и внешней мембраны. Например, экспортёр **ZntB**, белок оттока цинка из патогенных протеобактерий, принадлежит к типу переносчиков металлов **CoxA**. Это белок внутренней мембраны, подобный АТФазе [18, 19].

Таким образом, известны десятки бактериальных генов, наличие которых у тех или иных штаммов микробиоты влияет на выживание бактерий в условиях повышенных концентраций цинка. Поэтому, ионы цинка могут оказывать таргетное воздействие на соответствующие бактериальные штаммы, формируя определённые профили микробиоты. Рассмотрим более подробно эффекты цинка по отношению к различным видам бактериальных патогенов.

#### Цинк и *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) производит множество факторов вирулентности для проникновения и установления инфекций в организме хозяина, а биоплёнки более устойчивы к антибиотикам, чем планктонные клетки. Соли цинка проявляли хорошую антибактериальную активность против *S. aureus* (МПК 128 мкг/мл для протестированных штаммов), а в концентрации 256 мкг/мл ингибировали образование биоплёнок всех штаммов. Экспрессия генов, связанных с биоплёнкой, была подавлена у бактерий, обработанных сульфатом цинка, по сравнению с необработанными клетками. Кроме того, сульфат цинка может ингибировать гемолитическую активность *S. aureus*, вызывая значительное снижение активности коагулазы и каталазы [20].

Устойчивость золотистого стафилококка к цинку тесно взаимосвязана с устойчивостью этих бактерий к метицилину. Распространённость устойчивости к цинку коррелировала с распространённостью метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA). Анализ выборки 476 изолятов MRSA от свиней из десяти европейских территорий на чувствительность к хлориду цинка с учётом ПЦР-теста на ген **czrC** (кодирует белок устойчивости к кадмию и цинку **C**) показал, что фенотипическая устойчивость к цинку (МПК >2 мМ) наблюдалась у 74 % ( $n = 324$ ) и 42 % ( $n = 39$ ) изолятов MRSA CC398. Почти все (99 %) цинк-резистентные штаммы типа MRSA содержали ген **czrC** [21].

#### Цинк и стрептококки

В метаанализе подтверждена антибактериальная активность цинка в отношении *Streptococcus mutans*: из 17 исследований только в двух не сообщалось об ингибирующем эффекте солей цинка. Антибактериальная активность соединений цинка в существенной мере зависит и от бактериального штамма, и от формы цинка. Например, при исследовании штамма *S. mutans* GS-5 МПК хлорида цинка составила 25 мкМ, а хлоргексидина — 0,8 мкМ. В то же время

при исследовании штамма *S. mutans* PTC-1683 МПК наночастиц оксида цинка составила 0,390 мкг/мл, а хлоргексидина — 2,5 мкг/мл [22].

Хлорид цинка, сульфат цинка и ацетат цинка, протестированные против *S. mutans* и *S. sobrinus* (кариесогенная бактерия), имели статистически достоверно меньшую зону подавления роста по сравнению с хлоргексидином ( $p < 0,001$ ). Хлорид цинка характеризовался наибольшей зоной подавления роста против *S. sobrinus* ( $20 \text{ мм} \pm 5,5$ ), сопоставимой с хлоргексидином ( $22 \pm 4 \text{ мм}$ ) ( $p > 0,05$ ) [23].

#### Цинк и другие виды бактерий

Эффективность различных комбинаций антибиотиков с сульфатом цинка *in vitro* против изолятов *P. aeruginosa* CCIN34519 от госпитализированных пациентов с инфекцией мочевыводящих путей указала на синергидное действие цинка с фторхинолонами (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин и норфлоксацин) и карбапенемом (сниженные значения МПК) и антагонизм с цефалоспорином (цефтриаксон), аминогликозидами (гентамицином и тобрамицином), о чём свидетельствуют повышенные значения МПК [23].

Ионы цинка также способствуют *торможению активности патогенных грибов*. Так, МПК соединений цинка в отношении *C. albicans* составила 1,0–2,4 мМ, в зависимости от штамма. Кандидоцидная активность составила 17,7–38,8 % и 23,7–47,0 % при концентрациях 1,0 и 10 мМ соответственно. Соединения цинка усиливают активность лизоцимов (фермент,

действующий как антисептик, разрушающий клеточные стенки бактерий и грибов и являющийся частью врождённого иммунитета) [24].

#### Заключение / Conclusion

Дифференцированное воздействие цинка на микробиом складывается из поддержки цинком полезной эндогенной микробиоты и экзогенных пробиотиков, усиления иммунитета организма-хозяина, выживаемости генетически-детерминированных штаммов с генами резистентности к цинку. При поступлении в организм в комбинации с полезными пробиотическими бактериями цинк оказывается предпочтительное воздействие именно на полезную эндогенную микробиоту. При этом происходит вытеснение патогенной микробиоты, причём вне зависимости от их генетического профиля (даже если последний и обеспечивает резистентность к цинку). Если же патогенная флора содержит описанные выше делеции генов резистентности к цинку (даже и при высоких концентрациях цинка) (ABC-транспортёров, АТФаз Р-типа, генов типов CDF, RND и др.), то комбинация цинка с пробиотиками будет резко снижать выживаемость таких штаммов патогенов. Цитрат цинка способствует поддержке иммунитета организма человека и одновременно повышает адаптивности входящих в комплекс лакто- и бифидобактерий (поддержка рибосомального синтеза белков и ремонта ДНК, прежде всего), формируется более выраженное противовоспалительное действие и иммунный ответ.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

##### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

##### Участие авторов

Все авторы приняли равнозначное участие в написании статьи.

##### Финансирование

Работа выполнена в рамках Госзадания «Математические методы анализа данных и прогнозирования 2024–2028», Шифр: FFNG-2024-0003, № государственной регистрации: 124040200033-9.

#### ADDITIONAL INFORMATION

##### Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

##### Authors' participation

All authors contributed equally to this work.

##### Funding

The work was carried out within the framework of the State Assignment "Mathematical Methods of Data Analysis and Forecasting 2024–2028", Code: FFNG-2024-0003, State Registration No.: 124040200033-9.



## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Громова Ольга Алексеевна** — д. м. н, профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация  
*Автор ответственный за переписку*  
e-mail: unesco.gromova@gmail.com  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
РИНЦ SPIN-код: 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

**Галенко-Ярошевский Павел Александрович** — д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России), Краснодар, Российская Федерация  
e-mail: Galenko.Yarochevsky@gmail.com  
ORCID ID <http://orcid.org/0000-0003-3190-1437>

**Громов Андрей Николаевич** — инженер-исследователь ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7507-191X>  
РИНЦ SPIN-код: 8034-7910

**Семенов Владимир Александрович** — д. м. н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии, медицинской генетики и медицинской реабилитации КемГМУ Минздрава России, Кемерово, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8958-6495>  
РИНЦ SPIN-код: 9741-3771

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

**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

**Pavel A. Galenko-Yaroshevsky** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, RAS corresponding member, Head of the Department of Pharmacology of Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation  
e-mail: Galenko.Yarochevsky@gmail.com  
ORCID ID <https://orcid.org/0000-0003-3190-1437>

**Andrey N. Gromov** — research engineer, FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7507-191X>  
RSCI SPIN code: 8034-7910

**Vladimir A. Semenov** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Neurology, Neurosurgery, Medical Genetics and Medical Rehabilitation, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8958-6495>  
RSCI SPIN code: 9741-3771

## Список литературы / References

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Сорокин А.И. Фармакоинформационное исследование синергизма воздействия на микробиоту кишечника пробиотиков *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Bifidobacterium longum* CECT 7894 и цитрата цинка. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2025;(1):40-58. [Gromova OA, Torshin IYu, Sorokin AI. Pharmacoinformatic study of the synergistic effect of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Bifidobacterium longum* CECT 7894 and zinc citrate on the intestinal microbiota. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2025;(1):40-58. (In Russ.)]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-233-1-40-58.
2. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *J Clin Gastroenterol*. 2019 Mar;53 Suppl 1:S1-S41. doi: 10.1097/MCG.0000000000001170.
3. Микронутриенты и репродуктивное здоровье : руководство / О. А. Громова, И. Ю. Торшин. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. 826 с. [Micronutrients and Reproductive Health. Handbook. Gromova OA, Torshin IYu. 2nd revised and supplemented edition. GEOTAR-Media, 2022. (In Russ.)]. ISBN 978-5-9704-6786-2.

4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Моисеев В.С. и др. Об использовании цинка и витамина С для профилактики и адъювантной терапии острых респираторных заболеваний. *Терапия*. 2017;11(1):36-46. [Gromova OA, Torshin IYu, Moiseev VS, et al. The use of zinc and vitamin C for the prevention and adjuvant therapy of acute respiratory diseases. *Therapy*. 2017;11(1):36-46. (In Russ.)].
5. Громова О., Шилиаев Р., Торшин И., и др. Использование различных способов приема биоусвояемых органических солей цинка С экстрактом молозива у часто и длительно болеющих детей. *Педиатрическая фармакология*. 2009;6(1):37-42. [Gromova O, Shilyaev R, Torshin I, et al. Various ways of the organic zinc salts administration with a colostrum in frequently and protractedly sick children. *Pediatric pharmacology*. 2009;6(1):37-42. (In Russ.)].
6. Громова О.А., Торшин И.Ю. Цинк как необходимый элемент профилактики врожденных пороков развития плода. *Медицинский алфавит*. 2016;1(7):19-25. [Gromova OA, Torshin IYu. Zinc as a necessary element in the prevention of congenital malformations of the fetus. *Medical alphabet*. 2016;1(7):19-25. (In Russ.)].
7. Johanns VC, Epping L, Semmler T, et al. High-Zinc Supplementation of Weaned Piglets Affects Frequencies of Virulence and Bacteriocin Associated



Genes Among Intestinal *Escherichia coli* Populations. *Front Vet Sci*. 2020 Dec 16;7:614513. doi: 10.3389/fvets.2020.614513.

8. Li D, Achkar JP, Haritunians T, et al. A Pleiotropic Missense Variant in SLC39A8 Is Associated With Crohn's Disease and Human Gut Microbiome Composition. *Gastroenterology*. 2016 Oct;151(4):724-32. doi: 10.1053/j.gastro.2016.06.051.

9. Микронутриенты и репродуктивное здоровье: руководство/ О. А. Громова, И. Ю. Торшин. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 826 с. [Micronutrients and Reproductive Health. Handbook. Gromova OA, Torshin IYu. 2nd revised and supplemented edition. GEOTAR-Media, 2022. (In Russ.)]. ISBN 978-5-9704-6786-2.

10. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, et al. High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 2007 Dec;75(12):5867-76. doi: 10.1128/IAI.00559-07.

11. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии = Expert data analysis in molecular pharmacology / И. Ю. Торшин, О. А. Громова. Москва : МЦНМО, 2012. — 684 с. [Expert data analysis in molecular pharmacology. Torshin IYu, Gromova OA. Moscow. MCNMO. 2012. (In Russ.)]. ISBN 978-5-4439-0051-3.

12. Громова О. А., Торшин И. Ю., Чучалин А. Г., Максимов В. А. Микробиом, пробиотики и COVID-19: перспективные подходы к поддержке систем врожденного и приобретённого иммунитета. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;188(4):68-75. [Gromova OA, Torshin IYu, Chuchalin AG, Maksimov VA. Microbiome, probiotics, and COVID-19: promising approaches to support innate and acquired immunity systems. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;188(4):68-75. (In Russ.)]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-188-4-68-75.

13. Almoudi MM, Hussein AS, Abu Hassan MI, Mohamad Zain N. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. *Saudi Dent J*. 2018 Oct;30(4):283-291. doi: 10.1016/j.sdentj.2018.06.003.

14. Reyes VC, Li M, Hoek EM, et al. Genome-wide assessment in *Escherichia coli* reveals time-dependent nanotoxicity paradigms. *ACS Nano*. 2012 Nov 27;6(11):9402-15. doi: 10.1021/nn302815w.

15. Crane JK, Cheema MB, Olyer MA, Sutton MD. Zinc Blockade of SOS Response Inhibits Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes

in Enteric Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Nov 21;8:410. doi: 10.3389/fcimb.2018.00410.

16. Joly B, Cluzel R. Rôle des métaux lourds et de leurs dérivés dans la sélection de bacilles à gram négatif résistants aux antibiotiques [The role of heavy metals and their derivatives in the selection of antibiotics resistant gram-negative rods (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)*. 1975 Jul-Aug;126B(1):51-61. French.

17. Cerasi M, Ammendola S, Battistoni A. Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Dec 24;3:108. doi: 10.3389/fcimb.2013.00108.

18. Wątył J, Potocki S, Rowińska-Zyrek M. Zinc Homeostasis at the Bacteria/Host Interface-From Coordination Chemistry to Nutritional Immunity. *Chemistry*. 2016 Nov 2;22(45):15992-16010. doi: 10.1002/chem.201602376.

19. Neyrolles O, Mintz E, Catty P. Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Nov 27;3:89. doi: 10.3389/fcimb.2013.00089.

20. Abdelraheem WM, Kamel HS, Gamil AN. Evaluation of anti-biofilm and anti-virulence effect of zinc sulfate on *Staphylococcus aureus* isolates. *Sci Rep*. 2024 Oct 28;14(1):25747. doi: 10.1038/s41598-024-75317-0.

21. Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM. Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Vet Microbiol*. 2011 Jun 2;150(3-4):344-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.014.

22. Almoudi MM, Hussein AS, Mohd Sarmin NI, Abu Hassan MI. Antibacterial effectiveness of different zinc salts on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*: An *in-vitro* study. *Saudi Dent J*. 2023 Nov;35(7):883-890. doi: 10.1016/j.sdentj.2023.07.003.

23. Elkhatib W, Noreddin A. *In Vitro* Antibiofilm Efficacies of Different Antibiotic Combinations with Zinc Sulfate against *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infection. *Antibiotics (Basel)*. 2014 Feb 17;3(1):64-84. doi: 10.3390/antibiotics3010064.

24. Kim Y, Chang JY, Kim YY, et al. Effects of Zinc Compounds on the Enzymatic Activities of Lysozyme and Peroxidase and Their Antifungal Activities. *Biol Trace Elem Res*. 2024 Dec;202(12):5850-5862. doi: 10.1007/s12011-024-04110-x.



# Оценка препаратов рубрикатора АТХ методом хемореактомного скрининга для профилактики дефицитов магния и пиридоксина

Торшин И. Ю.<sup>1</sup>, Калачева А. Г.<sup>2</sup>, Громова О. А.<sup>1,2</sup>, Рогозин М. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Лекарственные препараты могут приводить к потере организмом магния и пиридоксина (витамин В<sub>6</sub>), что ведёт к формированию побочных эффектов и ухудшает течение основного заболевания.

**Цель.** Оценка антимикронутриентного действия всех препаратов рубрикатора АТХ методами хемореактомного скрининга.

**Материалы и методы.** Методами топологического анализа данных и анализа размеченных графов проведён систематический компьютерный анализ баз данных (SIDER, FAERS, PubChem, HMDB), разработаны алгоритмы прогнозирования магний- и пиридоксин-выводящих свойств лекарств с последующим скринингом 2527 препаратов АТХ.

**Результаты.** Аккуратность алгоритмов в кросс-валидации составила для дефицита магния 94–98 %, для дефицита витамина В<sub>6</sub> — 88 %. В среднем на каждый препарат приходится 8,5±6,5 антимикронутриентных эффектов. Только 4 % препаратов не проявляли негативного воздействия на микронутриентный обмен. Дефицит пиридоксина вызывают 1701 препарат (68 % от АТХ), дефицит магния — 1064 препарата (42 %). Наибольшее негативное влияние на гомеостаз обоих микронутриентов оказывают антибиотики (J01), психотропные средства (N05, N06), противоопухолевые препараты (L01), гормоны (G03), диуретики (C03), анальгетики (N02) и противовоспалительные средства (M01).

**Заключение.** Результаты хемореактомного скрининга позволят обоснованно рекомендовать сопровождение разнообразной фармакотерапии препаратами на основе пиридоксина и органических солей магния.

**Ключевые слова:** гипомagneзeмия; ятрогения; дефицит пиридоксина; гиповитаминоз; большие данные; фармакоинформатика

## Для цитирования:

Торшин И. Ю., Калачева А. Г., Громова О. А., Рогозин М. А. Оценка препаратов рубрикатора АТХ методом хемореактомного скрининга для профилактики дефицитов магния и пиридоксина. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):21–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-21-29>. EDN: MMTWCX

Поступила: 28.07.2025. В доработанном виде: 01.09.2025. Принята к печати: 25.09.2025. Опубликовано: 30.09.2025.

## Evaluation of ATX rubricator drugs by chemoreactome screening method for prevention of magnesium and pyridoxine deficiencies

Ivan Yu. Torshin<sup>1</sup>, Alla G. Kalacheva<sup>2</sup>, Olga A. Gromova<sup>1,2</sup>, Mikhail A. Rogozin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Ivanovo State Medical University of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation

## Abstract

**Relevance.** Medicines can cause the body to lose magnesium and pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>), which leads to the formation of side effects and worsens the course of the underlying disease.

**Objective.** Evaluation of the antimicronutrient effect of all drugs registered in the ATX rubricator using chemoreactome screening.

**Materials and methods.** Using methods of topological data analysis and labeled graph analysis, a systematic computer analysis of databases (SIDER, FAERS, PubChem, HMDB) was performed, algorithms for predicting magnesium-excreting and pyridoxine-excreting properties of drugs were developed, followed by screening of 2527 ATC drugs.

**Results.** The accuracy of the algorithms in cross-validation was 94–98 % for magnesium deficiency and 88 % for vitamin B<sub>6</sub> deficiency. On average, each drug accounts for 8.5±6.5 antimicronutrient effects. Only 4 % of drugs did not show a negative effect on micronutrient metabolism. Pyridoxine deficiency is caused by 1701 drugs (68 % of ATC), magnesium deficiency — by 1064 drugs (42 %). The most negative impact on the homeostasis of both micronutrients is exerted by antibiotics (J01), psychotropic drugs (N05, N06), antineoplastic agents (L01), hormones (G03), diuretics (C03), analgesics (N02) and anti-inflammatory drugs (M01).

**Conclusion.** The results of chemoreactome screening will allow us to reasonably recommend accompanying various pharmacotherapy with drugs based on pyridoxine and organic magnesium salts.

**Keywords:** hypomagnesemia; iatrogeny; pyridoxine deficiency; hypovitaminosis; big data; pharmacoinformatics

## For citations:

Torshin IYu, Kalacheva AG, Gromova OA, Rogozin MA. Evaluation of ATX rubricator drugs by chemoreactome screening method for prevention of magnesium and pyridoxine deficiencies. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):21–29. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-21-29>. EDN: MMTWCX

Received: 28.07.2025. Revision received: 01.09.2025. Accepted: 25.09.2025. Published: 30.09.2025.

## Введение / Introduction

Обеспеченность микронутриентами населения земного шара в целом недостаточна. Оценка глобальной распространённости микронутриентных дефицитов показала, что более 5 млрд человек не потребляют достаточного количества йода, витамина Е, кальция; более 4 млрд человек — железа, рибофлавина, фолатов, витамина С и пиридоксина. Треть населения мира потребляет недостаточное количество магния [1]. Длительное применение многих лекарственных препаратов вызывает субклинический дефицит микронутриентов, ухудшает течение заболеваний, прогноз, качество жизни, снижает приверженность пациентов терапии [2]. Например, приём бигуанидов в ходе терапии сахарного диабета вызывает дефицит витаминов B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, магния и цинка [3].

Магний важен для молекулярных и каталитических процессов, включая перенос энергии и поддержание структуры генома. Повышение обеспеченности населения магнием и витаминами группы В сопоставимо с лекарственной терапией и является одной из важнейших технологий снижения заболеваемости и смертности от хронических заболеваний [4]. Выраженная гипомagneзemia и дефициты других микронутриентов часто наблюдаются у пациентов при приёме антибиотиков (фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды, амфотерицины и др. [5]), иммунодепрессантов (ингибиторов кальциневрина, циклоспорина, FK506), модуляторов EGFR (рецептора эпидермального фактора роста), ингибиторов протонной помпы и диуретиков [6]. Дефицит магния усугубляет гипокалиемию и делает её более резистентной к лечению препаратами калия [7].

Информация о побочных эффектах, включая гипомagneзemia и дефицит витамина B<sub>6</sub>, для большинства лекарств изучена недостаточно. Данная информация представлена в многочисленных (FAERS, SIDER и др.) и не отличается высокой точностью.

Например, в крупнейшей базе данных SIDER, которая содержит данные о 1430 лекарственных средствах, 5880 побочных реакциях на лекарственные средства и 140 064 о парах «лекарство — побочная реакция» [8] было найдено менее 80 препаратов, вызывающих гипомagneзemia. Эти препараты входят всего в 20 категорий системы АТХ. Всего три препарата перечислены в случае дефицита витамина B<sub>6</sub> (изониазид, пеницилламин, тиопронин). Таким образом, имеющаяся в современных базах данных информация о негативных эффектах воздействия лекарственных препаратов на обмен магния и витамина B<sub>6</sub> не отличается высокой надёжностью.

Применение методов машинного обучения для выявления конкретных биофизических закономерностей, существующих между структурами молекул лекарственных средств и влиянием этих молекул на обмен тех или иных микронутриентов, является альтернативой поискам в базах данных.

В настоящей работе представлены результаты хемореактного моделирования *in silico* эффектов 2527 лекарств, рубрицированных в АТХ. Математическими методами теории топологического анализа данных и теории анализа размеченных графов [9] проведены: систематический компьютерный анализ баз данных и соответствующей литературы по микронутриент-выводящим эффектам различных лекарств, разработка алгоритмов для прогнозирования магний-выводящих и пиридоксин-выводящих свойств лекарств, хемореактный скрининг всех зарегистрированных в АТХ лекарственных средств.

## Материалы и методы / Materials and Methods

Хемореактный подход к анализу проблемы «структура молекулы—свойство молекулы» — новейшее направление приложения систем искусственного интеллекта в области постгеномной фармакологии. Фармакологические свойства исследуемых молекул в рамках хемореактной методологии осуществляются посредством сравнения химической структуры исследуемой молекулы со структурами миллионов других молекул, для которых молекулярно-фармакологические свойства уже были изучены. «Обучение» алгоритмов искусственного интеллекта проводится на основе «больших данных», представленных в базах данных PubChem/PHARMGKB [10], HMDB [11], STRING [12] и др., и осуществляется в рамках топологической теории распознавания с применением многоуровневого контроля качества обучения [13–15].

Топологическая теория распознавания представляет собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания и важна как инструмент исследования признаков описаний объектов [16]. В случае хемореактного анализа объектами исследования являются *хемографы* ( $\chi$ -графы) — особые разновидности графа (т. е. математического объекта, являющегося как совокупности множества вершин и множества ребер — связей между вершинами). В рамках топологической теории распознавания для  $\chi$ -графов вводится  $v$ -функция расстояния  $d_\chi$ , которая отражает «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами [14]. При использовании метрики Хэмминга, функция расстояния между хемографами  $d_\chi$  над бинарными  $\chi$ -инвариантами определяется как:

$$d_\chi(X_1, X_2) = \frac{1}{|\chi|} \sum_{k=1}^{|\chi|} \omega_k \hat{i}[k] \hat{\beta}[X_1] \chi \oplus \hat{i}[k] \hat{\beta}[X_2] \chi, \quad (1)$$

где  $\chi$  — множество элементарных  $\chi$ -инвариантов (всех возможных фрагментов химических структур);  $\hat{i}[k] \chi$  — кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы);  $\hat{\beta}[X_j]$  — способ вычисления бинарных признаков описаний для хемографа  $X_j$ , соответствующих фрагментам молекулярной структуры из множества  $\chi$ ,



$\omega_k$  — вес  $k$ -го признака. Приведённое выше выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами  $X_1$  и  $X_2$ , является основой хемоинформационного анализа [17].

Расстояние  $d_\chi$  является настраиваемой метрикой, т. к. содержит произвольно настраиваемые параметры — веса  $\omega_k$ . Для настройки вектора параметров  $(\omega_k)$  используются алгоритмы хеометрического анализа, которые подразумевают использование процедуры согласования пар метрик. Одной из метрик является «химическое расстояние»  $d_\chi$ , а второй — метрика  $d_\Delta$ , вычисляемая на основе значений  $\Delta_{ij}$   $i$ -ой биологической активности (например, ингибирование репликации вируса, поддержка роста клеток и др.). Согласование заключается в подборе таких значений весов  $\omega_k$ , при которых различия между значениями согласуемой пары метрик,  $d_\chi$  и  $d_\Delta$  минимально. Задача машинного обучения для согласования метрик формулируется как:

$$\operatorname{argmin}_{(\omega_k)} \left[ L(d_\chi(X_{ij}, X_{ij}), d_\Delta(\Delta_{ij}, \Delta_{ij})) \right], \quad (2)$$

$$i = 1, \dots, N, j = 1, \dots, n,$$

где  $L$  — используемая функция потерь (сумма квадратов невязок, стандартное отклонение и т. п.). Соответственно, в результате обучения алгоритма «химическое расстояние»  $d_\chi(X_{i1}, X_{i2})$  между парой молекул  $X_{i1}$  и  $X_{i2}$  соответствует различию в значениях активности  $\Delta_{i1}$  и  $\Delta_{i2}$ , отражаемых метрикой  $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2})$  с точностью до линейного преобразования  $y_i$ , [18], т. е.

$$d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2}) = y_i(d_\chi(X_{i1}, X_{i2})) = a_{\chi \rightarrow \Delta} d_\chi(X_{i1}, X_{i2}) + b_{\chi \rightarrow \Delta}. \quad (3)$$

Данные о  $k$ -й биологической активности представимы в виде конечного числа значений  $I_k =$ ; в случае числовой  $k$ -й переменной множество  $I_k$  линейно упорядочено ( $\lambda_{k_{b-1}} \leq \lambda_{k_b} \leq \lambda_{k_{b+1}}$ ). Поэтому, практически важным частным случаем экспертной метрики является метрика на основе скаляра (в качестве которого выступает прогнозируемая числовая величина). Для такой «одномерной» метрики выполнены все три аксиомы метрики (т. к. они выполнены для любых трёх различных точек на числовой прямой).

В случае такой  $d_\Delta$ -метрики (3) постановка задачи в форме (2) фактически, эквивалентна аддитивной схеме учёта признаков, т. е. суммирования значений признаков с весами с последующим применением корректирующей операции (функции-корректора). Действительно, пусть нулевой элемент  $\{0\}$  входит во все множества  $I_k$ , так что можно определить расстояние от нулевого элемента до любого другого элемента множества  $I_k$  посредством скалярной экспертной метрики  $d_e$ . Тогда критерий (2) может быть переформулирован через расстояния от нулевого элемента  $\{0\}$ , так что

производится переход от оценки попарных расстояний к суммированию по всем объектам. При этом задача «машинного обучения» формулируется как:

$$\operatorname{argmin}_{\{\omega_i\}, p} \sum_{m=1}^N |d_\chi((\omega_i), \{0\}, X_m) - T(X_m)|, \quad (4)$$

где  $T(X_m)$  — значение прогнозируемой числовой переменной для объекта  $X_m$ , взятое из соответствующей обучающей выборки из  $N$  объектов.

В целом на *первом этапе* хемореактомного анализа посредством минимизации условий (2, 4) проводится обучение алгоритмов и настройка весов  $(\omega_i)$  по  $d_\Delta$ -метрике (3) для вычисления химических расстояний  $d_\chi$ , вычисляются значения по формуле (1). На *втором этапе*, для исследуемой молекулы  $X$  рассчитываются расстояния  $d_\chi((\omega_i), \{0\}, X)$ , которые в соответствии с (4) являются прогнозами значений исследуемой биологической активности. На *третьем этапе*, строится эмпирическая функция распределения (э.ф.р.) значений оцениваемого свойства. Оценки значений различных свойств вычисляются как математическое ожидание и дисперсия соответствующих э.ф.р. [8, 15].

#### **Выборки данных для обучения алгоритмов хемореактомного анализа лекарств / Data samples for training algorithms for chemoreactome analysis of drugs**

Данные по каждому из микронутриентов были собраны на основе информации в базе данных побочных эффектов лекарств (SIDER, FAERS [17]), ресурсов PubChem [10] и HMDB [11]. Наличие/отсутствие эффектов воздействия на тот или иной микронутриент у каждого из лекарств подтверждалось посредством информации, собранной двумя экспертами из литературы. Затем проводилось формирование хемореактомной базы данных, включившей информацию по всем витаминам и микроэлементам. В среднем, по каждому из изученных микронутриентов в базу данных вошла информация по  $112 \pm 25$  действующим началам лекарств.

Разработанные алгоритмы распознавания показали высокую эффективность распознавания молекул, вызывающих потери витаминов и микроэлементов: в среднем по всей выборке данных, аккуратность составила  $97,6 \pm 6,5$  % на обучающей выборке и  $92,3 \pm 10,4$  % — на контрольной выборке в кросс-валидации. Разработанные алгоритмы распознавания позволяют выявить молекулы и их конкретные структурные фрагменты, которые стимулируют нарушения гомеостаза микроэлементов.

#### **Результаты и обсуждение / Results and discussion**

Хемореактомный скрининг позволил вычислить антимикутритные свойства для 2527 молекул. Анализ распределения числа антимикутритных эффектов среди препаратов АТХ показал, что 2428



из 2527 (96 %) проявляли те или иные антимиcronутриентные эффекты. К препаратам, которые не проявляли никаких антимиcronутриентных свойств, относились аминокислоты, микронутриентные препараты, холиновые препараты.

Если считать категории АТХ разных уровней (например, J01 — системные антибактериальные препараты; J01M — хинолоны; J01MA — фторхинолоны; J01MA03 — пefлоксацин), то в АТХ представлено 4105 категорий. По результатам хемореактомного анализа, из препаратов в 4105 категориях негативно на обмен микронутриентов влияли 580. Числа конкретных действующих начал препаратов из АТХ, негативно влияющих на обмен микронутриентов, найденные в результате хемореактомного скрининга (рис. 1) показывают, что дефицит витамина B<sub>6</sub> был вторым по числу негативно влияющих препаратов (1701 препарат из 2527 изученных препаратов из АТХ, т. е. 68 %). Дефицит магния стоял на 9-ом месте (1064, 42 % препаратов).

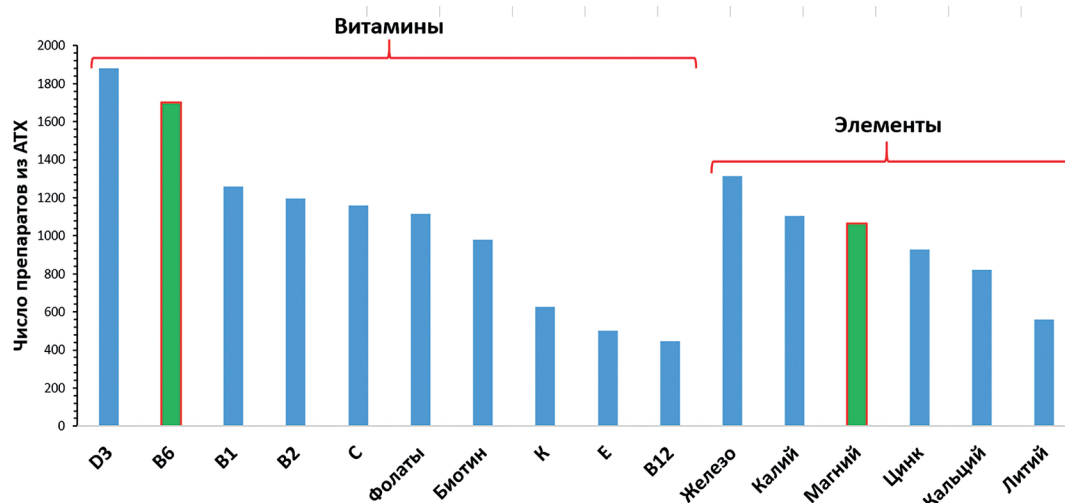
#### **Препараты, негативно воздействующие на обмен магния / Medications that negatively affect magnesium metabolism**

Среди категорий препаратов по АТХ, негативно воздействующих на обмен магния, наиболее представлены препараты из категории «J01 — антибактериальные препараты для системного применения» ( $n = 150$ ), включая тетрациклины, бета-лактамы антибактериальные препараты и пенициллины, макролиды, линкозамиды и стрептограммины, хинолоны (19 препаратов, из них 15 фторхинолонов). Противовирусные препараты (J05A, особенно из категории J05AE — ингибиторы протеазы), противоинфекционные средства (S01A,  $n = 14$ ) и противопрозоидные средства (P01,  $n = 13$ ) также способствуют выведению магния.

Второй по представленности среди магний-выводящих препаратов является категория «L01 — противоопухолевые средства» ( $n = 60$ ). При этом магний-выводящие препараты распределены между подкатегориями категории L01 достаточно равномерно, с некоторым преобладанием цитотоксических антибиотиков (14 препаратов). Все диуретики (категория АТХ C03) способствуют выведению магния. Высокая представленность среди магний-выводящих препаратов тех, что зарегистрированы в категории «G03 — половые гормоны» ( $n = 45$ ), гормоны гипофиза и гипоталамуса и их аналоги (H01), глюкокортикоиды (H02AB).

Менее ожидаемым результатом настоящего исследования является частая встречаемость среди магний-выводящих препаратов лекарств категорий N05 — психолептики ( $n = 44$ , прежде всего, N05A — антипсихотики — 35 препаратов) и N06 — психоаналептики ( $n = 24$ , прежде всего, N06A — антидепрессанты,  $n = 15$ ). Нахождение среди магний-выводящих препаратов значительного количества психолептиков может являться одним из возможных объяснений сверхнизких уровней магния в эритроцитах пациентов с нервно-психическими расстройствами [19].

Среди магний-выводящих препаратов могут присутствовать различные группы повсеместно применяемых противовоспалительных препаратов: M01A — противовоспалительные и противоревматические средства, нестероидные препараты ( $n = 21$ ), R06A — антигистаминные препараты для системного применения ( $n = 17$ ) и A02B — препараты для лечения язвенной болезни и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни ( $n = 17$ ). Таким образом, сопровождение противовоспалительной терапии препаратами магния профилактует формирование гипомagneзмии в соответствующих группах риска.



**Рис. 1.** Числа препаратов из АТХ, вызывающих соответствующие микронутриентные дефициты

**Fig. 1.** Numbers of drugs from the ATC that cause corresponding micronutrient deficiencies

Кроме того, хемореактомный анализ указал на антимагниевого свойства препаратов категорий «M03 — миорелаксанты» ( $n = 13$ ), «V08A — рентгеноконтрастные вещества, йодированные» ( $n = 14$ ), «A10B — препараты, снижающие уровень глюкозы в крови, за исключением инсулинов» ( $n = 18$ ), «C09 — средства, действующие на ренин-ангиотензиновую систему» ( $n = 18$ , и, прежде всего, «C09AA — ингибиторы АПФ» — 13 препаратов), «N02 — анальгетики» ( $n = 25$ ) и «N03A — противоэпилептические средства» ( $n = 14$ ). Приём препаратов этих категорий также следует сопровождать коррекцией дефицита магния.

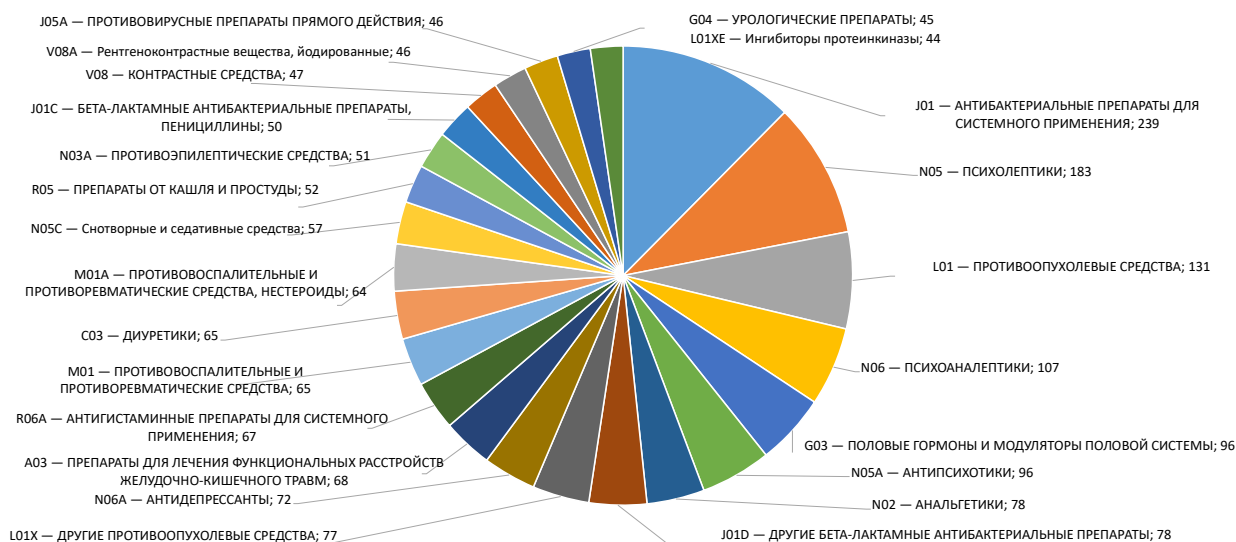
**Препараты, негативно воздействующие на обмен пиридоксина / Medications that negatively affect pyridoxine metabolism**

Среди препаратов, вызывающих потери пиридоксина, часто встречались антибиотики (J01,  $n = 89$ ), противогрибковые препараты (D01,  $n = 25$ ), противопротозойные средства (P01,  $n = 28$ ). В то же время средства, направленные на терапию заболеваний нервной системы (категория «N» по АТХ), лидировали среди пиридоксин-выводящих препаратов. К этим средствам относятся препараты групп «N05 — психолептики» ( $n = 139$ , наиболее многочисленная группа  $B_6$ -выводящих психоневрологических препаратов), «N06 — психоаналептики» ( $n = 83$ ), «N02 — анальгетики» ( $n = 53$ ), «N07 — другие препараты для нервной системы» ( $n = 26$ ), «N01 — анестетики» ( $n = 25$ ), «N04 — препараты от болезни Паркинсона» ( $n = 25$ ) и также миорелаксанты (M03,  $n = 27$ ). Кофеин (группа N06BC01) является классическим примером магний-выводящего препарата.

На обмен пиридоксина негативно влияли также препараты из групп «L01 — противоопухолевые средства» ( $n = 71$ ), «G03 — половые гормоны и модуляторы половой системы» ( $n = 51$ ), «M01 — противовоспалительные и противоревматические средства» ( $n = 43$ ), «C03 — диуретики» ( $n = 34$ ), «V08 — контрастные средства» ( $n = 32$ ). Также следует упомянуть препараты для лечения обструктивных заболеваний дыхательных путей (R03,  $n = 25$ ), препараты от кашля и простуды (R05,  $n = 38$ ) и антигипертензивные средства (C02,  $n = 28$ ).

Анализ категорий препаратов АТХ, которые неблагоприятно воздействуют одновременно на гомеостаз и магния, и витамина  $B_6$  (рис. 2) указывает на группы препаратов, приём которых должен обязательно сопровождаться препаратами магния и пиридоксина. К этим препаратам относятся, прежде всего, антибиотики для системного применения (J01) и препараты из групп «N05 — психолептики» и «N06 — психоаналептики», «L01 — противоопухолевые средства», «G03 — половые гормоны и модуляторы половой системы», «N02 — анальгетики», «N06A — антидепрессанты» и, конечно же, «C03 — диуретики». Напомним, что цисплатина (АТХ код L01XA01) характеризуется выраженным «антимагниевого» действием.

Интересно также отметить установленные в результате настоящего анализа «антимагниевого» и «антипиридоксина» свойства таких достаточно «неожиданных» групп препаратов, как «A03 — препараты для лечения функциональных нарушений ЖКТ», «R06A — антигистаминные препараты для системного применения», «M01 — противовоспалительные и противоревматические средства», «J05A — противовирусные препараты прямого действия»



**Рис. 2.** Наиболее часто встречающиеся категории препаратов АТХ, негативно влияющих и на обмен магния, и на обмен витамина  $B_6$

**Fig. 2.** The most common categories of АТХ drugs that negatively affect both magnesium metabolism and vitamin  $B_6$  metabolism

Примечание: Представлены категории различных уровней АТХ (2–4)  
Note: Categories of different АТХ levels are presented (2–4)

и «N03A — противоэпилептические средства». Отметим, что эпилепсия действительно сопровождается глубокими нарушениями обмена магния, что может быть связано именно с приёмом антиэпилептических препаратов [17]. Рассмотрим результаты хемореактивного анализа в сопоставлении с имеющимися данными экспериментальных и клинических исследований конкретных групп препаратов.

**О ятрогенных дефицитах магния и пиридоксина в контексте результатов крупномасштабного скрининга магниевого статуса россиян / On iatrogenic deficiencies of magnesium and pyridoxine in the context of the results of large-scale screening of the magnesium status of Russians**

Нами было осуществлено крупномасштабное скрининговое исследование распространённости дефицитов магния и пиридоксина у россиян 18–90 лет в условиях стационара ( $n = 2000$ ) [20], включая лиц с сердечно-сосудистой, гастроэнтерологической, гематологической, неврологической, нефрологической, урологической, пульмонологической, дерматологической, гинекологической и эндокринологической патологиями и также здоровых участников без известных патологий ( $n = 500$ ). В группе здоровых лиц, проходивших диспансеризацию, средний уровень магния в плазме крови (ПК) составил  $0,92 \pm 0,07$  ммоль/л (95 % ДИ  $0,82–0,96$ ). В то же время даже при наличии одного диагноза уровни магния в ПК были значительно снижены ( $0,86 \pm 0,19$  ммоль/л), а при наличии двух и более диагнозов средние уровни магния в ПК были ниже  $0,8$  ммоль/л. Дефицит магния установлен у 49 % пациентов, а дефицит пиридоксина — у 53 % пациентов. Комплексный анализ показал, что сниженные уровни магния в ПК соответствуют достоверному повышению риска ожирения, сахарного диабета, судорог, бессонницы, острой реакции на стресс, ишемического инсульта, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и многих других патологий. Пациенты, госпитализированные в стационар, получают сочетанную фармакотерапию (антибиотики, диуретики, антидиабетические, нестероидные средства и др.), создающую условия для формирования ятрогенных дефицитов магния и пиридоксина [20]. Подтверждённая в работе [20] распространённость дефицитов магния и пиридоксина, ассоциированная с многочисленными хроническими заболеваниями, указывает на принципиальную важность применения лекарственных препаратов на основе органических солей магния в сочетании с пиридоксином.

**Дефициты магния и пиридоксина, возникающие в результате антибиотикотерапии / Magnesium and pyridoxine deficiencies resulting from antibiotic therapy**

Антибиотикотерапия вызывает сильнейшие потери магния организмом, что обуславливает необходимость назначения магниевых препаратов. Антибиотики проявляют нефротоксичные и кардиотоксичные свой-

ства, которые обусловлены потерями магния. Так, гипомагниемия и нефротоксичность стимулируются приёмом аминогликозидов [21], фторхинолоны повышают риск фатальной аритмии «пируэт» (torsades de pointes) [22]; макролиды усугубляют гипокалиемию, гипомагниемия, брадикардию и удлинение QT на ЭКГ. В эксперименте эффекты аминогликозидов на экскрецию кальция и магния были сопоставимы для гентамицина, неомицина и тобрамицина. Терапия гентамицином ассоциирована с симптоматическими гипомагниемией, гипокальциемией и гипокалиемией [23]. Клиническая практика многократно подтвердила то, что аминогликозиды отрицательно влияют на почечный гомеостаз магния [24, 25].

Одним из тяжёлых последствий терапии фторхинолонами является разрушение структуры соединительной ткани, особенно у пациентов с низкой обеспеченностью магнием [26].

**Дефицит магния при приёме диуретиков / Magnesium deficiency when taking diuretics**

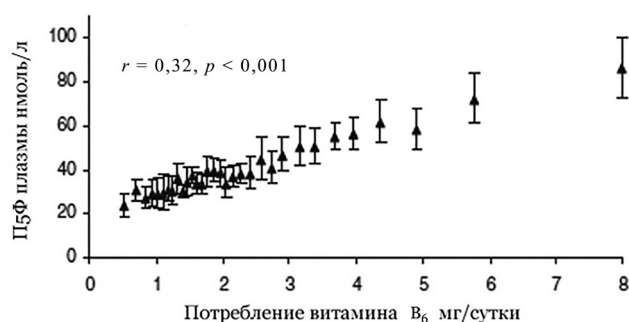
Снижая объём циркулирующей крови диуретики приводят к салиурезу, что предполагает не только потери натрия, но и других электролитов [24]. В сочетанной терапии с антигипертензивными средствами диуретики вызывают электролитный и кислотно-щелочной дисбаланс организма, ассоциированный с сердечно-сосудистым риском и смертностью [27]. В работе [28] рассмотрены магниевыводящие эффекты основных классов диуретиков (петлевые, тиазидные, калийсберегающие и др.) и их взаимосвязь с развитием нежелательных последствий терапии диуретиками. Показана перспективность использования препаратов магния для компенсации гипомагниемии, гипокалиемии и других негативных эффектов диуретикотерапии. Наиболее агрессивными по отношению к магнию являются петлевые и тиазидные диуретики, особенно в сочетании с магниевыводящими антибиотиками (аминогликозиды, фторхинолоны, амфотерицины, макролиды) [29].

**Антимагниевого и антипиридоксина свойства эстроген-содержащих препаратов / Antimagnetic and antipyridoxine properties of estrogen-containing drugs**

Приём эстроген-содержащих препаратов связан с повышенным риском тромбоэмболических заболеваний, рака груди и смертности [30]. При прохождении печёночного метаболизма, эстрогены из принимаемого внутрь препарата активируют, в частности, экспрессию ряда факторов свертывания крови. В результате повышается склонность пациентов к тромбообразованию. Проведённое в Дании ретроспективное исследование случай–контроль группы 794 женщин в возрасте 15–44 лет, перенёвших церебральное тромбоэмболическое событие, и 1198 участниц в группе контроля указало на взаимосвязь между цереброваскулярной патологией и приёмом эстроген-содержащих препаратов [31].



Крупномасштабное популяционное исследование «Национальное обследование здоровья и питания, 2003–2004» (NHANES, англ. National Health and Nutrition Examination Survey, 2003–2004) включило 6165 участников и показало, что пиридоксаль-5-фосфат (П5Ф) плазмы достоверно зависит от использования эстроген-содержащих контрацептивов. У большинства принимавших оральные контрацептивы пациенток уровни П5Ф были ниже нижней границы нормы (т. е.  $<20$  нмоль/л). Группу риска дефицита витамина образовали участники с диетарным потреблением витамина  $B_6$  менее 2 мг/сут (менее 3 мг/сут у курильщиков), пожилые и прежде всего участницы, использующие или использовавшие пероральные контрацептивы. Диетарное потребление витамина  $B_6$  (рис. 3) в количествах от 3 до 4,9 мг/сут, по сравнению с потреблением  $<2$  мг/сут, было связано со значимым протективным эффектом от низких уровней П5Ф даже при использовании противозачаточных эстроген-содержащих средств [32].



**Рис. 3.** Корреляция между уровнями пиридоксаль-5-фосфата плазмы (П5Ф) и оценкой диетарного потребления витамина  $B_6$  по опроснику диеты NHANES ( $n = 6165$ )

**Fig. 3.** Correlation between plasma pyridoxal-5-phosphate (П5Ф) levels and estimated dietary vitamin  $B_6$  intake from the NHANES dietary questionnaire ( $n = 6165$ )

*Примечание:* Точки обозначают среднеквадратичные значения для 32 изученных категорий пациентов, каждая из которых включила 3,2 % ( $n = 200$ ) участников (адаптировано с [32]).

*Note:* Dots represent standard deviations for the 32 patient categories studied, each comprising 3.2 % ( $n = 200$ ) of the participants. (Adapted from [32]).

Компенсация ятрогенных микронутриентных дефицитов не всегда может быть эффективна при использовании тех или иных специальных диет. Продукты питания могут содержать такие компоненты, как фитиновая кислота, щавелевая кислота или кальций, затрудняющие всасывание магния [33]. Поэтому, для компенсации ятрогенных микронутриентных дефицитов следует использовать формы микронутриентов с высокой биодоступностью (органические

соли микроэлементов, биоактивные формы витаминов). Например, исследование 48 пациенток с предменструальным синдромом показало значительное уменьшение клинических проявлений ПМС после курса терапии Магне  $B_6$ . Основными жалобами пациенток были раздражительность (89 %), масталгия и мастодиния (83 %), депрессия (47 %), которые достоверно и клинически значимо уменьшались после курса терапии [34].

## Заключение / Conclusion

Современная фармакотерапия зачастую отличается «агрессивностью» (в смысле преобладания побочных эффектов над полезным действием) при долговременном приёме, при приёме пожилыми пациентами, пациентами с заболеваниями почек, печени и др. Одним из побочных эффектов фармакотерапии является «агрессия» по отношению к микронутриентам, особенно актуальная потому, что диетический и нутрициальный статус пациента, как правило, упускается из виду.

Оценки антимикронутриентного действия препаратов для 2527 лекарственных средств из АТХ были получены в настоящей работе с использованием математических методов теории топологического анализа данных и теории анализа размеченных графов. Выявлены препараты из АТХ, потенциально способствующие усиленному выведению магния, пиридоксина и других микронутриентов. Пиридоксин является одним из микронутриентов, наиболее часто выводимым в результате фармакотерапии (на втором месте). Неблагоприятно на гомеостаз и магния, и пиридоксина воздействуют антибиотики для системного применения (J01), препараты из групп «N05 — психолептики» и «N06 — психоаналептики», «L01 — противоопухолевые средства», «G03 — половые гормоны и модуляторы половой системы», «N02 — анальгетики», «N06A — антидепрессанты», «C03 — диуретики», «R06A — антигистаминные препараты для системного применения», «M01 — противовоспалительные и противоревматические средства», «J05A — противовирусные препараты прямого действия» и «N03A — противоэпилептические средства».

Результаты хемореактивного скрининга позволяют обоснованно рекомендовать сопровождение такой фармакотерапии препаратами на основе органических солей магния и пиридоксина. При планировании фармакотерапии следует обязательно учитывать магний и пиридоксин-выводящие свойства назначаемых препаратов.



## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

### Участие авторов

Все авторы приняли равнозначное участие в написании статьи.

### Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

### Authors' participation

All authors contributed equally to this work.

### Funding

The work was carried out without sponsorship.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**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

**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>

**Громова Ольга Алексеевна** — профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация; д. м. н., профессор, в. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Российская Федерация  
**Автор ответственный за переписку**  
e-mail: [unesco.gromova@gmail.com](mailto:unesco.gromova@gmail.com)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
РИНЦ SPIN-код: 6317-9833

**Рогозин Михаил Александрович** — аспирант кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Ивановский ГМУ Минздрава России, Иваново, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-2744-4268>

**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

**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>

**Olga A. Gromova** — Professor of the Department of Pharmacology FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation; PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russian Federation  
**Corresponding autor**  
e-mail: [unesco.gromova@gmail.com](mailto:unesco.gromova@gmail.com)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>  
RSCI SPIN code: 6317-9833

**Mikhail A. Rogozin** — Postgraduate student of the Department of Pharmacology of the FSBEI HE «Ivanovo SMU» of MOH of Russia, Ivanovo, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-2744-4268>

## Список литературы / References

1. Passarelli S, Free CM, Shepon A, et al. Global estimation of dietary micronutrient inadequacies: a modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2024 Oct;12(10):e1590-e1599. doi: 10.1016/S2214-109X(24)00276-6.
2. Wang X, Dou Z, Feng S, et al. Global food nutrients analysis reveals alarming gaps and daunting challenges. *Nat Food*. 2023 Nov;4(11):1007-1017. doi: 10.1038/s43016-023-00851-5.
3. Adomako EA, Yu ASL. Magnesium Disorders: Core Curriculum 2024. *Am J Kidney Dis*. 2024 Jun;83(6):803-815. doi: 10.1053/j.ajkd.2023.10.017.
4. Shikh EV, Makhova AA, Chemeris AV, Tormyshov IA. [Iatrogenic deficits of micronutrients]. *Vopr Pitan*. 2021;90(4):53-63. Russian. doi: 10.33029/0042-8833-2021-90-4-53-63.
5. Громова О.А., Торшин И.Ю., Моисеев В.С., Сорокина М.А. О фармакологических взаимодействиях магния с антибиотиками и дефиците магния, возникающем в результате антибиотикотерапии. *Терапия*. 2017;11(1):135-143. [Gromova OA, Torshin IYu, Moiseev VS, Sorokina MA. On the pharmacological interactions of antibiotics with magnesium and on the magnesium deficiency arising as a result of antibiotic treatment. *Therapy*. 2017;11(1):135-143. (In Russ.)].
6. Lameris AL, Monnens LA, Bindels RJ, Hoenderop JG. Drug-induced alterations in Mg<sup>2+</sup> homeostasis. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Jul;123(1):1-14. doi: 10.1042/CS20120045.
7. Громова О.А., Торшин И.Ю., Калачева А.Г., Гришина Т.Р. О синергизме калия и магния в поддержании функции миокарда. *Кардиология*. 2016;56(3):73-80. [Gromova OA, Torshin IYu, Kalacheva AG, Grishina TR. On synergism of potassium and magnesium in maintenance of myocardial function. *Kardiologiya*. 2016;56(3):73-80. (In Russ.)]. doi: 10.18565/cardio.2016.3.73-80.
8. Kuhn M, Letunic I, Jensen LJ, Bork P. The SIDER database of drugs and side effects. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D1075-9. doi: 10.1093/nar/gkv1075.
9. Торшин И.Ю., Громова О.А., Чучалин А.Г., Журавлев Ю.И. Хемореактивный скрининг воздействия фармакологических препаратов на SARS-CoV-2 и виром человека как информационная основа для принятия решений по фармакотерапии COVID-19. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2021;14(2):191-211. [Torshin IYu, Gromova OA, Chuchalin AG, Zhuravlev YuI. Chemoreactome screening of pharmaceutical effects on SARS-CoV-2 and human virome to help decide on drug-based COVID-19 therapy. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmako-epidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoeconomics and Pharmacoeconomics*. (In Russ.)]. doi: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2021.078.
10. Bolton E, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. Chapter 12 PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. *Annual Reports in Computational Chemistry*. 2008;4: 217-241. doi: 10.1016/S1574-1400(08)00012-1.
11. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D521-6. doi: 10.1093/nar/gkl923.
12. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jan 1;33(Database issue):D433-7. doi: 10.1093/nar/gki005.
13. Torshin IYu, Rudakov KV. On the Procedures of Generation of Numerical Features over Partitions of Sets of Objects in the Problem of Predicting Numerical Target Variables. *Pattern Recognit. Image Anal*. 2019;29(4):654-667. doi: 10.1134/S1054661819040175.
14. Torshin IYu, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: Fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognit. Image Anal*. 2014;24(1):11-23. doi: 10.1134/S1054661814010209.
15. Torshin IYu, Rudakov KV. On the Application of the Combinatorial Theory of Solvability to the Analysis of Chemographs: Part 2. Local Completeness of Invariants of Chemographs in View of the Combinatorial Theory of Solvability. *Pattern Recognit. Image Anal*. 2014;24(2):196-208. doi: 10.1134/S1054661814020151.
16. Torshin IYu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognit. Image Anal*. 2011;21(4):652-662. doi: 10.1134/S1054661811040171.
17. Громова О.А., Торшин И.Ю. Магний и «болезни цивилизации». Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2018. 800 с. [Gromova OA, Torshin IYu. Magnesium and "Civilization Diseases". Moscow: GEOTAR-Media, 2018. (In Russ.)]. ISBN 978-5-9704-4527-3.
18. Potter E, Reyes M, Naples J, Dal Pan G. FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) Essentials: A Guide to Understanding, Applying, and Interpreting Adverse Event Data Reported to FAERS. *Clin Pharmacol Ther*. 2025 Sep;118(3):567-582. doi: 10.1002/cpt.3701.
19. Копицына У.Е., Гришина Т.Р., Торшин И.Ю., и др. Сверхнизкий уровень магния в эритроцитах как значимый фактор патогенеза пограничных психических расстройств. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(11):85-96. [Kopitsyna UE, Grishina TR, Torshin IYu, et al. Very low magnesium levels in red blood cells as a significant factor in the etiopathogenesis of borderline disorders. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(11):85-96. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20151151185-96.
20. Громова О.А., Торшин И.Ю., Рудаков К.В., и др. Недостаточность магния – достоверный фактор риска коморбидных состояний: результаты крупномасштабного скрининга магниевого статуса в регионах России. *Фарматека*. 2013;6(259):116-129. [Gromova OA, Torshin IYu, Rudakov KV, et al. Magnesium deficiency is a reliable risk factor of comorbid conditions: results of a large-scale screening of magnesium status in regions of Russia. *Pharmateca*. 2013;6(259):116-129. (In Russ.)].
21. Wade RL, Chaudhari P, Natoli JL, et al. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):361-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.001.
22. Abo-Salem E, Fowler JC, Attari M, et al. Antibiotic-induced cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Ther*. 2014 Feb;32(1):19-25. doi: 10.1111/1755-5922.12054.
23. Kes P, Reiner Z. Symptomatic hypomagnesemia associated with gentamicin therapy. *Magnes Trace Elem*. 1990;9(1):54-60.
24. Liamis G, Hoorn EJ, Florentin M, Milionis H. An overview of diagnosis and management of drug-induced hypomagnesemia. *Pharmacol Res Perspect*. 2021 Aug;9(4):e00829. doi: 10.1002/prp2.829.
25. von Vigier RO, Truttmann AC, Zindler-Schmoeck K, et al. Aminoglycosides and renal magnesium homeostasis in humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Jun;15(6):822-6. doi: 10.1093/ndt/15.6.822.
26. Stahlmann R, Lode H. Safety considerations of fluoroquinolones in the elderly: an update. *Drugs Aging*. 2010 Mar 1;27(3):193-209. doi: 10.2165/11531490-000000000-00000.
27. Khaw KS, Lau SY, Li JY, Yong TY. Diuretic-associated electrolyte disorders in the elderly: risk factors, impact, management and prevention. *Curr Drug Saf*. 2014 Mar;9(1):2-15. doi: 10.2174/1574886308666140109112730.
28. Громова О.А., Гришина Т.Р., Торшин И.Ю., и др. Прием диуретиков провоцирует дефицит магния: тактика коррекции. *Терапия*. 2017;2(12):122-33. [Gromova OA, Grishina TR, Torshin IYu, et al. Diuretics induce magnesium deficiency: tactics of correction. *Therapy*. 2017;2(12):122-33. (In Russ.)].
29. Rosner MH, Ha N, Palmer BF, Perazella MA. Acquired Disorders of Hypomagnesemia. *Mayo Clin Proc*. 2023 Apr;98(4):581-596. doi: 10.1016/j.mayocp.2022.12.002.
30. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лиманова О.А., и др. Сравнительное исследование доказательной базы эффективности и безопасности применения пероральной и трансдермальной форм заместительной гормональной терапии эстрогенами у женщин в различные возрастные периоды. *Проблемы репродукции*. 2013;(6):86-96. [Gromova OA, Torshin IYu, Limanova OA, et al. The comparative study of evidence based data concerning efficacy and safety of oral and transdermal estrogen replacement therapy in women of different age. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2013;(6):86-96. (In Russ.)].
31. Lidegaard O. Oral contraception and risk of a cerebral thromboembolic attack: results of a case-control study. *BMJ*. 1993 Apr 10;306(6883):956-63. doi: 10.1136/bmj.306.6883.956.
32. Morris MS, Picciano MF, Jacques PF, Selhub J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *Am J Clin Nutr*. 2008 May;87(5):1446-54. doi: 10.1093/ajcn/87.5.1446.
33. Громова О.А., Торшин И.Ю., Коденцова В.М. Пищевые продукты: содержание и усвоение магния. *Терапия*. 2016;2(5):87-96. [Gromova OA, Torshin IYu, Kodentsova VM. Foods: Magnesium content and uptake. *Therapy*. 2016;2(5):87-96. (In Russ.)]. EDN: XCFZUJ.
34. Лебедев В.А., Пашков В.М., Буданов П.В. Клиническое значение дефицита магния у женщин с предменструальным синдромом. *Вопр. гинекол., акуш. и перинатол*. 2008;7(1): 77-82. [Lebedev VA, Pashkov VM, Budanov PV. Klinicheskoe znachenie defitsita magniia u zhenshchin s predmenstrual'nym sindromom. *Vopr. ginekolog., akush. i perinatol*. 2008;7(1):77-82. (In Russ.)].



# Доксорубицин дозозависимо вызывает нарушение когнитивных функций и тревожность у крыс в тестах условного рефлекса пассивного избегания и приподнятого крестообразного лабиринта

Котельникова С. О., Алексеев И. В. Крайнева В. А., Воронина Т. А., Колики Л. Г.

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

## Аннотация

**Обоснование.** Когнитивные нарушения и тревожность являются распространёнными побочными эффектами при химиотерапии противоопухолевыми препаратами, особенно при использовании доксорубицина (ДОКС). В связи с этим, существует необходимость в разработке экспериментальных моделей для оценки вызываемых ДОКС дозозависимых нарушений когнитивных функций и эмоционального поведения.

**Цель работы** — изучение дозозависимого действия антрациклинового противоопухолевого препарата доксорубицина (ДОКС) на формирование и воспроизведение памятного следа, тревожность и моторно-двигательные реакции в экспериментах на здоровых половозрелых крысах.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на аутбредных крысах-самцах, которым вводили ДОКС (2,0 и 3,0 мг/кг, внутривенно) 1 раз/неделю в течение 4 недель. Для регистрации ориентировочно-исследовательского поведения, оценки моторно-двигательных реакций и тревожного поведения использовали тесты «открытое поле», «вращающийся стержень», «горизонтальная перекладина» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Влияние ДОКС на процессы обучения и воспроизведения памятного следа изучали в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ).

**Результаты.** ДОКС в дозах 2 и 3 мг/кг не влиял на поведение крыс в тесте «открытое поле» и не нарушал координацию движений в тестах «вращающийся стержень» и «горизонтальная перекладина». В тесте ПКЛ ДОКС (3 мг/кг) усиливал тревожную реакцию. ДОКС в дозе 2 мг/кг, не вызывающей тревоги, не влиял на обучение крыс в тесте УРПИ. Однако через 24 ч и 7 суток ДОКС (2 мг/кг) снижал латентное время захода в тёмный отсек установки по сравнению с контролем, что указывает на нарушение воспроизведения УРПИ.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают обоснованность использования ДОКС (2 мг/кг) для моделирования когнитивных нарушений и тревожности на этапе доклинического изучения биологически-активных веществ.

**Ключевые слова:** доксорубицин; тревога; обучение; память; условный рефлекс пассивного избегания; крысы

## Для цитирования:

Котельникова С. О., Алексеев И. В. Крайнева В. А., Воронина Т. А., Колик Л. Г. Доксорубицин дозозависимо вызывает нарушение когнитивных функций и тревожность у крыс в тестах условного рефлекса пассивного избегания и приподнятого крестообразного лабиринта. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):30–38. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-30-38>. EDN: GFBZDY

Поступила: 29.07.2025. В доработанном виде: 01.09.2025. Принята к печати: 27.09.2025. Опубликовано: 30.09.2025.

## Doxorubicin dose-dependently induces cognitive impairment and anxiety in conditioned passive avoidance and elevated plus-maze tests in rats

Svetlana O. Kotelnikova, Ivan V. Alekseev, Valentina A. Kraineva, Tatiana A. Voronina Larisa G. Kolik

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

## Abstract

**Background.** Cognitive impairment and anxiety are common side effects of anticancer chemotherapy, particularly with doxorubicin (DOX). Therefore, there is a need to develop experimental models to assess DOX-induced dose-dependent impairments in cognitive function and emotional behavior.

**The aim** — study of the dose-dependent effect of the anthracycline antitumor drug doxorubicin (DOX) on the formation and reproduction of a memory trace, anxiety, and motor responses in experiments on healthy sexually mature rats.

**Materials and methods.** The experiments were performed on outbred male rats that were administered DOX (2.0 and 3.0 mg/kg, intraperitoneally) once a week for 4 weeks. To record exploratory behavior, assess motor reactions and anxiety behavior, the following tests were used: “open field”, “rotary rod”, “horizontal bar” and “elevated plus maze” (EPM). The influence of DOX on the processes of learning and reproduction of a memory trace was studied in the test of the conditioned reflex of passive avoidance (CPAR).

**Results.** DOX at doses of 2 and 3 mg/kg did not affect rat behavior in the open field test and did not impair motor coordination in the rotarod and horizontal crossbar tests. In the EPM test, DOX (3 mg/kg) increased anxiety response. DOX at a dose of 2 mg/kg, which does not induce anxiety, did not affect rat learning in the CPAR test. However, after 24 hours and 7 days, DOX (2 mg/kg) reduced the latency time of entry into the dark compartment of the setup compared to the control, which indicates a disruption in the reproduction of the CPAR.

**Conclusion.** The obtained data confirm the validity of using DOX (2 mg/kg) for modeling cognitive impairment and anxiety at the stage of preclinical study of biologically active substances.

**Keywords:** doxorubicin; anxiety; learning; memory; passive avoidance; rats

## For citations:

Kotelnikova SO, Alekseev IV, Kraineva VA, Voronina TA, Kolik LG. Doxorubicin dose-dependently induces cognitive impairment and anxiety in conditioned passive avoidance and elevated plus-maze tests in rats. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):30–38. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-30-38>. EDN: GFBZDY

Received: 29.07.2025. Revision received: 01.09.2025. Accepted: 27.09.2025. Published: 30.09.2025..



## Введение / Introduction

Первые сообщения о когнитивных нарушениях, связанных с химиотерапией, стали появляться с начала 80-х годов и чаще всего затрагивали пациентов, перенёсших рак молочной железы [1, 2]. Термины «химический мозг» (“chemo-brain”) и “химиотерапевтический туман” (“chemo-fog”) предложили использовать в отношении неспецифических когнитивных нарушений, в первую очередь связанных со способностью запоминать новую и воспроизводить усвоенную информацию [3], впоследствии дополнив их определением «когнитивные нарушения, вызванные химиотерапией» [4].

На сегодняшний день накоплены убедительные доказательства того, что когнитивный дефицит, регистрируемый у 17–75 % пациентов, проходящих курсы химиотерапии, как правило, сохраняется от нескольких месяцев до нескольких лет [3, 5, 6] Доксорубин (ДОКС), относящийся к антрациклиновым ингибиторам топоизомеразы II, является одним из наиболее эффективных противоопухолевых средств для лечения многих видов рака, включая рак молочной железы [7]. Вызываемая ДОКС полиорганная токсичность в виде кардиотоксичности, гепатотоксичности, нефротоксичности и тяжёлой нейротоксичности, значительно осложняет его применение [8–10]. Изначально возможность развития ДОКС-индуцированных когнитивных нарушений подвергалась сомнению из-за отсутствия способности препарата проникать через гемато-энцефалический барьер [11], однако опубликованный в 2020 г. метаанализ показал высокую корреляцию химиотерапии ДОКС с дефицитом кратковременной вербальной памяти и скоростью обработки информации [12]. Хиноновая структура ДОКС способствует развитию оксидативного стресса, сопровождающегося образованием свободных радикалов, с которыми связывают многочисленные цитотоксические эффекты в здоровых тканях [13], что может явиться одним из компонентов механизма возникновения когнитивных нарушений у людей [12] и грызунов [14].

Ранее в экспериментальных исследованиях при оценке влияния ДОКС при курсовом введении в дозах 5 и 6 мг/кг, при которых ДОКС демонстрирует выраженную противоопухолевую активность, выявлено ослабление долговременной памяти, сопровождающееся нарушением микроциркуляции в коре головного мозга и гиппокампе, а также низкой выживаемостью животных [15]. Последующие исследования позволили экспериментально обосновать использование более низких доз ДОКС (2 и 3 мг/кг) для моделирования «химического мозга» у крыс, что проявлялось в изменении поведения в тестах, моделирующих гиппокамп-зависимую память («распознавание нового объекта», Y-лабиринт, тест Морриса и др.) [16]. В сравнении с этими моделями, использование методики условного

рефлекса пассивного избегания (УРПИ) для оценки нейротоксического воздействия на когнитивные процессы позволяет дифференцировать повреждающее действие на различные фазы ассоциативной формы памяти и оценивать в динамике долговременные мнестические процессы.

*Цель данного исследования* — изучение дозозависимого действия антрациклинового противоопухолевого препарата ДОКС на формирование и воспроизведение памятного следа, тревожность и моторно-двигательные реакции в экспериментах на здоровых половозрелых крысах.

## Материалы и методы / Materials and methods

**Животные / Animals.** Эксперименты проводили на аутбредных белых половозрелых крысах-самцах ( $n = 32$ ), полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Животных размещали группами по 6–7 особей в полипропиленовых клетках (580×375×200 мм) на подстиле из древесных опилок лиственных пород деревьев. Гранулировано-экструдированный корм (ГОСТ 34566–2019) для содержания мышей, крыс и хомяков (Россия) предоставляли *ad libitum*, водопроводную фильтрованную воду подавали в стандартных бутылках со стальными крышками-носиками. Животных содержали при температуре 20–22 °С, влажности 30–70 %, при световом цикле — 12 ч светлый/12 ч тёмный периоды, 8–10-кратной сменой воздуха в час. Адаптация к условиям содержания до включения в эксперимент составляла 14 дней. Все эксперименты проводили в интервале 10:00–16:00 ч. Эксперименты проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол от 16 мая 2024 г.).

Крыс после предварительного осмотра, исключающего включение в эксперимент больных и травмированных животных, распределяли на опытные и контрольную группы. Группы формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп не превышал  $\pm 10$  %).

**Препараты / Medication.** В исследовании использовали доксорубин (ДОКС, Доксорубин-ЛЭНС®, ООО «ВЕРОФАРМ», Россия) в дозах 2,0 мг/кг (группа 2) и 3,0 мг/кг (группа 3); лиофилизат для приготовления раствора, 2 мг/мл). Препарат вводили внутривентрально (в/б) 1 раз/неделю в течение 4 недель. Объём введения составлял 0,2 мл/100 г массы крысы. Контрольные животные получали физиологический





Рис. 1. Дизайн исследования

Fig. 1. Study design

Примечания: ОП — открытое поле; ГП — горизонтальная перекладина; ВС — вращающийся стержень; ПКЛ — приподнятый крестообразный лабиринт; УРПИ — условный рефлекс пассивного избегания. Группа 1 — физ. раствор; группа 2 — доксорубицин в дозе 2 мг/кг; группа 3 — доксорубицин в дозе 3 мг/кг. В тестах ОП, ГП, ВС, ПКЛ использовали группы 1, 2 и 3; в тесте УРПИ — группы 1 и 2.

Notes: ОП — OP — open field; ГП — HR — horizontal crossbar; ВС — RR — rotating rod; ПКЛ — EPM — elevated plus maze; УРПИ — CPAR — passive avoidance reflex. Group 1 — saline; group 2 — doxorubicin at a dose of 2 mg/kg; group 3 — doxorubicin at a dose of 3 mg/kg. Groups 1, 2 and 3 were used in the OP, GP, VS, and PCL tests; groups 1 and 2 in the CPAR test.

раствор в эквивалентном объёме (группа 1). Растворы готовились в день проведения эксперимента и хранились при  $22 \pm 3^\circ \text{C}$  не более часа.

Дизайн исследования представлен на рис. 1.

**Измерение массы тела животных.** Измерение массы тела крыс проводили в течение всего курса введения ДОКС в изученных дозах в 0, 7-, 14- и 21-дни эксперимента в утренние часы (до 11:00) на электронных весах Scout Pro SPU 601 (OHAUS Corp.).

### Поведенческие исследования / Behavioral research

**Тест «открытое поле».** Ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали в тесте «открытое поле». Установка для крыс представляет собой арену из поливинилхлорида белого цвета диаметром 97 см с высотой стенок 42 см, дно которой расчерчено на центральную площадку и 18 сегментов с 13 отверстиями диаметром 2 см, которые равномерно распределены по поверхности пола (НПК Открытая наука, Россия). Животное помещали в центр арены и в течение 5 мин регистрировали следующие параметры: число пересечений периферических сегментов ОП (периферическая активность — ПА); число пересечений центральных сегментов и заходов в центр (центральная активность — ЦА, Ц); число вставаний на задние лапы (вертикальная активность — ВА); заглядывания в отверстия; эмоциональность определяли по числу дефекаций в процессе тестирования (ЭМ); груминг; общую двигательную активность (ОДА) оценивали как сумму показателей ПА, ЦА, Ц и ВА [17, 18].

**Тест «вращающийся стержень»**, первоначально описанный Dunham NW and Miya TS [19], часто используется для оценки действия лекарственных средств

на координацию движений грызунов. На горизонтальный стержень диаметром 4 см, вращающийся со скоростью 3 об/мин, помещали крыс. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2 минут рассматривали как проявление нарушения координации движений [18, 19].

**Тест «горизонтальная перекладина»** позволяет регистрировать нарушения мышечного тонуса [17, 18]. Крыс подвешивают передними лапами на проволоку, натянутую на высоте 40 см от поверхности стола. Животные с ненарушенным мышечным тонусом быстро подтягиваются и удерживаются на перекладине четырьмя лапами. Невыполнение этого рефлекса животными свидетельствует о нарушении сенсомоторной функции и неврологическом дефиците [20].

**Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)** относится к стандартным тестам для определения уровня тревожности у грызунов. В исследовании использовали методику ПКЛ в модификации Pellow S и соавт. [21]. Эксперимент проводили в установке для крыс (НПК Открытая наука, Россия).

Методика ПКЛ основана на врождённом страхе открытого пространства и высоты у грызунов. Сущность метода заключается в анализе соотношения реакции страха животных в незнакомом пространстве и высоты, с одной стороны, и поисковой активности в новой обстановке — с другой. В соответствии с характеристиками для лабораторных животных реакция страха характеризуется стремлением животных находиться в закрытых рукавах лабиринта и снижением двигательной активности [17, 18].

Лабиринт представляет собой крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4 рукава: два противоположных, открытых, без

стенок и два, закрытых, тёмных, размером 50×10 см. Закрытые рукава имеют вертикальные светонепроницаемые стенки высотой 40 см. Лабиринт приподнят от пола на 50 см. В месте перекрёста плоскостей находится центральная платформа размером 10×10 см. Животных помещали на центральную площадку и в течение последующих 300 с фиксировали основные параметры, а именно время нахождения в открытых рукавах (с), число заходов в открытые рукава и число заходов в закрытые рукава. Показатели «время в открытых рукавах» и «число заходов в открытые рукава» сравнивали в процентах (%), которые рассчитывали по формуле: время в открытых рукавах = (время в открытых рукавах / 300) × 100 %; число заходов в открытые рукава = (число заходов в открытые рукава / общее число заходов в открытые и закрытые рукава) × 100 %. Снижение времени нахождения в открытых рукавах при отсутствии изменений двигательной активности (общее число заходов в открытые и закрытые рукава) рассматривали как проявление анксиогенного эффекта.

#### **Методика выработки условного рефлекса пассивного избегания / Method of developing a passive avoidance conditioned reflex**

Для оценки когнитивных функций использовали методику выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ, “Passive avoidance”) [18]. Установка для УРПИ “Passive avoidance” фирмы Lafayette Instrument Co (США) состоит из небольшой освещённой (60 Вт) платформы размером 24,5×6 см, находящейся на высоте, и затемнённой камеры размером 39×39×39 см с электродным полом. Отделение с электродным полом отгорожено от освещённого отделения перегородкой с квадратным отверстием 6×6 см. Электродный пол, состоящий из металлических прутьев диаметром 3 мм и расстоянием между прутьями 11 мм, регулируется таким образом, что при наступлении на него животные получают удар электрическим током заданной интенсивности.

Для обучения УРПИ крыс помещали на освещённую платформу перед входом в тёмную камеру и регистрировали латентное время захода в тёмный отсек. В тёмной камере крыса получала однократное болевое раздражение электрическим током (0,6 мА, длительность 10 с), после чего животное удаляли из установки.

Воспроизведение УРПИ проводили через 24 ч после обучения при повторном помещении животных в установку с регистрацией в течение 3 мин латентного периода первого захода крысы в тёмную камеру. С целью анализа влияния вещества на угашение УРПИ процедуру воспроизведения навыка проводили через 7 и 14 суток после обучения, также помещая животных в установку и регистрируя в течение 3 минут латентный период первого захода крысы в тёмную экспериментальную камеру.

#### **Статистический анализ / Statistical analysis**

Обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы статистического анализа “GraphPad Prism 9.5.1”. Результаты обрабатывались с использованием непараметрического критерия Краскала—Уоллиса с последующим применением критерия множественных сравнений по Данну. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты / Results**

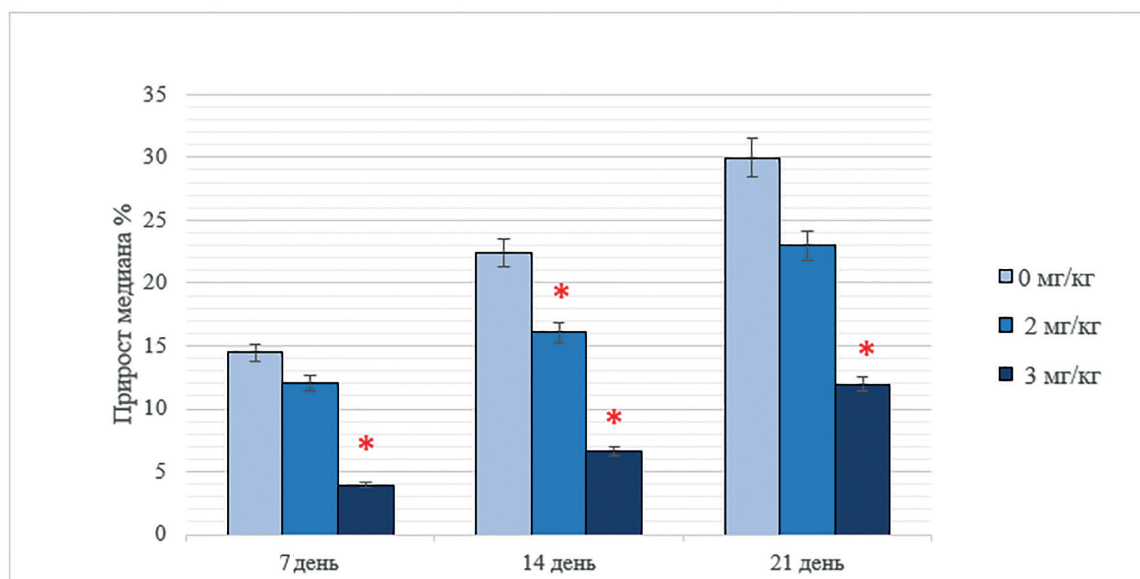
При анализе изменений массы тела животных контрольной и опытных групп было показано, что ДОКС в дозе 3 мг/кг уже через 7 дней после первого введения вызывал статистически значимое снижение прироста массы тела у крыс опытной группы по сравнению с контрольными животными ( $p < 0,05$ ). На протяжении последующих недель «терапии» ДОКС в дозе 3 мг/кг отмечали сохранение торможения прироста массы тела почти в 3 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 2). При использовании ДОКС в дозе 2 мг/кг отмечали менее выраженное падение прироста массы тела крыс по сравнению с ДОКС в дозе 3 мг/кг, проявившееся только через 14 дней после начала введения ДОКС ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Анализ данных поведенческих исследований в тесте «открытое поле» через 4 суток после последней инъекции ДОКС в дозах 2 мг/кг и 3 мг/кг не выявил статистически значимых отличий между контрольной и опытными группами (табл. 1).

При оценке влияния ДОКС (2 и 3 мг/кг, курс) на координацию движений в тесте «вращающийся стержень» было показано, что животные контрольной и опытных групп в течение 2 мин удерживались на «вращающемся стержне», что свидетельствует об отсутствии действия ДОКС в изученных дозах на координацию движений. При курсовом введении ДОКС в дозах 2 и 3 мг/кг рефлекс подтягивания на горизонтальной перекладине у крыс не нарушался.

При оценке поведенческих показателей крыс в тесте ПКЛ установлено дозозависимое влияние ДОКС на развитие тревожной реакции. ДОКС в дозе 2 мг/кг (через 5 суток после курсового применения) не влиял на показатели тревожной реакции крыс (рис. 3). При увеличении дозы ДОКС до 3 мг/кг регистрировали статистически значимое снижение времени пребывания и числа заходов в открытые рукава ПКЛ, снижение времени нахождения в центральной части лабиринта, наряду с отсутствием изменения общей двигательной активности (общее число заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта) (рис. 3).

Поскольку ДОКС в дозе 3 мг/кг вызывал у крыс формирование стрессовой реакции в ПКЛ, для оценки последствий использования антрациклинового препарата на способность к обучению и запоминание



**Рис. 2.** Изменение массы тела аутбредных крыс-самцов, получавших ДОКС в дозе 2 и 3 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4 недель

**Fig. 2.** Changes in body weight of outbred male rats treated with DOX at a dose of 2 and 3 mg/kg once a week for 4 weeks

*Примечания:* \* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными согласно непараметрическому аналогу дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Данные представлены в виде: Me (q25; q75), где Me — медиана, q25 — нижний квартиль, q75 — верхний квартиль.

*Notes:* \* —  $p < 0.05$  compared to intact animals according to the nonparametric analogue of the analysis of variance Kruskal–Wallis test followed by multiple comparison using Dunn’s test. The data are presented as: Me (q25; q75), where Me is the median, q25 — is the lower quartile, q75 — is the upper quartile.

Таблица 1

Влияние ДОКС в дозах 2 и 3 мг/кг при курсовом введении (1 раз/неделю в течение 4 недель) на показатели поведения беспородных крыс в тесте «открытое поле»

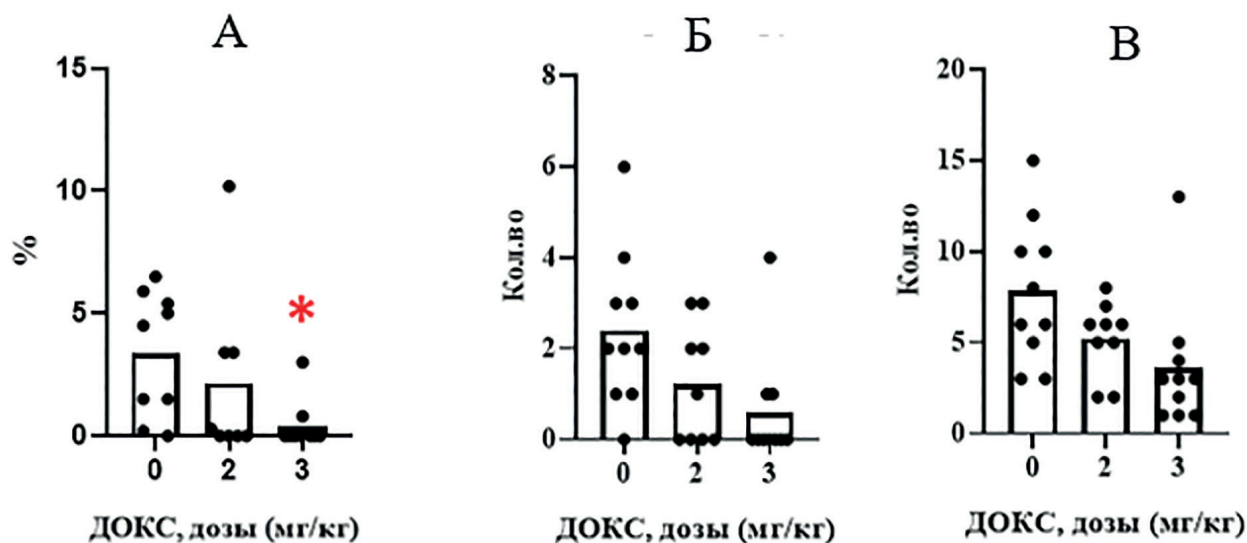
Table 1

The effect of DOX in a course of administration on the behavioral indices of outbred rats in the “open field” test

Показатели поведения	Группы		
	Контроль физ. р-р (n = 11)	ДОКС 2 мг/кг (n = 10)	ДОКС 3 мг/кг (n = 11)
Общая двигательная активность	42,0 (32,0; 59,0)	42,0 (33,8; 48,5)	41,0 (29,0; 48,0)
Латентный период первого перехода	6,0 (5,0; 11,0)	8,5 (3,8; 24,0)	8,0 (7,0; 9,0)
Периферическая активность	25,0 (19,0; 38,0)	29,5 (23,8; 39,3)	29,0 (21,0; 33,0)
Центральная активность	5,0 (1,0; 6,0)	3,5 (1,0; 5,5)	5,0 (3,0; 5,0)
Выходы в центр	0,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 1,3)	0,0 (0,0; 1,0)
Вертикальная активность	8,0 (6,0; 16,0)	6,0 (3,8; 10,8)	7,0 (4,0; 8,0)
Заглядывание в отверстия	6,0 (3,0; 9,0)	8,5 (4,8; 9,3)	5,0 (2,0; 6,0)
Груминг	2,0 (1,0; 4,0)	2,0 (0,8; 2,5)	2,0 (0,0; 3,0)
Эмоциональность (число дефекаций)	3,0 (0,0; 3,0)	0,5 (0,0; 2,5)	1,0 (0,0; 3,0)

*Примечания:* Данные представлены в виде: Me (q25; q75), где Me — медиана, q25 — нижний квартиль, q75 — верхний квартиль (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна); n — число животных в группе.

*Notes:* The data are presented as: Me (q25; q75), where Me is the median, q25 — is the lower quartile, q75 — is the upper quartile (Kruskal–Wallis test followed by multiple comparison using Dunn’s test); n — number of animals in the group.



**Рис. 3.** Влияние ДОКС после курсового введения на поведение беспородных крыс-самцов в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

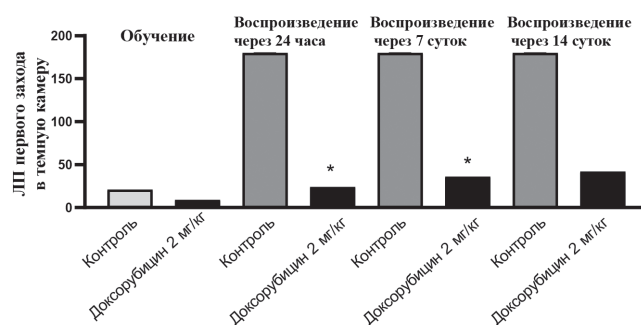
**Fig. 3.** The effect of DOX after a course of administration on the behavior of outbred male rats in the elevated plus maze test  
*Примечания:* \* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными согласно непараметрическому аналогу дисперсионного анализа по Крускалу—Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. А — время пребывания в открытых рукавах лабиринта (%); Б — число заходов в открытые рукава лабиринта; В — общее число заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта. В каждой группе по 10–11 животных. 0 — контрольная группа; 2 — доксорубин в дозе 2 мг/кг; 3 — доксорубин в дозе 3 мг/кг. Данные представлены в виде гистограмм с дисперсией.

*Notes:* \* —  $p < 0.05$  compared to intact animals according to the nonparametric analogue of the analysis of variance Kruskal–Wallis test followed by multiple comparison using Dunn’s test. A — time spent in the open arms of the maze (%); B — number of entries into the open arms of the maze; C — total number of entries into the open and closed arms of the maze. Each group contained 10–11 animals. 0 — control group; 2 — doxorubicin at a dose of 2 mg/kg; 3 — doxorubicin at a dose of 3 mg/kg. Data are presented as histograms with dispersion.

в тесте УРПИ, процедура тестирования в котором сопровождается стрессовым воздействием в виде удара током, ограничили опытной группой, получавшей ДОКС в дозе 2 мг/кг. ДОКС после курсового введения не влиял на латентное время захода в тёмную камеру при обучении по сравнению с контрольной группой.

Установлено, что контрольные животные через 24 часа после обучения УРПИ помнили об ударе током в тёмной камере и при воспроизведении, проводимом через 24 часа, 7 и 14 суток после обучения, большую часть времени пребывали на освещённой платформе. В группе животных, получавших ДОКС, регистрировали снижение латентного времени захода в тёмную камеру на 91 % (рис. 4), а также времени пребывания на светлой платформе (180,0 (180,0; 180,0) vs 23,0 (5,5; 180,0), контроль vs ДОКС,  $p = 0,0096$ ).

Анализ влияния ДОКС на угашение рефлекса при воспроизведении навыка показал, что через 7 суток после обучения, препарат также достоверно снижал время захода в тёмную камеру. Через 14 суток снижение латентного периода захода в тёмную камеру сохранялось, но было недостоверным (рис. 4).



**Рис. 4.** Влияние ДОКС в дозе 2 мг/кг при курсовом введении на обучение и воспроизведение памятного следа (методика условного рефлекса пассивного избегания, УРПИ)

**Fig. 4.** The effect of DOX at a dose of 2 mg/kg during a course of administration on learning and reproduction of a memory trace (the method of conditioned passive avoidance reflex, CRAP)

*Примечание:* \* —  $p < 0.05$  статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой согласно критерию Краскелла—Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна.

*Notes:* \* —  $p < 0.05$  compared to intact animals according to the nonparametric analogue of the analysis of variance Kruskal–Wallis test followed by multiple comparison using Dunn’s test.



## Обсуждение / Discussion

Ранее нами в воспроизведённой модели ДОКС-индуцированных когнитивных дисфункций [22] при курсовом введении препарата в дозах 2 и 3 мг/кг было показано, что ДОКС ослабляет пространственную рабочую память в Y-лабиринте. В этом исследовании была использована одна из модификаций теста, при которой закрывали один из рукавов Y-лабиринта во время обучения (пре-тест) для последующего измерения пространственно-ориентировочной памяти крыс, когда животные отдают предпочтение изучению (посещению) нового рукава во время тестирования (тест). Распознавание ранее посещённых рукавов Y-лабиринта с помощью пространственных ориентиров и увеличение числа посещений нового рукава указывают на сохранность функции гиппокампа и, наоборот, уменьшение числа заходов и времени пребывания в новом рукава свидетельствуют об ослаблении функции гиппокампа [22].

В настоящей работе у крыс после курсового применения ДОКС не было зарегистрировано изменения ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле», что согласуется с данными предыдущих исследований, показавших отсутствие выраженного влияния на общую двигательную активность ДОКС в дозах 2 и 2,5 мг/кг через неделю после курсового введения [14]. Полученные в нашем исследовании данные об отсутствии изменений под влиянием ДОКС этологических показателей поведения (груминг, число дефекаций) соответствует данным, описанным в работе *Okudan N, et al.* при суммарной

дозе ДОКС 8 мг/кг [23]. Сокращение времени нахождения в центре «открытого поля» и снижение общей двигательной активности отмечено при использовании ДОКС в дозе 5 мг/кг после однократного [24] и курсового введения [15].

ДОКС в дозе 3 мг/кг способствовал развитию анксиогенной реакции в ПКЛ, что коррелирует с результатами предыдущих исследований [23, 24] и подтверждает нейротоксическое действие препарата на ЦНС.

Согласно полученным данным, ДОКС в дозе 2 мг/кг не влияет на формирование памятного следа при обучении крыс в УРПИ, но оказывает выраженное негативное действие на воспроизведение памятного следа в базисном тесте УРПИ, позволяющем оценить влияние лекарственных средств на ассоциативные процессы обучения, что проявлялось снижением латентного времени захода в тёмный отсек установки и времени, проведённого на светлой платформе при воспроизведении через 24 ч и 7 суток после обучения. Эти результаты согласуются с работами *El-Agamy SE, et al.* и *Ali AE, et al.* [25, 26].

## Заключение / Conclusion

Доксорибицин в эксперименте на крысах вызывает дозозависимое нарушение когнитивных функций и усиливает тревожность. Полученные данные обосновывают применение ДОКС для моделирования когнитивных и эмоциональных нарушений на этапе доклинического изучения веществ, способных корригировать нарушения, вызываемые противоопухолевыми препаратами.

## 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 при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по теме FGFG-2025-0003 «Технологии сбережения здоровья на основе методологии доклинических исследований безопасности лекарственных средств».

### Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare no conflicts 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 with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation on the topic FGFG-2025-0003 "Health saving technologies based on the methodology of preclinical drug safety studies".

### Compliance with ethical standards

This article does not describe any studies involving human subjects.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Котельникова Светлана Олеговна** — к. б. н.,  
с. н. с. лаборатории фармакологии психических  
заболеваний ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и  
перспективных биомедицинских и фармацевти-  
ческих технологий», Москва,  
Российская Федерация  
e-mail: kotelnikova\_so@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7083-5298>

**Алексеев Иван Владимирович** — врач-детский  
онколог отделения детской онкологии, н. с. ла-  
боратории лекарственной токсикологии ФГБНУ  
«ФИЦ оригинальных и перспективных биоме-  
дицинских и фармацевтических технологий»,  
Москва, Российская Федерация  
e-mail: alekseev\_iv@academpharm.ru  
РИНЦ SPIN-код: 9757-6210

**Крайнева Валентина Александровна** — в. н. с.  
лаборатории фармакологии психических заболе-  
ваний ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспек-  
тивных биомедицинских и фармацевтических  
технологий», Москва, Российская Федерация  
**Автор, ответственный за переписку**  
e-mail: krayneva\_va@academpharm.ru  
РИНЦ SPIN-код: 7121-2357

**Воронина Татьяна Александровна** — д. м. н.,  
профессор, г. н. с., руководитель отдела ней-  
ропсихофармакологии, заведующий лаборато-  
рией фармакологии психических заболеваний  
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных  
биомедицинских и фармацевтических техноло-  
гий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: voronina\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>  
РИНЦ SPIN-код: 5766-3452

**Колик Лариса Геннадьевна** — д. б. н., профессор  
РАН, руководитель лаборатории лекарственной  
токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и  
перспективных биомедицинских и фармацевти-  
ческих технологий», Москва, Российская Феде-  
рация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>  
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

**Svetlana O. Kotel'nikova** — PhD, Cand. Sci. (Biol.),  
Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacol-  
ogy of Mental Diseases Federal Research Center for  
Innovator and Emerging Biomedical and  
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian  
Federation  
e-mail: kotelnikova\_so@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7083-5298>

**Ivan V. Alekseev** — Junior Research Scientist of the  
Laboratory of Drug Toxicology Federal Research  
Center for Innovator and Emerging Biomedical and  
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian  
Federation  
e-mail: alekseev\_iv@academpharm.ru  
RSCI SPIN code: 9757-6210

**Valentina A. Kraineva** — Leading Researcher at  
the Laboratory of Pharmacology of Mental Diseases  
Federal Research Center for Innovator and Emerg-  
ing Biomedical and Pharmaceutical Technologies,  
Moscow, Russian Federation  
**Corresponding author**  
e-mail: krayneva\_va@academpharm.ru  
RSCI SPIN code: 7121-2357

**Tatiana A. Voronina** — PhD, Dr. Sci. (Med.), profes-  
sor, Chief Scientific Officer, Head of the Department  
of Neuropsychopharmacology, Head of the Labora-  
tory of Pharmacology of Mental Diseases, Federal  
Research Center for Innovator and Emerging Bio-  
medical and Pharmaceutical Technologies, Moscow,  
Russian Federation  
e-mail: voronina\_ta@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>  
RSCI SPIN code: 5766-3452

**Larisa G. Kolik** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Profes-  
sor of the Russian Academy of Sciences, Head of  
laboratory of medicinal toxicology Federal Research  
Center for Innovator and Emerging Biomedical and  
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Fed-  
eration  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>  
RSCI SPIN code: 9126-6922

## Список литературы / References

1. Silberfarb PM, Philibert D, Levine PM. Psychosocial aspects of neoplastic disease: II. Affective and cognitive effects of chemotherapy in cancer patients. *Am J Psychiatry*. 1980 May;137(5):597-601. doi: 10.1176/ajp.137.5.597.
2. Ganz PA. Cognitive dysfunction following adjuvant treatment of breast cancer: a new dose-limiting toxic effect? *J Natl Cancer Inst*. 1998 Feb 4;90(3):182-3. doi: 10.1093/jnci/90.3.182.
3. Raffa RB, Duong PV, Finney J, et al. Is 'chemo-fog'/'chemo-brain' caused by cancer chemotherapy? *J Clin Pharm Ther*. 2006 Apr;31(2):129-38. doi: 10.1111/j.1365-2710.2006.00726.x.
4. Raffa RB. Cancer 'survivor-care': II. Disruption of prefrontal brain activation top-down control of working memory capacity as possible mechanism for chemo-fog/brain (chemotherapy-associated cognitive impairment). *J Clin Pharm Ther*. 2013 Aug;38(4):265-8. doi: 10.1111/jcpt.12071.
5. Wefel JS, Saleeba AK, Buzdar AU, Meyers CA. Acute and late onset cognitive dysfunction associated with chemotherapy in women with breast cancer. *Cancer*. 2010 Jul 15;116(14):3348-56. doi: 10.1002/cncr.25098.
6. Vitali M, Ripamonti CI, Roila F, et al. Cognitive impairment and chemotherapy: a brief overview. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Oct;118:7-14. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.001.
7. Mattioli R, Ilari A, Colotti B, et al. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med*. 2023 Oct;93:101205. doi: 10.1016/j.mam.2023.101205.
8. Volkova M, Russell R 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev*. 2011 Nov;7(4):214-20. doi: 10.2174/157340311799960645. PMID: 22758622; PMCID: PMC3322439.
9. Zordoky BN, Anwar-Mohamed A, Aboutabl ME, El-Kadi AO. Acute doxorubicin toxicity differentially alters cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver. *Drug Metab Dispos*. 2011 Aug;39(8):1440-50. doi: 10.1124/dmd.111.039123.
10. Aluisse CD, Sultana R, Tangpong J, et al. Chemo brain (chemo fog) as a potential side effect of doxorubicin administration: role of cytokine-induced, oxidative/nitrosative stress in cognitive dysfunction. *Adv Exp Med Biol*. 2010;678:147-56. doi: 10.1007/978-1-4419-6306-2\_19.
11. Bigotte L, Olsson Y. Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system. III. Distribution of the drug in the brain of normal adult mice after intraventricular and arachnoidal injections. *Acta Neuropathol*. 1982;58(3):193-202. doi: 10.1007/BF00690801.
12. Eide S, Feng ZP. Doxorubicin chemotherapy-induced "chemo-brain": Meta-analysis. *Eur J Pharmacol*. 2020 Aug 15;881:173078. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173078.
13. Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, et al. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci*. 2005 Feb 11;76(13):1439-53. doi: 10.1016/j.lfs.2004.05.040.
14. Kitamura Y, Hattori S, Yoneda S, et al. Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: Possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation. *Behav Brain Res*. 2015 Oct 1;292:184-93. doi: 10.1016/j.bbr.2015.06.007.
15. Алексеев И.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., и др. Оценка влияния доксорубина на когнитивные нарушения и микроскопическую картину отдельных структур головного мозга у крыс. *БИОМЕДИЦИНА*. 2024;20(3):52-57. [Alekseev IV, Miroshkina IA, Sorokina AV, et al. Doxorubicin Effects on Cognitive Impairment and the Microscopic View of Brain Structures in Rats. *Journal Biomed*. 2024;20(3):52-57. (In Russ.).] doi: 10.33647/2074-5982-20-3-52-57.
16. John J, Kinra M, Mudgal J, et al. Animal models of chemotherapy-induced cognitive decline in preclinical drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021 Nov;238(11):3025-3053. doi: 10.1007/s00213-021-05977-7.
17. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012:264-275. [Voronina TA, Seredenin SB, Yarkova MA, Voronin MV. Guidelines for the preclinical study of the tranquilizing (anxiolytic) effect of drugs. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K, 2012:264-275 (In Russ.).]
18. Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012:276-296. [Voronina TA, Ostrovskaya RU, Garibova TL. Guidelines for the preclinical study of drugs with a nootropic type of action. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K, 2012:276-296. (In Russ.).]
19. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. 1957 Mar;46(3):208-9. doi: 10.1002/jps.3030460322.
20. Murphy MP, Rick JT, Milgram NW, Ivy GO. A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. *Neurobiol Learn Mem*. 1995 Sep;64(2):181-6. doi: 10.1006/nlme.1995.1057.
21. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67. doi: 10.1016/0166-0270(85)90031-7.
22. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:105-111. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2\_10.
23. Okudan N, Belviranlı M, Sezer T. Potential Protective Effect of Coenzyme Q10 on Doxorubicin-Induced Neurotoxicity and Behavioral Disturbances in Rats. *Neurochem Res*. 2022 May;47(5):1280-1289. doi: 10.1007/s11064-021-03522-8.
24. Aziriova S, Repova Bednarova K, Krajcovicova K, et al. Doxorubicin-induced behavioral disturbances in rats: protective effect of melatonin and captopril. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Sep;124:284-9. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.021.
25. El-Agamy SE, Abdel-Aziz AK, Wahdan S, et al. Astaxanthin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment (Chemobrain) in Experimental Rat Model: Impact on Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Mechanisms. *Mol Neurobiol*. 2018 Jul;55(7):5727-5740. doi: 10.1007/s12035-017-0797-7.
26. Ali AE, Elsherbiny DM, Azab SS, El-Demerdash E. The diuretic amiloride attenuates doxorubicin-induced chemobrain in rats: Behavioral and mechanistic study. *Neurotoxicology*. 2022 Jan;88:1-13. doi: 10.1016/j.neuro.2021.10.002.





# Нейрохимические аспекты фармакологической активности кардиотропного соединения АЛМ-802S

Цорин И. Б., Колик Л. Г., Вититнова М. Б., Барчуков В. В., Мокров Г. В.,  
Кудрин В. С., Крыжановский С. А.

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

## Аннотация

**Введение.** В ряду алкоксифенилтриазаалканов выявлено соединение АЛМ-802S, обладающее выраженным кардиотропным действием. В структуру этого вещества входят 2 фармакофорных компонента кардиопротективного средства триметазидина, которые потенциально могут вызывать экстрапирамидные расстройства. Соединение АЛМ-802S, помимо кардиотропной активности, обладает анксиолитическим и анальгетическим действием. Не исключено, что соединение АЛМ-802S, воздействуя на центральные и периферические серотонинергическую и дофаминергическую медиаторные системы, может, также как и триметазидин, вызывать центральные побочные эффекты.

**Цель исследования.** Оценить влияние соединения АЛМ-802S на содержание биогенных катехоламинов, индоламинов и их метаболитов в плазме крови и отдельных структурах головного мозга у крыс.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на белых крысах самцах массой 180–200 г. Исследуемое вещество вводили в дозе 5 мг/кг в/б за 60 мин до декапитации. Содержание индоламинов и катехоламинов в плазме крови и структурах мозга определяли с помощью ВЭЖХ/ЭД.

**Результаты.** Анализ полученных данных показал, что соединение АЛМ-802S при однократном системном введении не влияет на содержание индоламинов в плазме крови и структурах головного мозга крыс. Измерения содержания катехоламинов показали, что соединение АЛМ-802S статистически значимо уменьшает концентрацию в плазме крови ДОФА и ГВК, содержание А, НА, ДА, ДОФУК и соотношения метаболитов практически не изменялось. Из всех изученных структур мозга только в гиппокампе наблюдалось уменьшение соотношения ГВК/ДА, характеризующего скорость распада ДА. В остальных структурах изменений не выявлено.

**Заключение.** С помощью нейрохимического анализа получена информация об отсутствии выраженного влияния АЛМ-802S на функциональную активность центральной дофаминергической и серотонинергической систем, что минимизирует возможность проявления экстрапирамидных расстройств и развития лекарственной зависимости при использовании АЛМ-802S в терапевтических дозах.

**Ключевые слова:** соединение АЛМ-802S; триметазидин; крысы; индоламины; катехоламины; серотонин; дофамин; экстрапирамидные расстройства

## Для цитирования:

Цорин И. Б., Колик Л. Г., Вититнова М. Б., Барчуков В. В., Мокров Г. В., Кудрин В. С., Крыжановский С. А. Нейрохимические аспекты фармакологической активности кардиотропного соединения АЛМ-802S. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):39–46. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-39-46>. EDN: SBQOMY

Поступила: 01.08.2025. В доработанном виде: 10.09.2025. Принята к печати: 20.09.2025. Опубликовано: 30.09.2025.

## Neurochemical aspects of the cardiotropic compound ALM-802S pharmacological activity

Iosif B. Tsorin, Larisa G. Kolik, Marina B. Vititnova, Vladimir V. Barchukov, Grigory V. Mokrov, Vladimir S. Kudrin, Sergey A. Kryzhanovskii  
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Introduction.** The compound ALM-802S, which has a pronounced cardiotropic effect, has been identified among the alkoxyphenyltriazoloalkanes. The structure of this substance includes 2 pharmacophore components of the cardioprotective agent trimetazidine, which can potentially cause extrapyramidal disorders. The ALM-802S compound, in addition to its cardiotropic activity, has anxiolytic and analgesic effects. It is possible that the ALM-802S compound, acting on the central and peripheral serotonergic and dopaminergic mediator systems, may, like trimetazidine, cause central side effects.

**The study aim.** It was to evaluate the effect of the ALM-802S compound on the content of biogenic catecholamines, indolamines and their metabolites in blood plasma and separate brain structures in rats.

**Materials and methods.** The experiments were carried out on white male rats weighing 180–200 g. The test substance was administered at a dose of 5 mg/kg i.p. 60 minutes before decapitation. The content of indolamines and catecholamines in blood plasma and brain structures was determined using HPLC/ED.

**Results.** Analysis of the obtained data showed that the compound ALM-802S with a single systemic administration does not affect the content of indolamines in blood plasma and brain structures of rats. Measurements of the catecholamine content showed that the ALM-802S compound significantly reduced the concentration of DOPA and HCV in blood plasma, the content of А, НА, ДА, DOPA and the ratio of metabolites remained virtually unchanged. Of all the studied brain structures, only in the hippocampus there was a decrease in the GVK/DA ratio, which characterizes the DA decay rate. No changes were found in the rest of the brain structure.

**Conclusion.** Using neurochemical analysis, information was obtained on the absence of a pronounced effect of ALM-802S on the functional activity of the central dopaminergic and serotonergic systems, which minimizes the possibility of extrapyramidal disorders and the development of drug dependence when using ALM-802S in therapeutic doses.

**Keywords:** ALM-802S compound; trimetazidine; rats; indolamines; catecholamines; serotonin; dopamine; extrapyramidal disorders

## For citations:

Tsorin IB, Kolik LG, Vititnova MB, Barchukov VV, Mokrov GV, Kudrin VS, Kryzhanovskiy SA. Neurochemical aspects of the cardiotropic compound ALM-802S pharmacological activity. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):39–46. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-39-46>. EDN: SBQOMY

Received: 01.08.2025. Revision received: 10.09.2025. Accepted: 20.09.2025. Published: 30.09.2025.

## Введение / Introduction

Заболевания сердечно-сосудистой системы сопровождаются повышенной тревогой и депрессией, поэтому в комплексной терапии часто используют психотропные препараты [1, 2]. Наличие у кардиотропных лекарственных средств анксиолитических и антидепрессивных свойств позволит расширить спектр их применения [3]. Так, например, триметазидин обладает выраженным анксиолитическим и анальгетическим действием в опытах *in vivo* [4–6]. Результаты доклинических и клинических исследований убедительно свидетельствуют о потенциальной возможности использования триметазидина в лечении биполярной депрессии [7, 8]. Однако при применении триметазидина отмечают экстрапирамидные расстройства [9–11] и усугубление симптомов существующих двигательных расстройств, включая болезнь Паркинсона [12]. Потенциальный антипсихотический эффект триметазидина, описанный на грызунах, соответствует гипотезе о том, что триметазидин может проникать через гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с дофаминовыми рецепторами в центральной нервной системе [6].

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в ряду алкоксифенилтриазаалканов, содержащих в структуре фармакофорные компоненты противоишемического лекарственного средства триметазидина, выявлено соединение АЛМ-802S (рис. 1), обладающее выраженными кардиопротективными свойствами, что было доказано на моделях аконитиновых, хлоридкальциевых и хлоридбариевых нарушений ритма сердца у крыс [13, 14]. На скрининговых моделях аритмий соединение по своей антиаритмической активности, как минимум, не уступает таким эталонным препаратам, как новокаинамид, верапамил и амиодарон [13, 14]; предупреждает возникновение фибрилляций желудочков в условиях окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии у крыс [14, 15], не уступая по антиаритмической эффективности таким

эталонным препаратам, как новокаинамид, верапамил и амиодарон [14]; обладает противоишемическим действием на модели субэндокардиальной ишемии, в том числе в условиях эндотелиальной дисфункции, проявляет выраженную антиишемическую активность [16, 17]; уменьшает интенсивность ремоделирования левого желудочка сердца в условиях трансляционной модели хронической сердечной недостаточности [18].

Ранее показано, что соединение АЛМ-802S так же как и триметазидин обладает психотропным действием в опытах на животных, эффективно повышая порог болевой реакции при термической стимуляции ноцицепторов на супраспинальном уровне в тесте «горячая пластина» и снижая уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» [5, 19]. Нельзя исключить, что соединение АЛМ-802S, обладая сходным с триметазидином спектром фармакологической активности, так же, как и он, может вызывать центральные побочные эффекты, влияя на серотонинергическую и дофаминергическую медиаторные системы.

**Цель исследования / Purpose of the study.** Оценить влияние соединения АЛМ-802S на содержание биогенных катехоламинов, индоламинов и их метаболитов в плазме крови и отдельных структурах головного мозга у крыс.

## Материалы и методы / Materials and methods

**Животные.** Опыты проведены на белых беспородных крысах самцах массой 180–200 г ( $n = 20$ ), полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая», имеющих ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья и прошедших 15-суточный карантин в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали в стандартных пластиковых клетках по 10 голов, с предоставлением *ad libitum* стандартного брикетированного корма ПК-120-1

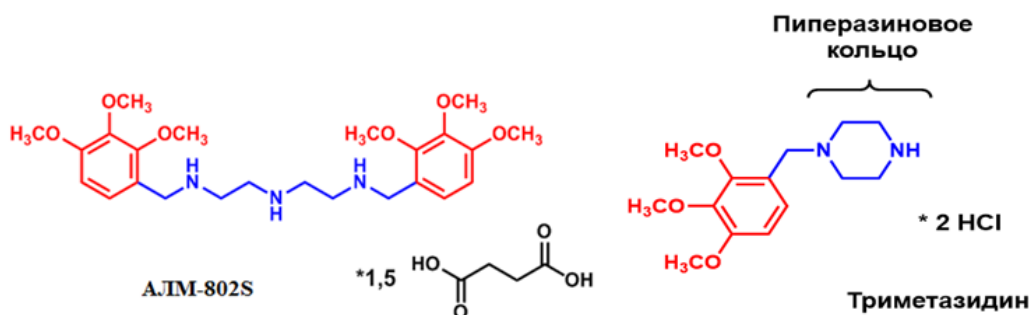


Рис. 1. Структурные формулы соединения АЛМ-802S и триметазидина  
Fig. 1. Structural formulas of the compound ALM-802S and trimetazidine

(ООО «Лабораторснаб», РФ) при регулируемом 12/12 световом режиме. Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» 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, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)) и «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

**Препараты.** Соединение АЛМ-802S (N1-(2,3,4-триметоксибензил)-N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина сукцинат), синтезированное в отделе химии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», в виде субстанции растворяли в 0,9 % NaCl и вводили животным опытной группы ( $n = 10$ ) однократно в дозе 5 мг/кг, внутривенно (в/в), за 60 мин до декапитации. Крысы контрольной группы ( $n = 10$ ) получали 0,9 % NaCl, в/в по аналогичной схеме, из расчёта 0,1 мл/100 г массы тела животного. Выбор дозы АЛМ-802S основан на ранее полученных данных об анксиолитической и анальгетической активности соединения в диапазоне доз 1–8 мг/кг [19], в которых АЛМ-802S также проявляет кардиотропные свойства [5].

**Схема эксперимента.** После декапитации крыс структуры головного мозга (фронтальная кора, гипоталамус, прилежащее ядро, стриатум и гиппокамп) извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и взвешивали. Кровь собирали в пробирку с 20 мкл 5 % ЭДТА и 5 мкл 10 % метабисульфита калия, затем центрифугировали 20 мин при 3 000 об/мин, затем супернатант переносился в другую пробирку и замораживался для дальнейшего определения катехоламинов и свободного серотонина. Пробы хранили в жидком азоте.

Выделенные структуры мозга крыс размельчали в гомогенизаторе «стекло–тефлон» (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3 000 об/мин в 1,0 мл 0,1 н HClO<sub>4</sub> с добавлением 250 пкмоль/мл внутреннего стандарта (3,4-диоксибензиламина, ДНВА, ДГБА). Пробы центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5415R. Надосадочную жидкость в объёме 20 мкл наносили на аналитическую колонку методом прямой инъекции через инжектор Reodyne 7125. А (адреналин), НА (норадреналин), ДОФА (диоксифенил аланин), ДОФУК (3,4 диоксифенилуксусная кислота), ДА (до-

фамин), ГВК (гомованилиновая кислота), 5-ОИУК (5-оксииндолуксусная кислота), 5-метокситирамин (3-МТ) и 5-ОТ (серотонин) разделяли на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, ФРГ) с использованием в качестве подвижной фазы цитратно-фосфатного буфера pH 3,85, содержащего 0,03 М Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, 0,025 М безводной лимонной кислоты, 0,6 мМ октансульфоната натрия, 0,02 мМ ЭДТА и 8 % ацетонитрила. Определение моноаминов и их метаболитов осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале +0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин (на изократическом хроматографе с использованием насоса Gilson-307 (Франция) и электрохимического детектора LC-4В (BAS, США).

Содержание моноаминов и их метаболитов в плазме крови определялось с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, «Элсико», Москва). Насос РМ-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрила (pH 3,0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4В (BAS, США) на стеклоуглеродном электроде (+0,85 В) против электрода сравнения Ag/AgCl.

Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 («Амперсент»).

Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч., х.ч. или analytical grade. Для калибровки хроматографа использовались смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 500 пикомоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце.

**Статистический анализ** проводили следующим образом. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как выборки имели нормальное распределение, а дисперсии во многих случаях были негомогенны, то статическую значимость различий определяли с помощью критерия Стьюдента, в случае необходимости используя приближение для выборок с неравными дисперсиями. Результаты представлены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости  $\alpha = 0,05$ .



## Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ полученных результатов показал, что соединение АЛМ-802S при однократном системном введении не влияет на содержание индоламинов в плазме крови и структурах головного мозга крыс (табл. 1). Показано, что триметазидин значительно повышал уровень серотонина 5-НТ в сыворотке крови и тромбоцитах в подгруппах с инфарктом миокарда, депрессией и инфарктом миокарда, комбинированным с депрессией, по сравнению с животными аналогичных групп, получавших физиологический раствор [3]. Следует подчеркнуть, что регулирующий эффект триметазида на центральную и периферическую серотонинергическую систему проявлялся при его хроническом введении в течение 4 недель [20], но не при остром введении. Для ответа на вопрос, будет ли АЛМ-802S эффективен в отношении депрессивных состояний, развивающихся на фоне инфаркта миокарда или других нарушений со стороны сердечно-сосудистой системы, необходимо провести дополнительные исследования при его субхроническом и хроническом введении в условиях моделирования сопутствующей патологии.

Полученные данные по содержанию катехоламинов в плазме крови и структурах мозга указывают на

то, что под влиянием соединения АЛМ-802S в плазме крови уменьшалось содержание ДОФА (в 1,7 раза,  $p < 0,05$ ) и ГВК (в 1,9 раза,  $p < 0,05$ ) при отсутствии статистически значимых изменений в содержании А, НА, ДА, ДОФУК и соотношения метаболитов (табл. 2). Во всех изученных структурах головного мозга содержание НА, ДА и их метаболитов под влиянием соединения АЛМ-802S практически не менялось (см. табл. 2), однако в гиппокампе отмечалось статистически значимое снижение в 2,7 раза показателя утилизации ДА (ГВК/ДА), который характеризует скорость превращения ДА в его метаболит ГВК. Так, в контрольной группе этот показатель был равен  $1,12 \pm 0,53$  нМ/г, а у животных, получавших АЛМ-802S —  $0,42 \pm 0,06$  нМ/г ( $p < 0,05$ ).

В ряде исследований описаны случаи, когда триметазидин может вызывать экстрапирамидные расстройства, характерные для антипсихотиков. Так, например, согласно результатам корейского общенационального популяционного исследования, систематическая терапия триметазидином значительно повышает риск развития паркинсонизма, при этом наиболее частыми экстрапирамидными симптомами, о которых сообщалось, были акинезия, ригидность, нарушения осанки и походки, особенно у пациентов старшей возрастной

Таблица 1

Влияние соединения АЛМ-802S (5 мг/кг, в/б, за 60 мин до декапитации) на содержание индоламинов в плазме крови и структурах мозга крыс

Table 1

Effect of the compound ALM-802S (5 mg/kg, i.p., 60 minutes before decapitation) on the content of indolamines in the blood plasma and brain structures of rats

Вещество Substance	5-ОТФ 5-OTF	5-ОТ 5-OT	5-ОИУК 5-OIUK	5-ОИУК/ 5-ОТ 5-OIUK/OT
Плазма крови				
Контроль	$8,89 \pm 1,32$	$4349,87 \pm 375,78$	$122,76 \pm 10,40$	$0,03 \pm 0,0$
АЛМ-802S	$8,89 \pm 1,81$	$4880,71 \pm 411,37$	$133,29 \pm 16,28$	$0,03 \pm 0,01$
Фронтальная кора				
Контроль		$5878,26 \pm 1389,63$	$10583,98 \pm 3809,76$	$1,65 \pm 0,31$
АЛМ-802S		$5298,03 \pm 1058,35$	$7443,78 \pm 1208,1$	$2,66 \pm 0,82$
Гипоталамус				
Контроль		$8914,76 \pm 358,46$	$10588,27 \pm 909,11$	$1,17 \pm 0,06$
АЛМ-802S		$8746,67 \pm 413,9$	$10139,65 \pm 514,65$	$1,19 \pm 0,09$
Прилежащее ядро				
Контроль		$4950,30 \pm 687,67$	$7250,85 \pm 1115,75$	$1,54 \pm 0,17$
АЛМ-802S		$4885,00 \pm 616,9$	$7971,87 \pm 841,95$	$1,70 \pm 0,07$
Стриатум				
Контроль		$3444,03 \pm 315,98$	$7428,06 \pm 622,50$	$2,19 \pm 0,08$
АЛМ-802S		$3742,98 \pm 240,15$	$7734,56 \pm 577,55$	$2,06 \pm 0,08$
Гиппокамп				
Контроль		$2902,64 \pm 201,77$	$5505,39 \pm 287,21$	$1,96 \pm 0,11$
АЛМ-802S		$2878,29 \pm 195,98$	$6372,75 \pm 556,92$	$2,21 \pm 0,09$

Примечания: 1. Данные представлены в пмоль/мг ткани; 2. Приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.  
Notes: 1. Data is presented in pmol/mg of tissue; 2. Shows the arithmetic averages and their standard errors.

Таблица 2  
Влияние АЛМ-802S (5 мг/кг, в/б, за 60 мин до декапитации) на содержание катехоламинов и их метаболитов в плазме крови и структурах мозга крыс

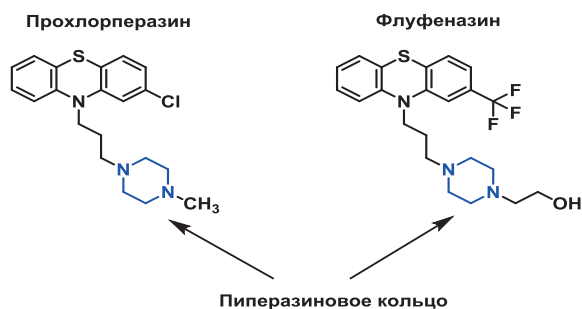
Table 2  
Effect of ALM-802S (5 mg/kg, i.p., 60 minutes before decapitation) on the content of catecholamines and their metabolites in blood plasma and brain structures of rats

Вещество Substance	A	НА NA	ДОФА DOFA	ДА DA	ДОФУК DOFUK	ГБК GBA	3-МТ 3-MT	ДОФУК/ ДА DOFUK/DA	ГБК/ДА GBA/DA
Плазма крови									
Контроль	38,34±17,71	11,56±4,84	8,48±1,14	9,18±1,99	18,73±2,09	32,12±5,59	НПД	3,01±0,68	5,49±2,09
АЛМ-802	55,87±11,14	15,24±3,71	<b>4,86±1,15*</b>	8,07±2,18	19,19±3,65	<b>16,32±4,58*</b>	НПД	6,59±3,3	2,68±0,56
Фронтальная кора									
Контроль		3698,78±2398,33		970,51±240,98	1217,76±671,85	13536,80±11,042	1520,18±633,64	1,24±0,37	6,75±3,48
АЛМ-802		1867,05±295,86		831,58±131,71	520,04±120,06	1810,72±398,52	690,74±188,74	0,82±0,19	3,27±0,99
Гипоталамус									
Контроль		12155,61±625,76		2281,54±185,39	117,58±26,15	476,51±248,04	135,06±17,96	0,07±0,03	0,23±0,17
АЛМ-802		10650,18±699,18		2049,98±210,95	106,19±23,21	86,15±28,17	135,57±51,04	0,05±0,01	0,04±0,01
Прилежащее ядро									
Контроль		6197,13±1265,12		31835,36±4365,84	2928,72±337,56	1755,43±432,06	663,42±171,13	0,1±0,01	0,5±0,01
АЛМ-802		5647,93±774,12		41534,81±3611,4	3786,29±336,22	1778,68±162,63	877,14±88,96	0,1±0,01	0,1±0,01
Стриатум									
Контроль		1063,98±121,04		64248,51±3712,82	7566,4±492,68	2892,42±206,77	1490,41±170,4	0,12±0,01	0,05±0,00
АЛМ-802		1395,39±179,33		61587,58±5686,73	7185,59±726,32	2784,24±240,41	1369,19±121,94	0,12±0,00	0,05±0,00
Гиппокамп									
Контроль		3280,36±179,34		116,93±15,10	96,78±17,8	112,0±21,62	153,76±64,19	0,85±0,17	1,12±0,53
АЛМ-802		3355,3±292,17		153,24±26,47	94,99±14,59	87,85±20,67	63,46±17,54	0,55±0,09	<b>0,42±0,06*</b>

Примечания: 1. Данные представлены в пмоль/мг ткани; 2. Приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки; 3 \* —  $p < 0,05$  по отношению к контролю (t-критерий Стьюдента).

Notes: 1. Data are presented in pmol/mg tissue; 2. Mean values and their standard errors are given; 3 \* —  $p < 0.05$  compared to the control (Student's t-test).

группы [21, 22]. Такие эффекты триметазидина могут быть вызваны наличием в его химической структуре пиперазинового ядра (см. рис. 1) [11], которое также содержат психотропные препараты прохлорперазин и флуфеназин (рис. 2), которые, как известно, могут вызывать лекарственный паркинсонизм и/или ухудшать течение болезни Паркинсона [23].



**Рис. 2.** Структурные формулы прохлорперазина и флуфеназина  
**Fig. 2.** Structural formulas of Prochlorperazine and Fluphenazine

Лекарственные средства, содержащие пиперазиновое ядро, могут вызывать сильное постсинаптическое ингибирование дофаминовых рецепторов, включая дофаминовые рецепторы D2 подтипа [24], которые присутствуют во многих структурах мозга, таких как стриатум, прилежащее ядро, гипоталамус, и играют существенную роль в регуляции движений. Отсутствие в структуре соединения АЛМ-802S пиперазинового ядра позволяет предположить, что, в отличие от близкого к нему по структуре триметазидина, соединение не будет вызывать экстрапирамидных расстройств и, следовательно, иметь лучший профиль фармакологической безопасности.

Судя по вызываемым АЛМ-802S изменениям в содержании биогенных моноаминов и их метаболитов в ЦНС, можно полагать, что фармакологическая

активность нового кардиотропного соединения АЛМ-802S в отношении ЦНС, в частности купирование тревожной реакции и повышение порога болевой реакции, не связана с действием, характерным для психоактивных веществ и сопровождающимся значительным увеличением соотношения ДОФУК/ДА и 5 ОИУК/5-ОТ в стриатуме, а также ГВК/ДА в прилежащем ядре, ассоциированных с формированием лекарственной зависимости [25].

## Заключение / Conclusion

В настоящее время к одной из основных целей исследования фармакологической безопасности относят изучение механизма развития как выявленных, так и потенциальных неблагоприятных эффектов. Особо подчёркивается, что при изучении фармакологической безопасности новых лекарственных соединений необходимо учитывать нежелательные эффекты, характерные для их структурных/функциональных аналогов [26]. В данной работе в опытах *ex vivo* с помощью нейрохимического метода анализа проведена экспериментальная оценка возможного механизма центрального действия нового оригинального кардиотропного соединения, созданного с использованием фармакофоров известного лекарственного средства триметазидина, обладающего рядом нежелательных центральных побочных эффектов, выявленных в клинической практике. Нейрохимический анализ содержания катехоламинов, индоламинов и их метаболитов в корковых и подкорковых структурах мозга у крыс позволил получить информацию об отсутствии выраженного влияния соединения АЛМ-802S на функциональную активность дофаминергической и серотонинергической систем, что свидетельствует о том, что при применении соединения АЛМ-802S в терапевтических дозах риск развития экстрапирамидных расстройств и/или лекарственной зависимости минимален.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

### Участие авторов

Все авторы приняли равнозначное участие в написании статьи.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

### Authors' participation

All authors contributed equally to this work.



СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Цорин Иосиф Борисович** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: tsorin\_ib@academpharm.ru  
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  
e-mail: tsorin\_ib@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>  
RSCI SPIN code: 4015-3025

**Колик Лариса Геннадьевна** — д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: kolik\_lg@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>  
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

**Larisa G. Kolik** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of laboratory of medicinal toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>  
RSCI SPIN code: 9126-6922

**Вититнова Марина Борисовна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: vititnova\_mb@academpharm.ru  
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  
e-mail: vititnova\_mb@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>  
RSCI SPIN code: 1901-8919

**Барчуков Владимир Валерьевич** — к. м. н., н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>  
РИНЦ SPIN-код: 6743-4280

**Vladimir V. Barchukov** — PhD, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>  
RSCI SPIN code: 6743-4280

**Мокров Григорий Владимирович** — к. х. н., зав. лабораторией тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: mokrov\_gv@academpharm.ru  
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  
e-mail: mokrov\_gv@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>  
RSCI SPIN code: 8755-7666

**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

## Список литературы / References

1. Hare DL, Toukhsati SR, Johansson P, Jaarsma T. Depression and cardiovascular disease: a clinical review. *Eur Heart J*. 2014 Jun 1;35(21):1365-72. doi: 10.1093/eurheartj/ehu462.
2. Zhao Q, Sun X, Zhang Y, et al. Network analysis of anxiety and depressive symptoms among patients with heart failure. *BMC Psychiatry*. 2024 Nov 14;24(1):803. doi: 10.1186/s12888-024-06259-0.
3. Liu M, Wei W, Stone CR, et al. Beneficial effects of trimetazidine on expression of serotonin and serotonin transporter in rats with myocardial infarction and depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018 Mar 16;14:787-797. doi: 10.2147/NDT.S157441.
4. Колик Л.Г., Надорова А.В., Столярчук В.Н., и др. Анксиолитические свойства триметазидина на экспериментальных моделях повышенной тревожности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;162(11):593-597. [Kolik LG, Nadorova AV, Stolyaruk VN, et al. Anxiolytic properties of trimetazidine in experimental models of increased anxiety. *Bull Exp Biol Med*. 2016;162(11):593-597. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-017-3677-2. EDN: XGVGAX
5. Барчуков В.В. Поиск кардиотропных средств в ряду линейных и циклических алкоксифенилазаланов. Дис. ... канд. мед. наук. — Москва; 2024. [Barchukov VV. Poisk kardiotropnyh sredstv v ryadu lineynyh i ciklicheskih alkoksisfenilazaalkanov. [dissertation] Moscow; 2024. (In Russ.)]. Доступно по: [https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1673/Barchukov\\_DISSERTACIYA.pdf](https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1673/Barchukov_DISSERTACIYA.pdf). Ссылка активна на 01.07.2025.
6. Erbaş O, Akseki HS, Eliküçük B, Taşkıran D. Antipsychotic-like effect of trimetazidine in a rodent model. *ScientificWorldJournal*. 2013 Oct 22;2013:686304. doi: 10.1155/2013/686304.
7. Bortolasci CC, Kidnapillai S, Spolding B, et al. Use of a gene expression signature to identify trimetazidine for repurposing to treat bipolar depression. *Bipolar Disord*. 2023 Dec;25(8):661-670. doi: 10.1111/bdi.13319.
8. Khanra S, Reddy P, Giménez-Palomo A, et al. Metabolic regulation to treat bipolar depression: mechanisms and targeting by trimetazidine. *Mol Psychiatry*. 2023 Aug;28(8):3231-3242. doi: 10.1038/s41380-023-02134-8.
9. Martí Massó JF, Martí I, Carrera N, et al. Trimetazidine induces parkinsonism, gait disorders and tremor. *Therapie*. 2005 Jul-Aug;60(4):419-22. doi: 10.2515/therapie:2005061.
10. Bondon-Guitton E, Perez-Lloret S, Bagheri H, et al. Drug-induced parkinsonism: a review of 17 years' experience in a regional pharmacovigilance center in France. *Mov Disord*. 2011 Oct;26(12):2226-31. doi: 10.1002/mds.23828.
11. Masmoudi K, Masson H, Gras V, Andréjak M. Extrapyramidal adverse drug reactions associated with trimetazidine: a series of 21 cases. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 Apr;26(2):198-203. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.01008.x.
12. Pintér D, Kovács M, Harmat M, et al. Trimetazidine and parkinsonism: A prospective study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 May;62:117-121. doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.01.005.
13. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., и др. Скрининг кардиотропной активности в ряду  $\alpha$ , $\omega$ -диарилметильных производных бис-( $\omega$ -аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):10-13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, et al. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the  $\alpha$ ,  $\omega$ -diarylmetil derivatives of bis-( $\omega$ -aminoalkyl)amines. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(2):10-13 (In Russ.)].
14. Барчуков В.В., Зинченко В.П., Цорин И.Б., и др. Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):56-67. [Barchukov VV, Zinchenko VP, Tsorin IB, et al. Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):56-67. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2023-3-56-67.
15. Барчуков В.В., Столярчук В.Н., Цорин И.Б., и др. Исследование антиаритмической активности линейных алкоксифенилазаланов на модели реперфузионных аритмий у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):20-28. [Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, et al. Study of the antiarrhythmic activity of linear alkoxyphenylazalkanes in the model of reperfusion arrhythmias in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):20-28. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2023-2-20-28.
16. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., и др. Сравнительное изучение антиишемической активности триметазидина и соединения АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2019;(2):23-27. [Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, et al. A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2019;(2):23-27. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10042.
17. Цорин И.Б., Барчуков В.В., Вититнова М.Б., и др. Кардиопротекторные эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2021;(1):18-22. [Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, et al. Cardioprotective effects of compound ALM-802 on subendocardial ischemia models. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(1):18-22. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2021-1-18-22.
18. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., и др. Выбор тактики экспериментальной терапии хронической сердечной недостаточности соединением АЛМ-802. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;170(12):764-767. [Barchukov VV, Tsorin IB, Vititnova MB, et al. Choice of tactics for experimental therapy of chronic heart failure with ALM-802 compound. *Bull Exp Biol Med*. 2020;170(12):764-767. (In Russ.)]. doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-12-764-767. EDN: VHLKUY
19. Колик Л.Г., Надорова А.В., Цорин И.Б., и др. Экспериментальная оценка анксиолитических и анальгетических свойств нового производного линейных метоксифенилтриазааланов с кардиотропной активностью. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;170(12):752-758. [Kolik LG, Nadorova AV, Tsorin IB, et al. Experimental evaluation of the anxiolytic and analgesic properties of a new derivative of linear methoxyphenyltriazalkanes with cardiotropic activity. *Bull Exp Biol Med*. 2020;170(12):752-758. (In Russ.)]. doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-12-752-758.
20. Zhang LJ, Liu MY, Rastogi R, Ding JN. Psychocardiological disorder and brain serotonin after comorbid myocardial infarction and depression: an experimental study. *Neurol Res*. 2018 Jun;40(6):516-523. doi: 10.1080/01616412.2018.1455460.
21. Kim S, Yu YM, Kwon J, et al. Trimetazidine Use and the Risk of Parkinsonism: A Nationwide Population-Based Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Oct 4;17(19):7256. doi: 10.3390/ijerph17197256.
22. Dy AMB, Limjoco LLG, Jamora RDG. Trimetazidine-Induced Parkinsonism: A Systematic Review. *Front Neurol*. 2020 Feb 25;11:44. doi: 10.3389/fneur.2020.00044.
23. Ferreira JJ, Katzenschlager R, Bloem BR, et al. Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2013 Jan;20(1):5-15. doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03866.x.
24. Masmoudi K, Gras-Champel V, Douadi Y, et al. La trimetazidine--nouvelle etiologie de troubles extrapyramidaux: un cas de syndrome parkinsonien avec akathisie [Trimetazidine-a new aetiology for extrapyramidal disorders: A case of parkinsonism and akathisia]. *Therapie*. 2005 Nov-Dec;60(6):603-5. French. doi: 10.2515/therapie:2005090.
25. Колик Л.Г., Надорова А.В., Наркевич В.Б., Кудрин В.С. Производное аминоксифенилазаланов ослабляет морфин-индуцированную гиперлокомоторную реакцию, модулируя активность дофаминергической и серотонинергической систем. *Нейрохимия*. 2020;37(1):54-63. [Kolik LG, Nadorova AV, Narkevich VB, Kudrin VS. The Derivative of aminoalkoxyphenylazalkanes alleviates morphine-induced hyperlocomotion via modulation of activity of the dopaminergic and serotonergic systems. *Neurochemistry*. 2020;37(1):54-63. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S1027813320010136.
26. Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Горячев Д.В. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;(2):92-97. [Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Safety Pharmacology Studies of Medicinal Products: Evaluation of Results. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;(2):92-97. (In Russ.)]. doi: 10.30895/1991-2919-2017-7-2-92-97.



# Количественное определение димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А.,  
Дворянинов Д. А., Жердев В. П., Дорофеев В. Л.

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

## Аннотация

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» создан новый димерный дипептидный миметик с антидепрессантоподобной активностью. Разработана и валидирована специфичная, чувствительная, быстрая и воспроизводимая методика определения гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина (ГТС-301) в плазме крови крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandem масс-спектрометрическим детектором. Нижний предел количественного определения в плазме крови составлял 50 нг/мл. Все градуировочные графики описывались квадратичным уравнением (коэффициент корреляции в среднем 0,996,  $n = 3$ ) в диапазоне концентраций 50–10000 нг/мл. Значения правильности для образцов контроля качества варьировались в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %. Прецизионность (точность) колебалась в диапазоне 1,1–11,4 %. На протяжении валидационного периода значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 % и точности — 5,4–7,3 %. Для градуировочных стандартов величины валидационных параметров также были в пределах допустимых значений (правильность — 92,2–106,8 %, точность — 0,1–11,5 %). Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом в 10 и 100 раз лежат в пределах допустимых значений 85–115 %. Установлено, что ГТС-301 устойчив в биологическом материале при комнатной температуре при кратковременном хранении (3 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (5 °C) в течение аналитического эксперимента (до 20 ч), при длительном хранении при –50 °C (в течение 4 недель), а также, если подвергается нескольким циклам замораживания/размораживания (3 цикла). Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её подходящей для применения в доклинических исследованиях фармакокинетики. Разработанная методика апробирована при изучении фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного введения в дозе 150 мг/кг.

**Ключевые слова:** ГТС-301; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС); плазма крови; крысы; валидация методики

## Для цитирования:

Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Дворянинов Д. А., Жердев В. П., Дорофеев В. Л. Количественное определение димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):47–56. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-47-56>. EDN: ZQXRFG  
**Поступила:** 01.08.2025. **В доработанном виде:** 05.09.2025. **Принята к печати:** 28.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## Quantification of a dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity in rat blood plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

Oxana Yu. Kravtsova, Oxana G. Gribakina, Gennady B. Kolyvanov, Alexander A. Litvin, Dmitry A. Dvoryaninov, Vladimir P. Zherdev, Vladimir L. Dorofeev  
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

A new dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity has been developed at the FSBSI "FRC of Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies". A specific, sensitive, fast and reproducible method for the determination of bis-(*N*-monosuccinyl-*L*-asparaginyl-*L*-asparagine hexamethylenediamide (GTS-301) in rat blood plasma using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detector has been developed and validated. The lower limit of quantification in blood plasma was 50 ng/ml. All calibration curves were described by a quadratic equation (correlation coefficient averaged 0.996,  $n = 3$ ) in the concentration range of 50–10000 ng/ml. The accuracy values for the quality control samples varied throughout the day from an average of 93.2 to 113.3 %. The precision ranged from 1.1 to 11.4 %. During the validation period, the accuracy values averaged 101.1–108.8 % and accuracy — 5.4–7.3 %. For the calibration standards, the values of the validation parameters were also within acceptable values (accuracy — 92.2–106.8 %, accuracy — 0.1–11.5 %). The results of the dilution study of experimental blood plasma samples with intact biomaterial in 10- and 100-fold lie within the acceptable values of 85–115 %. It has been established that GTS-301 is stable in the biological material at ambient temperature for short-term storage (3 hours), exposure to a thermostatically controlled autosampler (5 °C) during an analytical experiment (up to 20 hours), and prolonged storage at –50 °C (for 4 weeks), and also if subjected to several freezing/thawing cycles (3 cycles). Thus, the above-mentioned characteristics of the developed



technique make it suitable for use in preclinical pharmacokinetic studies. The pharmacokinetics of GTS-301 in rat blood plasma after a single intraperitoneal injection at a dose of 150 mg/kg was described.

**Keywords:** GTS-301; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS); blood plasma; rats; validation

### For citations:

Kravtsova OYu, Gribakina OG, Kolyvanov GB, Litvin AA, Dvoryaninov DA, Zherdev VP, Dorofeev VL. Quantification of a dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity in rat blood plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):47–56. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-47-56>. EDN: ZQXRFQ

**Received:** 01.08.2025. **Revision received:** 05.09.2025. **Accepted:** 28.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

На основе структуры экспонированного участка 4-й петли нейротрофина-3 создан его димерный дипептидный миметик, гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (ГТС-301). Новое соединение сходно с полноразмерным нейротрофином и активировало рецепторы TrkC и TrkB. У ГТС-301 выявлена нейропротекторная активность в экспериментах на клетках гиппокампа мыши HT-22 в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности в концентрациях  $10^{-12}$  и  $10^{-8}$  М соответственно и антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания на мышах при 7-дневном внутрибрюшинном введении в дозах 10–40 мг/кг [1].

*Цель настоящего исследования* — разработка и валидация методики количественного определения ГТС-301 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Методику валидировали по следующим параметрам: специфичность (селективность), чувствительность, линейность, прецизионность (точность), правильность, воспроизводимость и стабильность [3–7]. Это первая методика количественного определения ГТС-301 в биоматериале с масс-спектрометрическим детектированием, которая может быть применена для фармакокинетических исследований.

## Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали: фармацевтическую субстанцию ГТС-301— гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (М. в. = 772,77 а.е.м.), серия 150424-1, синтезированную в лаборатории пептидных регуляторов Отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано ранее [2], а также следующие реактивы — ацетонитрил («J.T. Baker», США), вода деионизованная («Pangreас», «Applichem», ФРГ), кислота муравьиная 85 % («Acros Organics», Россия).

## Оборудование и условия хроматографирования

В работе использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Ultimate 3000, Thermo Scientific, США), совмещённую с масс-спектрометрическим (МС) детектором — тип тройной квадруполь (TSQ Altis, Thermo Scientific, США). В составе ВЭЖХ: бинарный четырёхканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок, автосемплер, термостат автосемплера. Для регистрации и обработки данных использовали программное обеспечение Xcalibur v.4.2.28.14 (Thermo Scientific, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке «Luna C18(2), 3 мкм, 20×4.0 мм, 100A (Phenomenex, США, part#600779-1) (температура колонки — 40 °С) в режиме градиентного элюирования: 0,0 мин — 2 % Б; 1,0–2,2 мин — 98 % Б; 2,3–3,5 мин — 2 % Б. Скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из воды деионизованной (А) и ацетонитрила (Б), содержащих 0,1 % кислоты муравьиной (по объёму).

**Животные / Animals.** Животные (35 голов) содержались в лабораторном виварии при 20–22 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели постоянный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований. Рекомендация ЕАЭС №33 от 14.11.2023».

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014), касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

### Биоматериал и экспериментальные пробы

В настоящей методике биоматрицей для приготовления модельных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–200 г, полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл.). У интактных животных пробы крови отбирали

декапитацией в пробирки, содержащие 100 мкл 5 %  $K_2$ ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин, замораживали при  $-50^\circ\text{C}$  и хранили без добавления консервантов.

Изучение фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс проводилось после его однократного внутрибрюшинного введения (в/б) в дозе 150 мг/кг. Соединение ГТС-301 вводили животным в виде суспензии в полисорбате-80 с помощью шприца. Для определения ГТС-301 в плазме крови крыс образцы крови отбирали до введения (контроль) и через 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 и 6,0 ч после введения.

**Пробоподготовка.** Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови органическим растворителем. К 100 мкл образца плазмы крови добавляли 400 мкл охлаждённого ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали на встряхивателе Vortex в течение 5 с и в течение 15 мин на платформе горизонтального встряхивателя, затем 15 мин центрифугировали при 6500 об/мин. Отбирали надосадочный слой (200 мкл) и переносили в вials хроматографические, которые помещали в термостатируемый ( $5^\circ\text{C}$ ) автосемплер системы ВЭЖХ-МС. Объём вкола составлял 5 мкл.

#### **Калибровочные стандарты и образцы контроля качества**

Матричный раствор ГТС-301 (100 мкг/мл) готовили, растворяя навеску в ацетонитриле. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) были приготовлены путём серийных разведений на ацетонитриле. Все растворы до их использования хранили в холодильнике при  $5^\circ\text{C}$ . Растворы (модельные) для построения калибровочных кривых — калибровочные стандарты — ГТС-301 готовили (в дубликate, анализ однократно) внесением рабочего стандартного раствора, эквивалентного 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 нг/мл исследуемого вещества в интактную плазму крови крыс. Образцы КК (модельные растворы) с концентрациями 7,5; 75; 750 нг/мл также готовили (в трипликate, анализ дважды) на плазме крови.

**Валидационные характеристики.** Аналитическую методику количественного определения ГТС-301 валидировали по следующим показателям: *специфичность (селективность)*, *чувствительность*, *линейность*, *прецизионность (точность)*, *правильность*, *воспроизводимость* и *стабильность*. Для оценки влияния мешающих определению веществ и специфичности (селективности) анализировали экстракт плазмы крови, полученный от 6 разных интактных крыс. Для количественного определения целевого соединения строили калибровочные кривые методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (Y) площадь хроматографического пика ГТС-301 и по оси абсцисс (X) его концентрации в нг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) (*чувствительность*

методики) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обсчитать с приемлемой прецизионностью ( $\geq 20\%$ ) и правильностью (80–120 %).

*Прецизионность (точность)* определяли как относительное стандартное отклонение, RSD (%) по формуле:

$$\text{RSD, \%} = (\text{стандартное отклонение, SD} / \text{среднее, Mean}) \times 100$$

Прецизионность (точность) и правильность методики оценивали, анализируя образцы КК (7,5; 75; 750 нг/мл) в течение одного и трёх дней соответственно.

*Правильность* выражали в виде отклонения относительной погрешности, RE:

$$\text{Относительная погрешность, \%} = (\text{расчётная концентрация} \times 100) / \text{теоретическая концентрация}$$

$$\text{Отклонение правильности, RE \%} = |\text{относительная погрешность} - 100|$$

Отклонение (как в большую, так и меньшую сторону) расчётной концентрации от теоретической для калибровочных проб и образцов КК должно составлять  $\leq 15\%$  (отклонение правильности).

*Воспроизводимость* внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности.

Критерии приемлемости вышеперечисленных валидационных параметров оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, ЕМА и FDA [3–5, 7].

#### **Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки**

Расчёт степени извлечения ГТС-301 из плазмы крови проводили с использованием площадей хроматографических пиков, полученных при анализе проэкстрагированных спайков (*преэкстракционных*) и спайков, приготовленных на заранее проэкстрагированной интактной плазме (*постэкстракционных*). Концентрации ГТС-301 и в пре-, и в постэкстракционных спайках — 100, 1000 и 10000 нг/мл (приготовление в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

Для определения эффективности обработки (Process efficiency) сравнивали результаты анализа преэкстракционных модельных растворов (100, 1000 и 10000 нг/мл) с результатами анализа ацетонитрильных стандартных растворов ГТС-301 с такими же концентрациями (приготовление в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

Определение матричного эффекта (Matrix effect), то есть, выявление в какой степени влияет присутствие биологической матрицы на ионизацию целевого соединения, проводили с использованием площадей хроматографических пиков ацетонитрильных стандартных растворов ГТС-301 (100, 1000 и 10000 нг/мл) и площадей пиков, полученных при анализе постэкстракционных спайков, содержащих ГТС-301 в концентрациях 100, 1000 и 10000 нг/мл (приготовление

в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

### **Изучение разбавления/разведения проб интактным биоматериалом (фактор разведения)**

Возможность разбавления/разведения проб интактным биоматериалом изучали на спайках на плазме крови крыс с концентрацией заведомо выше самого верхнего уровня градуировочной зависимости ( $>10$  мкг/мл), а именно 100, 50 мкг/мл (в 100 раз) и 10, 5 мкг/мл (в 10 раз). Приготовленные спайки (в трёх повторностях для каждой концентрации) разводили интактным биоматериалом в 100 и 10 раз соответственно (фактор разведения = 100 и 10), анализировали (полученные после разведения концентрации теоретически уже укладывались в диапазон градуировочной зависимости:  $50 \div 10000$  нг ГТС-301/ мл плазмы крови) и рассчитывали отклонение расчётной концентрации от теоретической.

### **Стабильность**

Исследование стабильности ГТС-301, которое проводили на образцах КК (концентрации: 7,5; 75; 750 нг/мл, приготовлены в трёх повторностях, анализ каждого репликата однократно), включало:

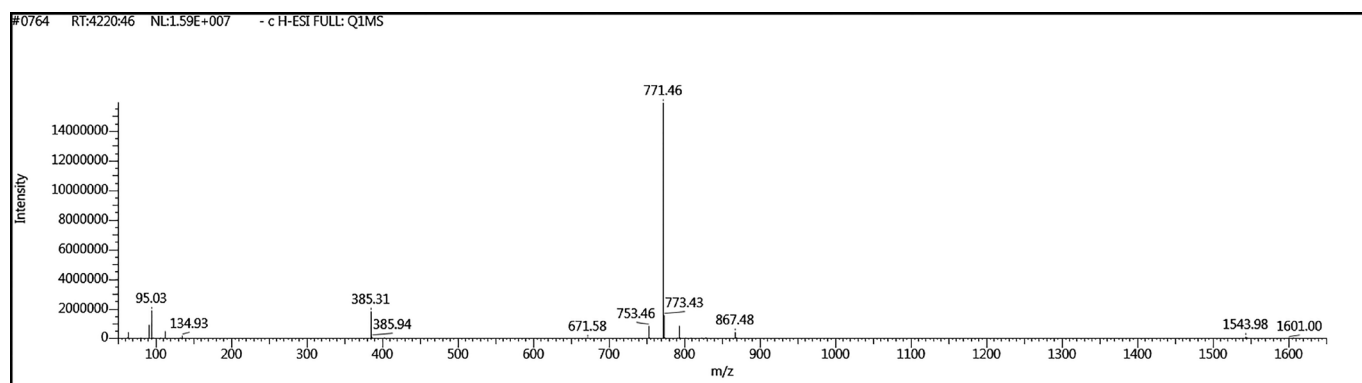
- а) изучение стабильности при многократном замораживании/размораживании (3 полных цикла замораживания/размораживания при  $-50$  °С, цикл=24 ч);
- б) изучение стабильности при кратковременном хранении (3 ч) модельных растворов при комнатной температуре ( $22-23$  °С);
- в) изучение стабильности при нахождении готовых проб в автосемплере (при  $5$  °С) в течение анализа и дольше, но не более 48 ч;
- г) изучение стабильности при долговременном хранении (30 дней) модельных растворов при  $-50$  °С.

## **Результаты и их обсуждение / Results and Discussion**

### **ВЭЖХ-МС условия**

При ионизации методом электроспрей (ESI) в результате сканирования в режиме регистрации полного ионного тока (режим Q1) был определён молекулярный ион ГТС-301 —  $771,3$  m/z, регистрация отрицательных ионов (рис. 1). При регистрации положительных ионов прекурсор-ион тестируемого соединения определялся значительно хуже. Сканирование в режиме MS/MS (регистрация отрицательных ионов) выявило основные пути фрагментации изучаемой молекулы и специфические дочерние ионы — режим Product Ion (Q3):  $537,2$  m/z,  $423,3$  m/z (рис. 2). Анализ в режиме SRM (Q1/Q3) (Selected Reaction Monitoring) позволил подобрать оптимальные настройки прибора для фрагментации молекулы ГТС-301. Регистрацию масс-спектров ГТС-301 проводили в SRM-режиме по переходу  $771,3/537,2$  m/z. Напряжение на капилляре составило 2500 В, температура испарителя  $350$  °С, температура капилляра переноса ионов составила  $350$  °С; энергия фрагментации в коллизионной ячейке 32 В. Параметры вспомогательных газов-распылителей задавались управляющей программой по умолчанию для потока 1 мл/мин.

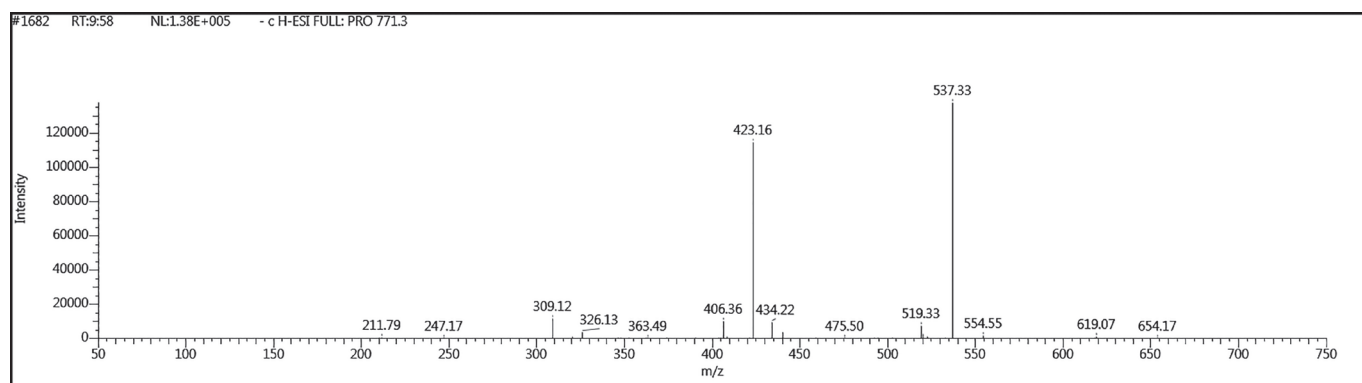
Используемая в работе колонка обеспечила отличную форму пика целевого аналита, эффективность разделения, приемлемую линейность и воспроизводимость на фоне эндогенных соединений. Оптимизацию состава подвижной фазы проводили, исходя из селективности пика аналита и его времени удерживания. В описанных выше условиях хроматографирования время удерживания ГТС-301 составило  $0,71 \pm 0,01$  мин. На рис. 3 представлена хромато-масс-спектрограмма интактной плазмы крови крысы, а на рис. 4 — плазмы



**Рис. 1.** Масс-спектр (режим Q1, суммарный ионный ток) ГТС-301 (стандартный раствор в 1 % ДМСО/0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле/0,1 % муравьиной кислоты в воде (об/об), концентрация — 20 мкг/мл) при ионизации методом электроспрей: регистрация отрицательных ионов. Прекурсор ион,  $[M-H]^-$  —  $771,3$  m/z

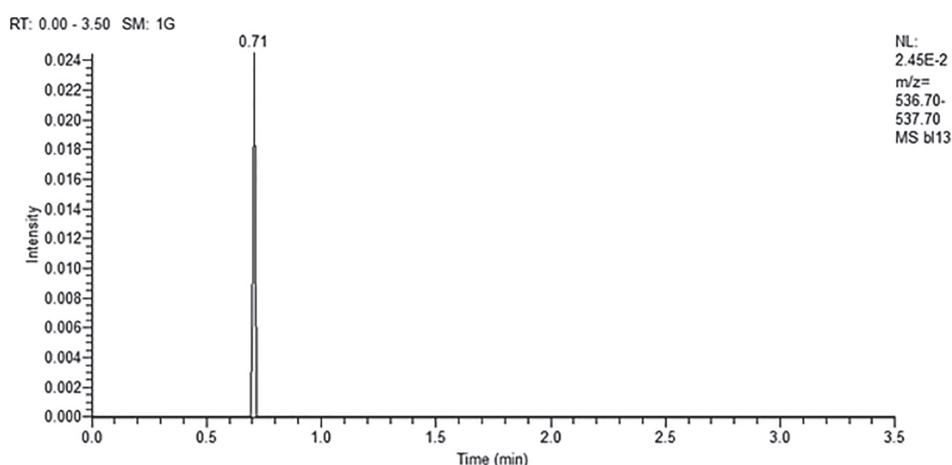
**Fig. 1.** Mass spectrum (Q1 mode, total ion current) of GTS-301 (standard solution in 1 % DMSO/0.1 % formic acid in acetonitrile/0.1 % formic acid in water (v/v), concentration — 20 µg/ml) in electrospray ionization: registration of negative ions. Ion precursor,  $[M-H]^-$  —  $771.3$  m/z





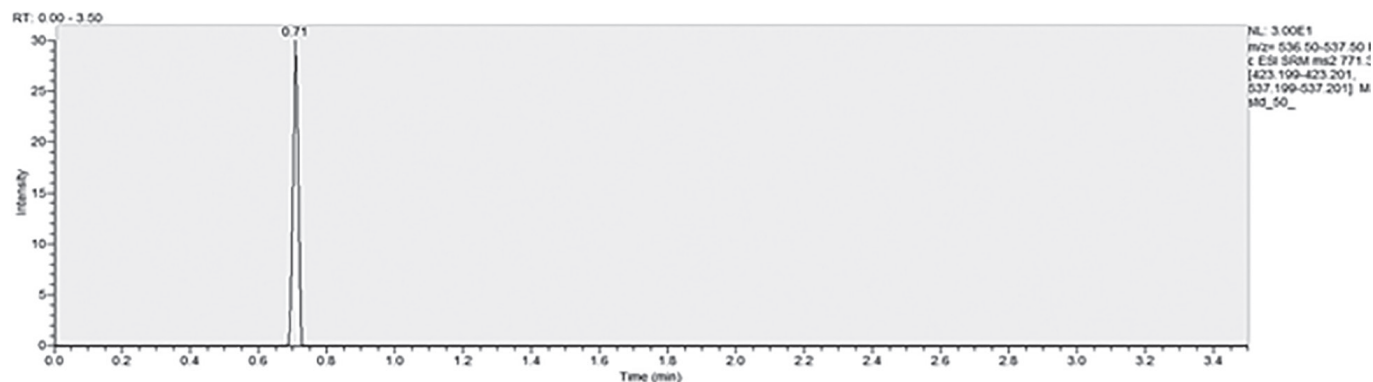
**Рис. 2.** Масс-спектр (режим Product Ion, MS/MS) ГТС-301 (стандартный раствор в 1 % ДМСО/0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле/0,1 % муравьиной кислоты в воде (по объёму), концентрация — 20 мкг/мл) при ионизации методом электроспрей: регистрация отрицательных ионов. Ион-продукты: 537,2 m/z и 423,3 m/z

**Fig. 2.** Mass spectrum (Product Ion mode, MS/MS) GTS-301 (standard solution in 1 % DMSO/0.1 % formic acid in acetonitrile/0.1 % formic acid in water (v/v), concentration — 20 µg/ml) in electrospray ionization: registration of negative ions. Ion products: 537.2 m/z and 423.3 m/z



**Рис. 3.** Хроматограмма интактной пробы плазмы (проба не содержит ГТС-301)

**Fig. 3.** Chromatogram of an intact plasma sample (the sample does not contain GTS-301)



**Рис. 4.** Хроматограмма спайка с концентрацией ГТС-301 50 нг/мл — нижний предел количественного определения разработанной методики (НПКО)

**Fig. 4.** Chromatogram of the 50 ng/ml spike GTS-301 (LLOQ)

крови крысы, содержащей 50 нг/мл ГТС-301 (НПКО). Стоит отметить, что на хромато-масс-спектрограмме интактной плазмы крови присутствует пик со временем удерживания 0,71 мин, интерферирующий с пиком целевого анализа, однако соотношение сигнал/шум составляет  $>10$ , что находится в допустимых пределах относительно НПКО.

#### Пробоподготовка

Выбор метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы основывался на его простоте, низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной и жидкостно-жидкостной экстракциями и достаточной эффективности. В качестве осаждающего агента использовали: этиловый, метиловый спирты и ацетонитрил. Ацетонитрил проявил себя как наиболее эффективный и доступный агент для осаждения белков при экстракции ГТС-301 (степень извлечения в среднем составила  $109,8 \pm 11,3 \%$ ).

#### Валидационные характеристики

##### Специфичность (селективность)

В результате изучения специфичности (селективности) методики (анализ 6 интактных (холостых) проб плазмы и 6 спайков с концентрацией ГТС-301 50 нг/мл) показано, что компоненты биологического материала по времени удерживания совпадают с пиком целевого соединения. Однако интенсивность пика коэкстрактивных веществ на три порядка меньше пика ГТС-301. Поэтому при расчёте концентраций площадью пика биоматрицы можно пренебречь. Типичные хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО ГТС-301 представлены на рис. 3 и 4.

##### Количественное определение целевого соединения.

##### Линейность методики

В результате анализа градуировочных проб в каждый из дней валидации (3 дня), приготовленных в дубликаты, для ГТС-301 выявлена квадратичная зависимость ( $y = ax^2 + bx + c$ ) (исключая холостые пробы) в диапазоне концентраций  $50 \div 10000$  нг/мл. Характеристики полученных градуировочных зависимостей представлены в табл. 1.

##### Чувствительность, нижний предел количественного определения (НПКО) методики

При построении градуировочных зависимостей установлен НПКО применяемой методики в плазме крови крысы для ГТС-301 — 50 нг/мл при соотношении сигнал/шум  $>10$  (анализ 6 спайков). На хроматограмме (см. рис. 4) видно, что пик ГТС-301 симметричный, отвечает распределению Гаусса, без признаков размывания и раздвоения.

##### Прецизионность, правильность и воспроизводимость

Проведён анализ образцов КК ГТС-301, и рассчитаны метрологические параметры валидации, представленные в табл. 2.

Для образцов КК правильность, демонстрирующая насколько сильно расчётное (найденное) значение концентрации отличается от истинного, варьировалась в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %, то есть, отклонение составило  $\leq 15 \%$ . Точность, определяющая воспроизводимость измерений, колебалась в диапазоне 1,1–11,4 % [4, 5, 7]. На протяжении валидационного периода в течение трёх дней значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 %, а точности — 5,4–7,3 %. Прецизионность и правильность, рассчитанная для результатов анализа проб НПКО и калибровочных стандартов, также отвечала критериям приемлемости [4, 5, 7]. В целом можно заключить, что применяемая методика количественного определения ГТС-301 в плазме крови крысы методом ВЭЖХ-МС демонстрирует высокую точность и воспроизводимость в пределах тестируемого диапазона концентраций целевого соединения  $50 \div 10000$  нг соединения/мл плазмы крови.

##### Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки

Результаты определения эффекта матрицы [7] позволяют заключить, что присутствие компонентов биоматрицы практически не влияет на ионизацию ГТС-301 (в среднем этот параметр составил  $106,4 \pm 2,5 \%$ ). Степень извлечения достигала в среднем  $109,8 \pm 11,3 \%$ , а эффективность обработки —  $103,0 \pm 8,3 \%$ . Таким

Характеристики градуировочных зависимостей для ГТС-301

Таблица 1

Table 1

Parameters of calibration relationships for GTS-301

День валидации	Градуировочная зависимость вида $y = ax^2 + bx + c$			Коэффициент корреляции ( $r^2$ )	Фактор взвешивания	Диапазон	Количество уровней
	$a$ ( $\cdot 10^{-5}$ )	$b$	$c$				
1	0,18	0,52	12,35	0,9969	$1/x$	0,05–10 мкг/мл	7
2	1,64	0,47	–17,87	0,9922	$1/x^2$		7
3	1,15	0,56	–3,44	0,9974	$1/x$		8

Примечания:  $y$  — площадь хроматографического пика (counts) ГТС-301;  $x$  — концентрация (нг/мл) ГТС-301.

Notes:  $y$  is the area of the chromatographic peak (counts) of GTS-301;  $x$  is the concentration (ng/ml) of GTS-301.

Таблица 2

Прецизионность, правильность и воспроизводимость ГТС-301 в плазме крови крыс

Table 2

Precision, accuracy, and reproducibility of GTS-301 in rat blood plasma

Теоретическая концентрация, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами			
	Расчётная концентрация (среднее), нг/мл; $n =$ , RSD %, RE %			$n$	Расчётная концентрация (среднее), нг/мл	RSD %	RE %
	1-й день	2-й день	3-й день				
75	85,0 6; 2,5; 113,3	83,3 6; 1,7; 111,0	76,6 6; 11,4; 102,1	18	81,60	5,4	108,8
750	781,1 6; 6,4; 106,8	794,5 6; 5,7; 105,9	698,6 6; 6,4; 93,2	15	758,07	6,8	101,1
7500	7430,5 6; 1,1; 99,1	7450,8 6; 2,0; 99,3	8427,7 6; 1,8; 112,4	18	7769,65	7,3	103,6

образом, при осаждении белков плазмы ацетонитрилом (как метода пробоподготовки) достигается достаточная степень извлечения ГТС-301 из плазмы крови крысы.

#### Изучение разбавления/разведения проб интактным биоматериалом (фактор разведения)

Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом свидетельствуют, что величины отклонений расчётной концентрации от теоретической для всех концентрационных уровней (5, 10 и 50, 100 мкг/мл) лежат в пределах допустимых значений 85–115 %. Данный факт указывает на возможность/приемлемость разведения проб интактным биоматериалом в 10 и 100 раз соответственно.

#### Стабильность

Стабильность ГТС-301 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор целевого соединения в ацетонитриле был стабилен при  $-24^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток. В результате изучения стабильности ГТС-301 при многократном замораживании (при  $-50^{\circ}\text{C}$ ), а именно после трёх полных циклов замораживания/размораживания выявлено, что содержание анализируемого соединения в модельных растворах на плазме не снижалось (табл. 3). Данные, полученные в ходе исследования стабильности ГТС-301 при разных сроках и температурных условиях хранения (кратковременная стабильность в течение 3 ч при комнатной температуре, в течение 24 ч при нахождении в термостатируемом автосемплере ( $5^{\circ}\text{C}$ ), долговременная стабильность при хранении в течение 4 недель (при  $-50^{\circ}\text{C}$ )) демонстрируют устойчивость целевого соединения к распаду во времени при его нахождении в биологическом материале.

Разработанная методика количественного определения ГТС-301 в плазме крови крыс была апроби-

Таблица 3

Стабильность ГТС-301 в плазме крови крыс ( $n = 3$ )

Table 3

Stability of GTS-301 in rat blood plasma ( $n = 3$ )

Условия хранения	Номинальная концентрация, нг/мл	Расчётная концентрация (среднее), нг/мл	Стабильность (среднее), %
а	75	81,27	108,3
	750	742,3	99,0
	7500	7534,0	100,5
б	75	84,03	112,1
	750	788,83	105,2
	7500	7474,03	99,7
в	75	70,53	94,0
	750	796,73	106,2
	7500	7563,43	100,8
г	75	71,0	94,7
	750	733,0	97,7
	7500	7390,0	98,5

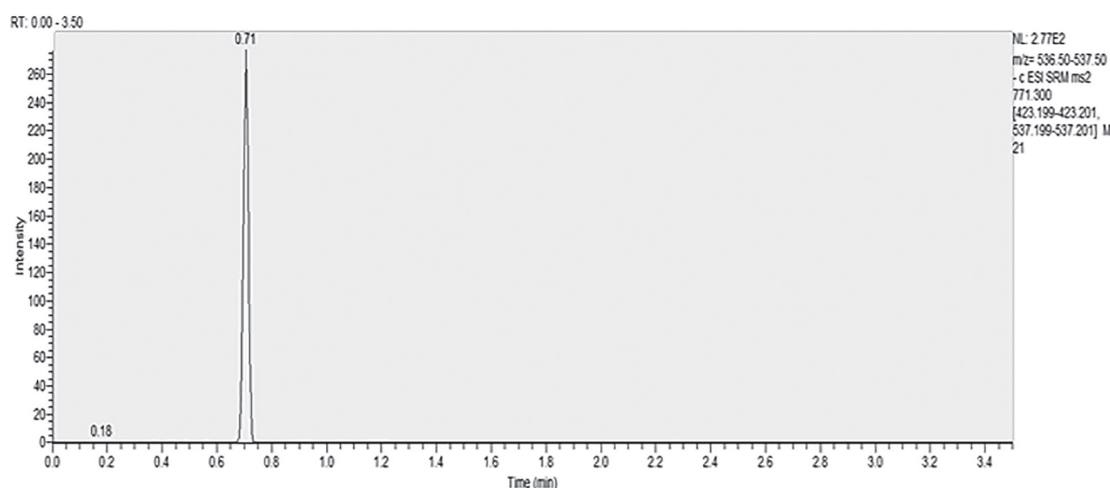
рована при изучении его фармакокинетики после его однократного внутрибрюшинного (в/б) введения.

На рис. 5 представлена типичная хроматограмма плазмы крови крысы через 4 ч после однократного в/б введения ГТС-301 в дозе 150 мг/кг.

Усреднённый фармакокинетический профиль ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного в/б введения представлен на рис. 6. Поскольку на каждую временную точку использовали 5 животных, результирующая кривая была построена по усреднённым концентрациям.

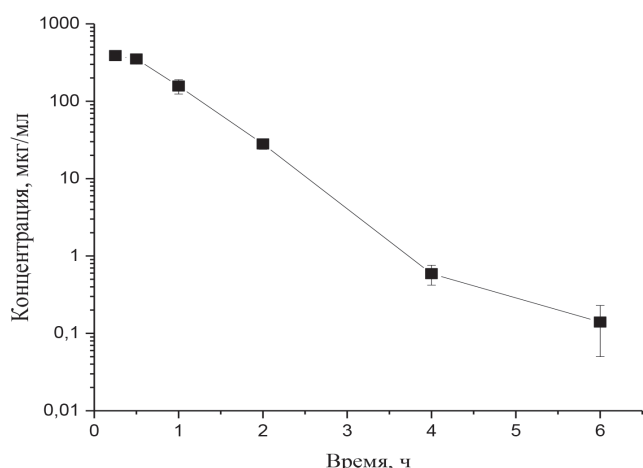
Установлено, что максимальная концентрация ГТС-301 (388,21 мкг/мл) достигается уже через 15 мин после введения, а период полувыведения составляет около полчаса.





**Рис. 5.** Хроматограмма плазмы крови крысы через 4 ч после однократного внутрибрюшинного введения ГТС-301 в дозе 150 мг/кг (концентрация ГТС-301 составляет 640 нг/мл плазмы крови)

**Fig. 5.** Chromatogram of rat blood plasma after 4 h a single intraperitoneal administration 150 mg/kg dose of GTS-301 (The concentration of GTS-301 is 640 ng/ml of blood plasma)



**Рис. 6.** Фармакокинетический профиль ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного введения (доза 150 мг/кг) фармацевтической субстанции ( $n = 5$ ;  $\bar{x} \pm SD$ ) в полулогарифмических координатах: на оси ординат —  $\lg$  концентрации ГТС-301

**Fig. 6.** Semi-logarithmic pharmacokinetic profile of GTS-301 in rat blood plasma after single intraperitoneal substance administration (dose 150 mg/kg) ( $n = 5$ ;  $\bar{x} \pm SD$ ): on the ordinate axis —  $\lg$  concentrations of GTS-301

### Закключение/Conclusion

На основании полученных данных можно констатировать, что разработана и валидирована селективная, чувствительная и воспроизводимая ВЭЖХ-МС методика количественного определения димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью — ГТС-301 в биологическом материале,

которая может быть применена в исследованиях фармакокинетики. Для извлечения ГТС-301 из биоматериала и осаждения белков плазмы крови использовали ацетонитрил, степень извлечения достигала в среднем  $109,8 \pm 11,3$  %. НПКО ГТС-301 в плазме крови крысы составил 50 нг/мл при соотношении сигнал/шум  $>10$ . Все градуировочные графики для ГТС-301, полученные в ходе валидационного периода, имели квадратичную зависимость (уравнение вида  $y = ax^2 + bx + c$ , коэффициент корреляции в среднем 0,996,  $n = 3$ ) в диапазоне концентраций 50–10000 нг ГТС-301/мл плазмы. Валидация разработанной методики включала в себя определение правильности (Ассигура), демонстрирующей насколько сильно расчётное (обнаруженное) значение концентрации отличается от истинного, и точности (Precision), определяющей воспроизводимость измерений. Значения правильности для образцов контроля качества варьировались в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %, таким образом, отклонение Ассигура не превышало 15 %. Точность для ГТС-301 варьировалась в диапазоне 1,1–11,4 %. На протяжении валидационного периода значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 %, а точности 5,4–7,3 %. Для градуировочных стандартов величины валидационных параметров также были в пределах допустимых значений (Ассигура — 92,2–106,8 % и Precision — 0,1–11,5 %). Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом (величины отклонений расчётной концентрации от теоретической для всех концентрационных уровней (5, 10 и 50, 100 мкг/мл) лежат в пределах допустимых значений (85–115 %) и указывают на возможность/приемлемость разведения проб интактным биомате-

риалом в 10 и 100 раз соответственно. Изучение стабильности ГТС-301 выявило, что соединение устойчиво в биологическом материале при комнатной температуре при кратковременном хранении (3 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (5 °C) в течение аналитического эксперимента (до 20 ч), при длительном хранении при –50 °C (в течение 4 недель), а также, если подвергается нескольким циклам

замораживания/размораживания (3 цикла).

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её релевантной для фармакокинетических исследований. Данная методика апробирована при изучении фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг.

## 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

**Кравцова Оксана Юрьевна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [kravtsova\\_ou@academpharm.ru](mailto:kravtsova_ou@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>  
РИНЦ SPIN-код: 1733-2330

**Oksana Yu. Kravtsova** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Pharmacokinetics Laboratory, Federal Research Center of Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [kravtsova\\_ou@academpharm.ru](mailto:kravtsova_ou@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>  
RSCI SPIN code: 1733-2330

**Грибакина Оксана Геннадьевна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [gribakina\\_og@academpharm.ru](mailto:gribakina_og@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>  
РИНЦ SPIN-код: 6266-8161

**Oxana G. Gribakina** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Scientist of the Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [gribakina\\_og@academpharm.ru](mailto:gribakina_og@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>  
RSCI SPIN code: 6266-8161

**Колыванов Геннадий Борисович** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [kolyvanov\\_gb@academpharm.ru](mailto:kolyvanov_gb@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>  
РИНЦ SPIN-код: 2538-8639

**Gennady B. Kolyvanov** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [kolyvanov\\_gb@academpharm.ru](mailto:kolyvanov_gb@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>  
RSCI SPIN code: 2538-8639

**Литвин Александр Алексеевич** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: litvin\_aa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

РИНЦ SPIN-код: 6193-5770

**Alexander A. Litvin** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author**

e-mail: litvin\_aa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

RSCI SPIN code: 6193-5770

**Дворянинов Дмитрий Александрович** — м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

e-mail: dvoryaninov\_da@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-0663-1741>

РИНЦ SPIN-код: 4126-9549

**Dmitry A. Dvoryaninov** — Junior Research Scientist of the Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: dvoryaninov\_da@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-0663-1741>

RSCI SPIN code: 4126-9549

**Жердев Владимир Павлович** — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

e-mail: zherdev\_vp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

РИНЦ SPIN-код: 2213-9592

**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

e-mail: zherdev\_vp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

RSCI SPIN code: 2213-9592

**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/0009-0004-3584-3742>

## Список литературы / References

1. Гудашева Т.А., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., и др. Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства. Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2022;505(1):303-309. [Gudasheva TA, Sazonova NM, Tarasiuk FV, et al. The first dipeptide mimetic of neurotrophin-3: design and pharmacological properties. *Reports Russ. Acad. Sci. Life Sci.* 2022;505(1):303-309. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738922040059. EDN: HYVEYB
2. Патент РФ RU 2800369C9/05.04.2022. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. и др. Димерные дипептидные миметики нейротрофина-3. [Patent RUS RU 2800369C9/05.04.2022. Seredenin SB, Gudasheva TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of neutriphine-3. (In Russ.)].
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. Мионов А.Н. (ред.), Гриф и Ко, Москва. 2013. [Guidelines for the Examination of Medicines. Tom 1. Ed by Mironov AN, Moscow, Grif I Ko, 2013. (In Russ.)]. ISBN: 978-8125-1858-5.

4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 №85. [Guide to the Expertise of Medicinal Products. Volume I, Rules for Conducting Bioequivalence Studies of Medicinal Products within the Eurasian Economic Union, Council of the Eurasian Economic Commission, Decision No. 85 of November 3, 2016. (In Russ.)].
5. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use, London, 2011.
6. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003 Jul 1;75(13):3019-30. doi: 10.1021/ac020361s.
7. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2018.





# Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность белка-транспортёра BCRP *in vitro*

Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»  
Минздрава России, Рязань, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Белок резистентности рака молочной железы (BCRP) является одним из основных клинически значимых белков-транспортёров, играющих важную роль в фармакокинетике лекарственных препаратов. Для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий на уровне данного транспортёра рекомендовано тестировать лекарственные препараты на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP.

**Цель исследования.** Сравнительная оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) на активность белка-транспортёра BCRP в условиях *in vitro* с использованием в качестве субстрата сульфасалазина.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено *in vitro* на клетках линии Caco-2, которые культивировали в трансвелл-системе. В качестве субстрата BCRP использовали сульфасалазин. ЭМГПС применяли в диапазоне концентраций 0,1–500 мкМ. Как препарат сравнения использовали классический ингибитор BCRP — кверцетин. Концентрацию сульфасалазина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

**Результаты.** В ходе исследования было показано, что ЭМГПС ингибировал активность BCRP в диапазоне концентраций 50–500 мкМ. По ингибирующей активности тестируемый препарат уступал препарату сравнения кверцетину —  $IC_{50}$  кверцетина составила 0,2 мкМ,  $IC_{50}$  ЭМГПС — 37,5 мкМ. Для изучения клинической значимости ингибирующей способности ЭМГПС рассчитывалось отношение  $C_{max}$  ЭМГПС /  $IC_{50}$  (прогнозирует системное ингибирование BCRP в печени, почках, гистогематических барьерах) и отношение доза ЭМГПС / 250 мл /  $IC_{50}$  (прогнозирует ингибирование BCRP в кишечнике). Было показано, что ЭМГПС может клинически значимо ингибировать BCRP в кишечнике.

**Заключение.** Таким образом, ЭМГПС является ингибитором BCRP в условиях *in vitro*. Для подтверждения значимости полученных результатов для развития межлекарственных взаимодействий необходимо проведение клинических исследований.

**Ключевые слова:** этилметилгидроксипиридина сукцинат; BCRP; Caco-2; сульфасалазин; кверцетин

## Для цитирования:

Поветко М. И., Мыльников П. Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность белка-транспортёра BCRP *in vitro*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):57–64. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-57-64>. EDN: PQRGYO

**Поступила:** 18.08.2025. **В доработанном виде:** 18.09.2025. **Принята к печати:** 27.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## Evaluation of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the activity of the BCRP transporter protein *in vitro*

Mariya I. Povetko, Pavel Yu. Mylnikov, Aleksey V. Shchulkin, Elena N. Yakusheva  
Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

## Abstract

**Relevance.** Breast cancer resistance protein (BCRP) is one of the main clinically significant transporter proteins that play an important role in the pharmacokinetics of drugs. To predict the development of drug interactions at the level of this transporter, it is recommended to test drugs for belonging to substrates and BCRP inhibitors.

**Objective.** Comparative assessment of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS) on the activity of the BCRP transporter protein under *in vitro* conditions using sulfasalazine as a substrate.

**Materials and methods.** The study was performed *in vitro* on Caco-2 cells that were cultured in a transwell-system. Sulfasalazine was used as a BCRP substrate. EMHPS was used in the concentration range of 0.1 — 500  $\mu$ M. A classic BCRP inhibitor, quercetin, was used as a comparison drug. The concentration of sulfasalazine in the transport medium was determined by HPLC-MS/MS.

**Results.** During the study, it was shown that EMHPS inhibited BCRP activity in the concentration range of 50–500  $\mu$ M. In terms of inhibitory activity, the tested drug was inferior to the comparison drug quercetin — the  $IC_{50}$  of quercetin was 0.2  $\mu$ M, the  $IC_{50}$  of EMHPS was 37.5  $\mu$ M. To study the clinical significance of the inhibitory ability of EMHPS, the ratio  $C_{max}$  of EMHPS/ $IC_{50}$  (predicts systemic inhibition of BCRP in the liver, kidneys, and histohematic barriers) and the ratio dose of EMHPS / 250 ml /  $IC_{50}$  (predicts inhibition of BCRP in the intestine) were calculated. It has been shown that EMHPS can clinically significantly inhibit BCRP in the intestine.

**Conclusion.** Thus, EMHPS is an inhibitor of BCRP *in vitro*. To confirm the significance of the obtained results for the development of drug-drug interactions, it is necessary to conduct clinical studies.

**Keywords:** ethylmethylhydroxypyridine succinate; BCRP; Caco-2; sulfasalazine; quercetin

## For citations:

Povetko MI, Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Evaluation of the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the activity of the BCRP transporter protein *in vitro*. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):57–64. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-57-64>. EDN: PQRGYO

**Received:** 18.08.2025. **Revision received:** 18.09.2025. **Accepted:** 27.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

Значительную роль в эффективности фармакотерапии играют транспортные системы организма, способные регулировать уровень эндо- и экзогенных веществ в различных тканях и органах. Среди них, благодаря широкой субстратной специфичности, выделяются переносчики суперсемейства АТФ-связывающих кассетных (АТР-binding cassette) транспортёров (АВС-транспортёров), к которым относят, например, гликопротеин Р (Pgp, ABCB1), BCRP, белок множественной лекарственной устойчивости (MRP) и т. д. [1].

BCRP (human breast cancer resistance protein — белок резистентности рака молочной железы) (ABCG2, MXR; ABCP) — АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортёр, физиологически экспрессирующийся в эндотелиальных клетках различных гистогематических барьеров (ГЭБ, плацентарный и т. д.), эпителиальных клетках кишечника и почечных канальцев, в молочных железах, желчных канальцах и в различных прогениторных и стволовых клетках [2]. В перечисленных тканях данный транспортёр участвует в ключевых фармакокинетических процессах — абсорбции, распределении и выведении эндо- и ксенобиотиков, являющихся его субстратами, а в опухолевых клетках способствует формированию их резистентности к химиотерапии [3, 4].

В настоящее время BCRP признан одним из важнейших белков-транспортёров, способных существенно влиять на биодоступность, а соответственно, и активность широкого спектра лекарственных препаратов [4, 5].

Именно поэтому, FDA и другие международные агентства рекомендует тестировать лекарственные препараты в опытах *in vitro* и *in vivo* на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белков-транспортёров, в том числе и BCRP, что может повысить безопасность и эффективность используемой терапии, а также предсказуемость межлекарственных взаимодействий [6, 7].

В Российской Федерации подобные исследования малочисленны и стали проводиться лишь в последнее время [8].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) — оригинальный российский препарат, широко применяющийся в неврологии для лечения сосудистых и дегенеративных заболеваний головного мозга [9].

Ранее нами было показано, что ЭМГПС не является субстратом BCRP [10], однако была обнаружена возможная ингибирующая активность данного препарата [11].

В рамках настоящего исследования оценивалась ширина ингибирующего действия ЭМГПС и сравнение его влияния на BCRP с классическим ингибитором транспортёра — кверцетином.

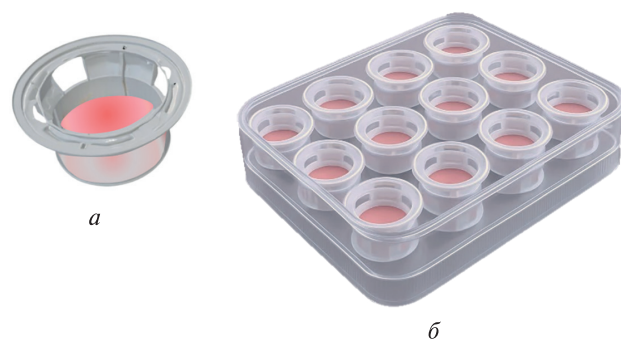
**Цель исследования / Objective** сравнительная оценка влияния ЭМГПС на активность белка-транспортёра BCRP в условиях *in vitro* с использованием в качестве субстрата сульфасалазина.

## Материалы и методы / Materials and methods

**Клеточная линия.** Исследование осуществляли *in vitro* на клеточной линии Сасо-2 — иммortalized клетки колоректальной аденокарциномы человека, которые являются классической моделью для изучения абсорбции лекарственных веществ, а также оценки их принадлежности к субстратам и ингибиторам белков-транспортёров Pgp и BCRP. Клеточная линия была закуплена в ФГБУН «Институт цитологии» РАН (Санкт-Петербург) и получена из ATCC (American Type Culture Collection, США). Эксперименты выполнялись в лаборатории клеточных технологий (подразделение ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России).

**Условия культивирования.** Клеточная линия культивировалась в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора с использованием питательной Дульбекко модифицированной среды Игла (DMEM), с содержанием глюкозы (4500 мг/л), L-глутамин (4 мМ) (ООО «ПанЭко», Россия), 15 % эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия) соответственно. Режим культивирования: 5 % уровень CO<sub>2</sub>, 37 °С.

**Транспортные эксперименты.** При достижении конfluence 90 % на фласке клетки высаживали на полупроницаемую мембрану внутренней (апикальной, рис. 1, а) камеры трансвелл-системы (рис. 1, б) (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning Incorporated, США), окружённой внешней (базолатеральной/базальной) камерой. Подобная система имитирует просвет кишечника (апикальная камера) и кровь/мезентериальную лимфу желудочно-кишечного тракта (базолатеральная камера), что позволяет использовать её как модель для изучения переноса соединений [12].



**Рис. 1.** Внешний вид апикальной камеры (а) и планшета для культивирования клеток (трансвелл-система) (б), наполненных питательной средой

**Fig. 1.** The appearance of the apical chamber (a) and the cell culture plate (transwell system) (b) filled with nutrient medium

Источник: рисунки выполнены авторами (Поветко М.И. и соавт., 2025) с помощью искусственного интеллекта Freepik AI (Freepik Company S.L., Испания).

Source: the drawings were made by the authors (Povetko MI et al., 2025) using artificial intelligence Freepik AI (Freepik Company S.L., Spain).

Клетки культивировали в течение 21 суток до образования монослоя и спонтанной дифференцировки в энтероцитоподобные клетки кишечника человека. Условия культивирования были те же.

Образование монослоя в трансвелл-системе оценивали при помощи измерения трансэпителиального сопротивления (TEER) с помощью вольтметра Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше 500 мОм·см².

Для проведения транспортных экспериментов питательную среду в камерах заменяли на транспортную среду с температурой 37 °С, состоящую из раствора Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 25 % раствора HEPES (Gibco, Англия) и 1 % раствора ДМСО (ООО «ПанЭко», Россия) [13].

Активность BCRP оценивали по проникновению его субстрата сульфасалазина («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкМ из апикальной камеры в базальную (*a*–*b* транспорт за счёт пассивной диффузии против работы транспортера) и в обратном направлении (*b*–*a* транспорт за счёт пассивной диффузии и работы транспортера).

Для оценки проницаемости сульфасалазина через монослой клеток из апикальной в базолатеральную камеру (*a*–*b* транспорт) и в обратном направлении (*b*–*a* транспорт) рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости  $P_{app}$ .

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0},$$

где  $P_{app}$  — коэффициент кажущейся проницаемости;  
 $dQ/dt$  — изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации;

$A$  — площадь полупроницаемой мембраны в апикальной камере трансвелл-системы;

$C_0$  — начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Дополнительно проводили расчёт эффлюксного коэффициента (ER) — отношения  $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ , характеризующего участие белков-транспортеров, в частности BCRP, в переносе соединений.

$$ER = \frac{P_{app} b-a}{P_{app} a-b}.$$

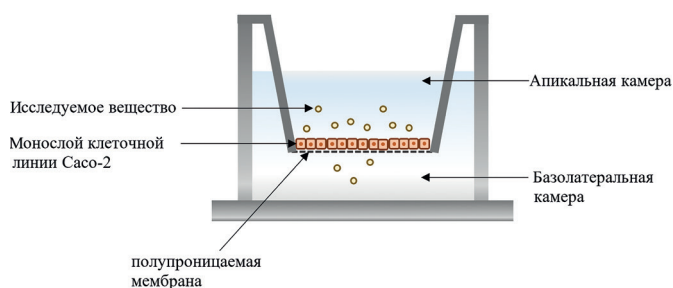
Отношение коэффициентов (эффлюксный коэффициент), превышающее «2», свидетельствует об активном переносе соединения с участием белка-транспортера, а значение от 0,5 до 2 показывает отсутствие подобного транспорта [14].

Влияние ЭМГПС на активность BCRP оценивали при его добавлении в обе камеры трансвелл-системы вне зависимости от направления транспорта сульфасалазина в концентрациях 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ с 30 мин преинкубацией.

В качестве препарата сравнения использовали кверцетин — классический ингибитор BCRP («Sigma-Aldrich», США) в эквивалентных концентрациях.

Транспортные эксперименты выполняли в два этапа по три повтора. В первом добавление сульфасалазина производили в апикальную камеру (*a*–*b* транспорт), которая служила камерой-донором. Забор проб в объёме 100 мкл осуществляли на 1-, 2-, 3-й час эксперимента из камеры-реципиента — противоположная (базальная) камера, заполненная транспортной средой без добавления субстрата.

Во время второго этапа добавляли сульфасалазин в базальную камеру (камера-донор), а забор проб проводили из апикальной (камера-реципиент) через временные промежутки аналогичные первому этапу (*b*–*a* транспорт) (рис. 2).



**Рис. 2.** Схема *a*–*b* транспорта исследуемого вещества, внесённого в апикальную камеру, через полупроницаемую мембрану

**Fig. 2.** Scheme *a*–*b* of transport of the test substance introduced into the apical chamber through a semipermeable membrane

Источник: Поветко М.И. и соавт., 2025.

Source: Povetko MI et al., 2025.

Полученные пробы помещали в микроцентрифужные пробирки типа «Эпандорф», замораживали в морозильной камере при –80 °С и хранили до проведения хроматографического анализа.

После проведения эксперимента трансвелл-системы очищались от исследуемых растворов путём их полного удаления из лунок с дальнейшим многократным смывом остатков веществ раствором Хэнкса. После удаления веществ и раствора Хэнкса в камеры добавлялась питательная среда для поддержания обычных условий культивирования клеток и их повторного использования. Утилизация использованного клеточного материала осуществлялась в соответствии с СОП, предусмотренных в лаборатории клеточных технологий.

**Хроматографический анализ.** Анализ полученных образцов проводили методом ВЭЖХ-МС/МС при помощи ВЭЖХ «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённого автосемплером, и масс-спектрометра TSQ Fortis («ThermoFisher», США) с применением валидированной методики количественного определения сульфасалазина [15].



Реактивы, использовавшиеся для хроматографического анализа: вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», Испания), метанол для HPLC («Merck», Германия).

Пробоподготовка заключалась в добавлении к 100 мкл пробы смеси метанола с валсартаном (внутренний стандарт) в концентрации 100 нг/мл в количестве 300 мкл для извлечения сульфасалазина. Далее пробы перемешивали 5 мин на встряхивателе (Vortex (Heidolph, Германия)), разделение фаз проводили в течение 10 мин при 21000 g и 4 °C на центрифуге Avanti® JXN-30 (Beckman Coulter Inc., США). Супернатант переносили в вials и помещали в автосемплер.

**Условия хроматографического анализа** были следующими: колонка Luna Omega 3μm Polar C18 50×2.1, 3 μm, предколонка аналогичного типа — C18 3 мкм. Температура разделения — 35 °C, скорость потока — 0,3 мл/мин. Применяли градиентный режим элюирования, соотношение 0,1 % раствора муравьиной кислоты и метанола было следующим: 0,0 мин — 60 % / 40 %; 0,3 мин — 15 % / 85 %; 4 мин — 1 % / 99 %; 6 мин — 60 % / 40 %; 8 мин — 60 % / 40 %.

Ионизацию молекул проводили в режиме негативной ионизации. Метод детектирования — тандемная масс-спектрометрия. Режим детектирования: вспомогательный газ — азот, оболочечный газ (Sheath gas) — 50 отн. ед. (Arb), усиливающий газ (Aux gas) — 10 отн. ед. (Arb), продувочный газ (Sweep gas) — 1 отн. ед. (Arb). Температура ион-транспортирующего капилляра — 300 °C, температура испарителя — 350 °C. В качестве фрагментирующего газа использовали аргон с потоком 2 mTorr (мТорр), фрагментация в источнике составила 10 В. Объем инъекции — 10 мкл, время анализа — 8 минут.

Валидацию методики проводили по параметрам: селективность, предел количественного определения,

линейность, правильность, прецизионность, эффект переноса, стабильность, матричный эффект и эффект извлечения.

### Статистический анализ / Statistical analysis

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программ офисного пакета «Microsoft Office XP» и программы GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, Inc., США). Для определения статистически значимых различий в группах использовали дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение групп с контролем выполняли методом Даннета. Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (M±SD). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Значения концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии на основе трёхпараметрической логистической функции.

### Результаты / Results

Коэффициент кажущейся проницаемости сульфасалазина  $Papp\ b-a$  в контроле (без добавления тестируемых веществ) составил  $11,8 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-6}$  см/сек,  $Papp\ a-b$  —  $0,346 \times 10^{-6} \pm 0,181 \times 10^{-6}$  см/сек, а их отношение  $37,36 \pm 10,13$ . Отношение  $Papp\ b-a / Papp\ a-b$  более, чем в 10 раз превышает значение «2», что свидетельствует об асимметрии транспорта сульфасалазина, который реализуется за счёт изучаемого белка-транспортёра BCRP.

Полученные результаты оценки влияния ЭМГПС на активность BCRP представлены в таблице 1.

ЭМГПС во всех протестированных концентрациях не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости

Таблица 1

Влияние ЭМГПС в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеточной линии Caco-2 (M±SD, см/сек)

Table 1

Effect of EMHPS in various concentrations on the transport of sulfasalazine through the monolayer of the Caco-2 cell line (M±SD, cm/sec)

Сульфасалазин (контроль)			
Концентрация сульфасалазина	$Papp\ b-a$	$Papp\ a-b$	$Papp\ b-a / Papp\ a-b$
10 мкМ	$11,8 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-6}$	$0,346 \times 10^{-6} \pm 0,181 \times 10^{-6}$	$37,36 \pm 10,13$
Сульфасалазин 10 мкМ + ЭМГПС в различных концентрациях			
Концентрация ЭМГПС	$Papp\ b-a$	$Papp\ a-b$	$Papp\ b-a / Papp\ a-b$
0,1 мкМ	$15,7 \times 10^{-6} \pm 0,19 \times 10^{-6}$	$0,487 \times 10^{-6} \pm 0,210 \times 10^{-6}$	$37,04 \pm 17,07$
1 мкМ	$12,3 \times 10^{-6} \pm 0,42 \times 10^{-6}$	$0,440 \times 10^{-6} \pm 0,093 \times 10^{-6}$	$28,77 \pm 6,21$
10 мкМ	$7,70 \times 10^{-6} \pm 0,71 \times 10^{-6}$	$0,331 \times 10^{-6} \pm 0,245 \times 10^{-6}$	$31,54 \pm 17,61$
50 мкМ	$7,29 \times 10^{-6} \pm 8,07 \times 10^{-6}$	$0,454 \times 10^{-6} \pm 0,288 \times 10^{-6}$	$13,21 \pm 7,04^*$
100 мкМ	$5,36 \times 10^{-6} \pm 0,71 \times 10^{-6}$	$1,73 \times 10^{-6} \pm 1,89 \times 10^{-6}$	$7,06 \pm 5,99^*$
250 мкМ	$3,57 \times 10^{-6} \pm 0,19 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-6} \pm 1,64 \times 10^{-6}$	$2,94 \pm 2,70^{**}$
500 мкМ	$5,65 \times 10^{-6} \pm 6,82 \times 10^{-6}$	$3,42 \times 10^{-6} \pm 1,36 \times 10^{-6}$	$2,27 \pm 2,90^{**}$

Примечания: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  — достоверные различия с показателями контроля.  
Notes: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  — significant differences with the control indicators.

сульфасалазина  $P_{app} b-a$  и повышал коэффициент кажущейся проницаемости  $P_{app} a-b$  только в концентрации 500 мкМ в 9,88 раза ( $p < 0,05$ ).

При этом ЭМГПС снижал отношение  $P_{app} b-a/P_{app} a-b$  в концентрации 50 мкМ на 64,6 % ( $p = 0,05$ ), 100 мкМ — на 81,1 % ( $p < 0,05$ ), 250 мкМ — на 92,1 % ( $p < 0,01$ ), 500 мкМ — на 93,9 % ( $p < 0,01$ ).

$IC_{50}$  для ЭМГПС составила 37,5 мкМ (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС ингибирует активность BCRP.

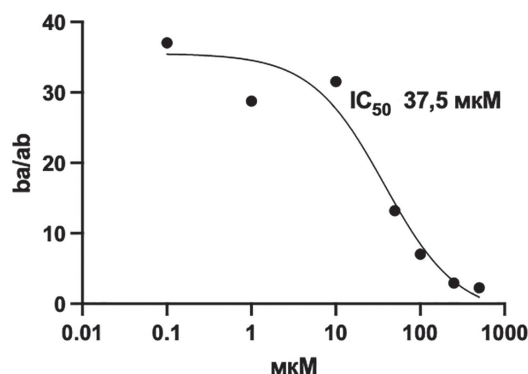


Рис. 3. Концентрация полумаксимального ингибирования этилметилгидроксипиридина сукцината  
Fig. 3. The semi-maximal inhibitory concentration of ethylmethylhydroxypyridine succinate

При оценке влияния кверцетина на активность BCRP были получены следующие результаты (табл. 2).

Кверцетин в концентрациях 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости сульфасалазина  $P_{app} b-a$  на 70,5 %

( $p < 0,001$ ), 62,2 % ( $p < 0,01$ ), 60,8 % ( $p < 0,01$ ), 88,2 % ( $p < 0,0001$ ), 92,5 % ( $p < 0,0001$ ) и 68,7 % ( $p < 0,001$ ) соответственно.

В концентрации 500 мкМ вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости сульфасалазина  $P_{app} a-b$  на 400,0 % ( $p < 0,05$ ).

Во всех применяемых концентрациях 0,1–500 мкМ классический ингибитор BCRP снижал отношение  $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ : в концентрации 0,1 мкМ на 30,1 % ( $p < 0,05$ ), 1 мкМ — на 78,3 % ( $p < 0,0001$ ), 10 мкМ — на 87,4 % ( $p < 0,0001$ ), 50 мкМ — на 89,1 % ( $p < 0,0001$ ), 100 мкМ — на 92,3 % ( $p < 0,0001$ ), 250 мкМ — на 92,9 % ( $p < 0,0001$ ), 500 мкМ — на 94,2 % ( $p < 0,0001$ ). Полученные результаты подтверждают ингибирующую активность кверцетина в отношении BCRP.

$IC_{50}$  для кверцетина составила 0,2 мкМ (рис. 4).

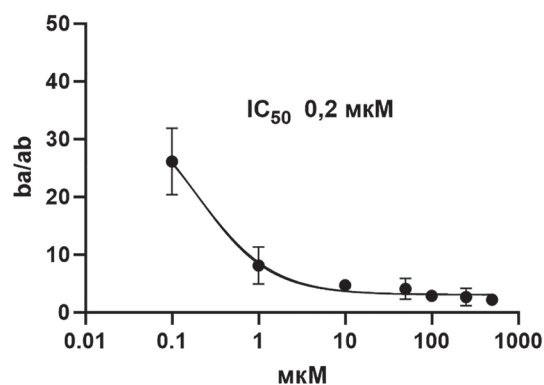


Рис. 4. Концентрация полумаксимального ингибирования кверцетина  
Fig. 4. The semi-maximal inhibitory concentration of quercetin

Таблица 2

Влияние кверцетина в различных концентрациях на транспорт сульфасалазина через монослой клеточной линии Caco-2 ( $M \pm SD$ , см/сек)

Table 2

Effect of quercetin in various concentrations on the transport of sulfasalazine through the monolayer of the Caco-2 cell line ( $M \pm SD$ , cm/sec)

Сульфасалазин (контроль)			
Концентрация сульфасалазина	$P_{app} b-a$	$P_{app} a-b$	$P_{app} b-a/P_{app} a-b$
10 мкМ	$11,8 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-6}$	$0,346 \times 10^{-6} \pm 0,181 \times 10^{-6}$	$37,36 \pm 10,13$
Сульфасалазин 10 мкМ + кверцетин в различных концентрациях			
Концентрация кверцетина	$P_{app} b-a$	$P_{app} a-b$	$P_{app} b-a/P_{app} a-b$
0,1 мкМ	$8,71 \times 10^{-6} \pm 0,22 \times 10^{-6}$	$0,344 \times 10^{-6} \pm 0,070 \times 10^{-6}$	$26,11 \pm 5,76^*$
1 мкМ	$3,48 \times 10^{-6} \pm 0,44 \times 10^{-6}***$	$0,473 \times 10^{-6} \pm 0,179 \times 10^{-6}$	$8,11 \pm 3,19****$
10 мкМ	$4,46 \times 10^{-6} \pm 1,58 \times 10^{-6}**$	$0,932 \times 10^{-6} \pm 0,168 \times 10^{-6}$	$4,69 \pm 0,83****$
50 мкМ	$4,62 \times 10^{-6} \pm 3,08 \times 10^{-6}**$	$1,08 \times 10^{-6} \pm 0,68 \times 10^{-6}$	$4,06 \pm 1,80****$
100 мкМ	$1,39 \times 10^{-6} \pm 0,098 \times 10^{-6}****$	$0,491 \times 10^{-6} \pm 0,074 \times 10^{-6}$	$2,87 \pm 0,43****$
250 мкМ	$0,888 \times 10^{-6} \pm 0,517 \times 10^{-6}****$	$0,342 \times 10^{-6} \pm 0,041 \times 10^{-6}$	$2,64 \pm 1,50****$
500 мкМ	$3,69 \times 10^{-6} \pm 2,28 \times 10^{-6}***$	$1,73 \times 10^{-6} \pm 1,13 \times 10^{-6}*$	$2,18 \pm 0,11****$

Примечания: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  — достоверные различия с показателями контроля.

Notes: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  — significant differences with the control indicators.

Для изучения клинической значимости ингибирующей способности ЭМГПС применялся подход, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA, 2020) и Международным консорциумом переносчиков (2010).

Рассчитывалось отношение  $C_{\max}$  ЭМГПС/ $IC_{50}$  (прогнозирует системное ингибирование BCRP в печени, почках, гистогематических барьерах) и отношение доза ЭМГПС / 250 мг /  $IC_{50}$  (прогнозирует ингибирование BCRP в кишечнике). Если полученные значения больше или равно 0,1 и 10 соответственно, то ингибирование BCRP ЭМГПС является клинически значимым.

Согласно проведённым ранее исследованиям  $C_{\max}$  для ЭМГПС составляет 0,39 мкМ [16]. Расчёт показывает, что соотношение  $C_{\max}/IC_{50}$  для ЭМГПС составляет 0,01, соответственно системное ингибирование BCRP ЭМГПС не является клинически значимым.

Максимальная разовая доза ЭМГПС составляет 250 мг, соответственно отношение доза ЭМГПС / 250 мг /  $IC_{50}$  составляет 1 мг / мг / 37,5 мкМ = 3922 мкМ / 37,5 мкМ = 104,6. Полученное значение больше 10, что свидетельствует о том, что ингибирование BCRP под действием ЭМГПС в желудочно-кишечном тракте является клинически значимым.

### Обсуждение / Discussion

ЭМГПС — оригинальный российский препарат с доказанной эффективностью в лечении заболеваний, сопровождающихся ишемическими нарушениями и развитием окислительного стресса [17]. Его использование в комплексной терапии широкого спектра заболеваний обуславливает вероятность его участия в развитии межлекарственных взаимодействий [18]. С целью прогнозирования их развития и повышения эффективности и безопасности фармакотерапии ЭМГПС целесообразно изучение принадлежности данного препарата к возможным субстратам и модуляторам активности ряда важнейших белков-транспортёров.

Так, для ЭМГПС были изучены субстратные свойства и ингибирующая активность в отношении гликопротеина Р (ABCB1) и OATP1B1/B3. Исследования показали, что препарат не является субстратом для данных белков, а как ингибитор проявляет клиническую значимость только для гликопротеина Р в желудочно-кишечном тракте [8, 13, 19].

В отношении BCRP было доказано, что ЭМГПС не является субстратом данного транспортёра [10, 11].

В ходе выполнения настоящего исследования было установлено, что ЭМГПС в широком диапазоне концентрации (50–500 мкМ) проявляет ингибирующую активность в отношении BCRP,  $IC_{50}$  препарата составляет 37,5 мкМ.

Полученные результаты подтверждают и дополняют имеющиеся сведения об ингибирующей способности соединений дигидропиридинового ряда, к которым относится и ЭМГПС. Показана схожесть субстратов и ингибиторов эффлюксных белков-транспортёров гликопротеина Р и BCRP, несмотря на их структурные различия [20].

Предполагаемый механизм ингибирования для азотсодержащих гетероциклов в отношении BCRP не был изучен, вероятно для них характерно аллостерическое, либо конкурентное ингибирование [21]. Так как ЭМГПС не является субстратом белка, в данном случае более вероятен аллостерический механизм ингибирования.

При оценке клинической значимости ингибирующего действия ЭМГПС было установлено, что ЭМГПС может подавлять активность BCRP в желудочно-кишечном тракте. Соответственно, ЭМГПС может изменять концентрацию и активность субстратов белка-транспортёра (например, сульфасалазина, метотрексата, митоксантрона, топотекана и др. [5, 22]) при совместном применении.

В сравнении с классическим ингибитором белка-транспортёра BCRP кверцетином активность ЭМГПС значительно ниже ( $IC_{50}$  кверцетина 0,2 мкМ против 37,5 мкМ для ЭМГПС). Однако ингибирующая способность исследуемого соединения показала клиническую значимость факта подавления активности BCRP в желудочно-кишечном тракте, что свидетельствует о необходимости выполнения клинических исследований его влияния при пероральном приёме и совместном применении с субстратами транспортёра.

### Заключение / Conclusion

Результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к ингибиторам белка-транспортёра BCRP. Несмотря на то, что ингибирующая способность ЭМГПС ( $IC_{50}$  = 37,5 мкМ) меньше, чем у препарата сравнения, классического ингибитора — кверцетина ( $IC_{50}$  = 0,2 мкМ), установлена клиническая значимость ингибирования транспортёра на уровне желудочно-кишечного тракта под действием изучаемого препарата, которая однако требует подтверждения в клинических исследованиях.

### Благодарности / Acknowledgments

Авторы выражают признательность центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) и кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России за предоставление лабораторного оборудования и площадки для проведения исследования.



## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

### Участие авторов

*Поветко М. И.* — культивирование клеток линии Сасо-2, проведение транспортных экспериментов, пробоподготовка образцов, написание статьи; *Мыльников П. Ю.* — разработка и валидация методики количественного определения, работа с хроматографом; *Щулькин А. В.* — анализ полученных результатов, редактирование статьи; *Якушева Е. Н.* — общее руководство работой, редактирование статьи; все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов.

### Финансирование

Бюджет ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

### Authors' participation

*Povetko MI* — cultivation of Caco-2 cells, conducting transport experiments, sample preparation, writing an article; *Mylnikov PYu* — development and validation of a quantitative determination technique, working with a chromatograph; *Shchulkin AV* — analysis of the results obtained, editing the article; *Yakusheva EN* — general guidance, editing the article; all the authors participated in the discussion of the results obtained.

### Funding

Budget of the Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of Russia.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Поветко Мария Ивановна** — ассистент кафедры фармацевтической технологии, очный аспирант кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация  
**Автор ответственный за переписку**  
e-mail: masha-povetko@mail.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>  
РИНЦ SPIN-код: 2307-4064

**Мыльников Павел Юрьевич** — к. б. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация  
e-mail: dukeviperlr@gmail.com  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>  
РИНЦ SPIN-код: 8503-3082

**Щулькин Алексей Владимирович** — д. м. н., доцент, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация  
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>  
РИНЦ SPIN-код: 2754-1702

**Якушева Елена Николаевна** — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация  
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>  
РИНЦ SPIN-код: 2865-3080

**Mariya I. Povetko** — Assistant at the Department of Pharmaceutical Technology, full-time postgraduate Student at the Department of Pharmacology of the Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation  
**Corresponding autor**  
e-mail: masha-povetko@mail.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1273-520X>  
RSCI SPIN code: 2307-4064

**Pavel Yu. Mylnikov** — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Pharmacology Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation  
e-mail: dukeviperlr@gmail.com  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>  
RSCI SPIN code: 8503-3082

**Aleksey V. Shchulkin** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation  
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>  
RSCI SPIN code: 2754-1702

**Elena N. Yakusheva** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation  
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>  
RSCI SPIN code: 2865-3080

## Список литературы / References

1. Mohammad IS, He W, Yin L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomed Pharmacother*. 2018 Apr;100:335-348. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.038.
2. Sarkadi B, Homolya L, Hegedűs T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants — from structure to pathology. *FEBS Lett*. 2020 Dec;594(23):4012-4034. doi: 10.1002/1873-3468.13947.
3. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(5):1216-1223. doi: 10.1006/bbrc.2001.4267.
4. Попова Н.М., Шулькин А.В., Транова Ю.С., и др. Белок резистентности рака молочной железы: структура, локализация, функции, значение для рациональной фармакотерапии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2024;32(2):305-314. [Popova NM, Shchul'kin AV, Tranova YuS, et al. Breast Cancer Resistance Protein: Structure, Localization, Functions, Significance for Rational Pharmacotherapy. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2024;32(2):305-314. (In Russ.)]. doi: 10.17816/PAVLOV384999.
5. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *AAPS J*. 2015 Jan;17(1):65-82. doi: 10.1208/s12248-014-9668-6.
6. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. European Medicines Agency Guideline on the Investigation of Drug Interactions European Medicines Agency Guideline Committee for Human Medicinal Products (CHMP), (2012). Доступно по: <https://www.xenotech.com/wp-content/uploads/2020/07/2012-EMA-DDI-Guidance.pdf>. Ссылка активна на 18.09.2025
7. US Food and Drug Administration (FDA). *In vitro* drug interaction studies — cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. Draft Guidance Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Jan, (2020).
8. Якушева Е. Н., Шулькин А. В., Черных И. В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(5):19-23. [Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernykh IV. Assessment of the attribution of mexidol to P-glycoprotein substrates, inhibitors, or inducers. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;78(5):19-23. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2015-78-5-19-23.
9. Стаховская Л.В., Шамалов Н.А., Хасанова Д.Р., и др. Результаты рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования эффективности и безопасности мексидола при длительной последовательной терапии у пациентов в остром и раннем восстановительном периодах полшарного ишемического инсульта (ЭПИКА). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2017;117(3-2):55-65. [Stakhovskaya LV, Shamalov NA, Khasanova DR, et al. Results of a randomized double blind multicenter placebo-controlled, in parallel groups trial of the efficacy and safety of prolonged sequential therapy with mexidol in the acute and early recovery stages of hemispheric ischemic stroke (EPICA). *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017;117(3-2):55-65. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20171173255-65.
10. Шулькин А.В., Транова Ю.С., Абаленихина Ю.В., и др. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;10(206):63-69. [Shchul'kin AV, Tranova YuS, Abalenikhina YuV, et al. Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal substances. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2022;10(206):63-69. (In Russ.)]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69.
11. Транова Ю. Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*: Дис. ... канд. биол. наук. Рязань; 2023. [Tranova Ju. Razrabotka metodiki testirovaniya lekarstvennyh veshchestv na prinaladlezhnost' k substratam, ingibitoram i induktoram belka-transportera BCRP *in vitro*. [dissertation] Rjazan'; 2023. (In Russ.)]. Доступно по: [https://iemspb.ru/wp-content/uploads/2023/10/Tranova\\_textdiss.pdf](https://iemspb.ru/wp-content/uploads/2023/10/Tranova_textdiss.pdf). Ссылка активна на: 28.06.2025.
12. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005 Aug;1(2):175-85. doi: 10.1517/17425255.1.2.175.
13. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., и др. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-Р *in vitro*. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329-36. [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein *in vitro*. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329-36. (In Russ.)]. doi: 10.23888/HMJ20208329-336.
14. Shchulkin AV, Erokhina PD, Goncharenko AV, et al. Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Is an Inhibitor but Not a Substrate of ABCB1 and SLCO1B1. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Oct 27;16(11):1529. doi: 10.3390/ph16111529.
15. Поветко, М.И., Мыльников, П.Ю., Транова, Ю., и др. Разработка и валидация методики количественного определения сульфасалазина в плазме крови кроликов и среде культивирования клеток методом ВЭЖХ-МС/МС. *Химико-фармацевтический журнал*. 2025;59(3):45-49. [Povetko MI, Myl'nikov PYu, Tranova Yu, et al. Development and validation of a method for quantitative determination of sulfasalazine in rabbits blood plasma and cell culture medium by HPLC-MS/MS. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*. 2025;59(3):45-49. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2025-59-3-45-49. EDN: SXUOL.
16. Шулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики. *Фарматека*. 2016;s4-16:65-71. [Shchulkin AV. Mexidol: modern aspects of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Farmateka*. 2016;s4-16:65-71. (In Russ.)].
17. Федин А.И., Захаров В.В., Танащян М.М., и др. Результаты международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования оценки эффективности и безопасности последовательной терапии пациентов с хронической ишемией мозга препаратами Мексидол и Мексидол ФОРТЕ 250. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(11):7-16. [Fedin AI, Zaharov VV, Tanashyan MM, et al. Results of an international multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of sequential therapy with Mexidol and Mexidol FORTE 250 in patients with chronic brain ischemia (MEMO). *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2021;121(11):7-16. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20211211117.
18. Воронина Т.А., Иванова Е.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(4):115-124. [Voronina TA, Ivanova EA. Combined administration of mexidol with known medicines. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2019;119(4):115-124. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro2019119041115. EDN: ZSOSEH.
19. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., и др. Влияние оригинальных отечественных нейротропных препаратов на полипептиды, транспортирующие органические анионы OATP1B1 и OATP1B3. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;176(8):198-203. [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Myl'nikov PYu, et al. The effect of original Russian neurotropic drugs on organic anion transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176(8):198-203. (In Russ.)]. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-8-198-203. EDN: CVOVNV.
20. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. (Section A: Molecular, Structural, and Cellular Biology of Drug Transporters). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*. 2004 Feb;5(1):21-53. doi: 10.2174/1389200043489199.
21. Zhang Y, Gupta A, Wang H, et al. BCRP transports dipyrindamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res*. 2005 Dec;22(12):2023-34. doi: 10.1007/s10955-005-8384-4.
22. Safar Z, Kis E, Erdo F, et al. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Apr;15(4):313-328. doi: 10.1080/17425255.2019.1591373.



# Альтернативная модель *Danio rerio* для скрининговой оценки термо- и фригопротекторного действия фармакологических соединений

Ревякин А. О.

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»,  
Москва, Российская Федерация

## Аннотация

Внедрение принципов биоэтики в научные биомедицинские исследования заставляет искать и разрабатывать новые альтернативные модели, в том числе для скрининга потенциальных фармакологических соединений. Основная трудность при разработке альтернативных биомodelей заключается в создании состояния или патологии, максимально приближённых к человеческим как по механизму развития такого процесса, так и по ответу на фармакологическую коррекцию. Гидробионты, обладая сопоставимостью физиологических реакций с высшими животными, имеют, в том числе, схожие по строению и функционалу органы и ткани и очень большой потенциал для скрининговых исследований и экспериментальной фармакологии. Они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в экспериментальных исследованиях. В статье приведены результаты работы по созданию альтернативной модели на рыбах *Danio rerio* для оценки термо- и фригопротекторных свойств фармакологических соединений. Показана возможность моделирования на рыбах состояний гипо- и гипертермии в лабораторных условиях. Разработана балльная оценка состояния рыб. Определены критерии оценки гипо- и гипертермий. Проведена фармакологическая валидация созданной модели с референсными препаратами. Показана возможность использования данной модели для скринингового изучения термо- и фригопротекторной активности фармакологических соединений.

**Ключевые слова:** Данио рерио; альтернативная биомодель; фармакологическая активность; термопротекторы; фригопротекторы

## Для цитирования:

Ревякин А. О. Альтернативная модель *Danio rerio* для скрининговой оценки термо- и фригопротекторного действия фармакологических соединений. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):65–69. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-65-69>. EDN: MBCNTU

**Поступила:** 23.08.2025. **В доработанном виде:** 23.09.2025. **Принята к печати:** 27.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## Alternative model *Danio rerio* for screening evaluation of thermo- and frigoprotective action of pharmacological compounds

Artem O. Revyakin

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

## Abstract

The introduction of bioethical principles into scientific biomedical research necessitates the search for and development of new alternative models, including those for screening potential pharmacological compounds. The main difficulty in developing alternative biomodels is the creation of a condition or pathology as close as possible to human ones both in terms of the mechanism of development of such a process and in terms of the response to pharmacological correction. Hydrobionts, possessing physiological reactions comparable to higher animals, have, among other things, organs and tissues similar in structure and functionality and have very great potential for screening studies and experimental pharmacology. They satisfy modern ethical concepts and norms limiting the scope of use of higher animals in experimental research. The article presents the results of work on the creation of an alternative model of *Danio rerio* for assessing the thermo- and frigoprotective properties of pharmacological compounds. The possibility of modeling hypo- and hyperthermia states in fish under laboratory conditions is demonstrated. A scoring system for assessing the condition of fish has been developed. Criteria for assessing hypo- and hyperthermia are defined. Pharmacological validation of the developed model was conducted using reference drugs. The model's potential for screening the thermo- and frigoprotective activity of pharmacological compounds was demonstrated.

**Keywords:** *Danio rerio*; alternative biomodel; pharmacological activity; thermoprotectors; frigoprotectors

## For citations:

Revyakin AO. Alternative model *Danio rerio* for screening evaluation of thermo- and frigoprotective action of pharmacological compounds. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):65–69. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-65-69>. EDN: MBCNTU

**Received:** 23.08.2025. **Revision received:** 23.09.2025. **Accepted:** 27.09.2025. **Published:** 30.09.2025.



## Введение / Introduction

Важнейшим этапом первичной оценки потенциальных соединений и перспективных лекарственных средств является скрининг их фармакологической активности, от достоверного результата которого зависит дальнейшее рациональное распределение финансовых и трудовых ресурсов. Этот биологический этап на данный момент невозможен без участия живых организмов (био-моделей), на которых в соответствии с нормативами, в том числе биоэтическими, проводят исследования [1, 2].

Основными животными при этом являются млекопитающие — чаще всего лабораторные грызуны — мыши и крысы [3]. Однако биоэтические принципы предполагают постепенную замену млекопитающих в экспериментах (там, где это возможно) на альтернативных животных, стоящих на более низкой эволюционной ступени, но при сохранении достоверных данных.

Одними из таких альтернативных моделей могут быть гидробионты и некоторые беспозвоночные, представители которых обладают сопоставимостью физиологических реакций с высшими животными, имеют схожие по строению и функционалу органы и ткани и обладают специфическими свойствами, позволяющими расширить представления о спектре действия тестируемого фактора на биосистему. Они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в экспериментальных исследованиях. Вместе с тем они ограниченно представлены в качестве биологических моделей, но имеют очень большой потенциал для скрининговых исследований и экспериментальной фармакологии [4].

Одно из направлений фармакологии — разработка средств поддержки жизнедеятельности организма при экстремальных температурных воздействиях, приводящих как к общему перегреванию (состояние гипертермии), так и общему охлаждению организма (замерзание, гипотермия). Возникновение у человека неблагоприятных температурных состояний связано либо с воздействием климатогеографических факторов среды обитания (пустыни, тропические леса, Арктика, Антарктика), либо производственной деятельности (работа в жарких цехах, в изолирующем снаряжении, на акватории северных морей, в высокогорье), либо в результате аварий (пожары, кораблекрушения).

Для релевантных моделей общие температурные воздействия моделируются помещением животных или в воздушную, или в водную среду соответствующей температуры (+35...+40 °C для условий гипертермии, +5...+8 °C для воздушной гипотермии при условии повышенной влажности или периодического орошения шкурки животного и +10...+12 °C для иммерсионной гипотермии [5–7]. В качестве критериев оценки переносимости теплового или холодового воздействия обычно используются такие показатели, как длительность жизни на фоне воздействия, выживаемость на

фиксированные временные точки (например, 30 или 60 мин), динамика ректальной температуры, а также время предельного плавания с грузом 5 % в воде заданного температурного диапазона [8].

Целью данной работы являлось создание адекватной альтернативной модели для скрининговой оценки термо- и фригопротекторного действия фармакологических средств и её фармакологическая валидация.

Для гидробионтов существует только один способ формирования состояния гипо- и гипертермии — пребывание в воде с пониженной или повышенной температурой. Критерием уровня устойчивости при этом будет длительность пребывания до развития очевидных признаков холодового или теплового стресса, к которым относятся изменения поведения и двигательной активности.

В процессе эксперимента была разработана балльная шкала оценки состояния *Danio rerio*, учитывающая преимущественное положение рыбок в ёмкости для исследования, характер двигательной активности, координацию, позы, положение тела, а также частоту движения жаберных щелей (табл. 1). Максимальное количество баллов по предлагаемой шкале — 20.

Для разработки модели оценки уровня тепловой устойчивости *Danio rerio* была выполнена отдельная серия исследований, в которой рыбки помещались в воду с возрастающими или снижающимися значениями температуры при обычном режиме газообмена между воздухом и водой. Моделирование пониженных температур достигалось путём внесения кусочков льда, полученных путём предварительного замораживания отстоянной фильтрованной воды и равномерном распределении температуры с использованием погруженного аэратора. Достижение высоких температур обеспечивалось подогревом воды термоковриком для рептилий, установленным под ёмкостью, и аквариальным нагревателем. Равномерность температуры также обеспечивалась погружённым аэратором. Каждые 5 минут фиксировались особенности их двигательной активности и поведения, которые затем переводились в баллы в соответствии с данными табл. 1. Балльная динамика состояния *Danio rerio* представлена в табл. 2.

Наблюдение за поведением *Danio rerio* в воде с температурой 14–16 °C показало резкое снижение двигательной активности, придонное положение рыбок, движение жабр замедленно и неритмично. Расчётный индекс состояния (отношение общего суммарного балла оценки состояния к максимальному количеству баллов) резко снижен до 0,55, что отражает развитие выраженного холодового нарушения нервной деятельности и метаболизма в целом. Таким образом, критическими для рыбок в условиях гипотермии являются пребывание в течение 20 мин в воде с температурой 14–16 °C. Следовательно, признаком фригопротекторного действия лекарственных средств при использовании данной модели на *Danio rerio* бу-

Таблица 1

Балльная шкала оценки состояния *Danio rerio*

Table 1

*Danio rerio* condition score scale

Признак	Балл
<i>Положение в ёмкости (установке для исследований)</i>	
Преимущественно верховое	5
Преимущественно срединное	4
Преимущественно придонное	3
Частая смена придонного на верховое	2
Резкие кратные перемещения по вертикали	1
Рандомные резкие перемещения со сменой положения тела (боковое, вверх брюхом)	0
<i>Характер двигательной активности</i>	
Активные, движения равномерные по скорости	10
Активные, движения с хаотичной сменой направления	9
Активность пониженная, движения плавные, замедленные	8
Активность снижена, движения заторможенные	7
Ажитация, движения не равномерные, рывками, с нормальным положением тела	6
Ажитация, чередующаяся с зависанием, движения хаотичные с широким диапазоном положений	5
Изменение оси положения тела под углом 20° и более к горизонтали	
Активность низкая. Движения минимальные	4
Вертикальные метания. Рывки. Полная остановка	3
Нарушение координации, временные утраты позы	2
Агонические сокращения	1
Движения отсутствуют	0
<i>Движения жаберных крышек</i>	
Обычные, ритмичные	5
Ускоренные/замедленные	4
Учащение/замедление более чем в 3 раза	3
Неритмичные	2
Агональные	1
Отсутствуют	0
<b>Максимальный балл</b>	<b>20</b>

Таблица 2

Динамика балльного показателя состояния рыбок *Danio rerio* при их пребывании в среде с различной температурой  
(средние по группе,  $n = 10$ )

Table 2

Dynamics of the score indicator of the condition of *Danio rerio* fish when they stay in an environment with different temperatures  
(average for the group,  $n = 10$ )

Температура воды, °C	Длительность воздействия гипотермии (мин)					
	5	10	15	20	25	30
14	13	11	11	10	10	10
16	17	14	13	12	12	12
18	19	17	16	15	15	15
20	20	20	19	19	19	18
22	20	20	20	20	20	20
24	20	20	20	20	20	20
26	20	20	20	20	20	20
28	19	19	19	19	19	18
30	18	18	17	16	16	16
32	17	17	16	16	16	15
34	17	16	14	14	13	13
36	16	16	14	13	13	13

дуг улучшение их состояния по баллам комплексной оценки поведения и двигательной активности и увеличение длительности периода сохранения приемлемых для рыбок показателей поведенческой активности.

Данные таблицы 2 показывают, что температура воды в диапазоне 30–32 °С и длительность экспозиции 20 минут достаточно, чтобы зафиксировать у рыбок состояние теплового стресса (гипертермии), проявляющееся изменением преимущественного их положения в аквариуме, появления хаотичности в движениях, замедление, ускорение и нестабильность двигательной активности, учащение движений жаберных щелей. Индекс состояния для рыбок на этой точке был равен 0,80, т. е. состояние *Danio rerio* было хуже оптимального на 20 %. Эти показатели и были приняты за параметры модели.

Для фармакологической валидации модели были выбраны 2 препарата — фумаровая соль янтарного эфира диметиламиноэтанола (ФДМАЭС) и кортексин, для которых ранее были выявлены термо- и фригопротекторные эффекты [9, 10].

Исследуемые препараты растворяли в аквариумной воде до концентраций 250 мг/л (ФДМАЭС) и 25 мг/л (кортексин), что соответствует концентрации препарата в крови при применении средних терапевтических доз. В каждой исследуемой группе было по 10 рыбок. Результаты исследования термопротекторной активности этих соединений на *Danio rerio* представлены в табл. 3.

Представленные в таблице 3 данные показывают, что контрольная группа рыбок *Danio rerio* достигла

порогового значения поведенческих проявлений термостресса к 20-й минуте пребывания в условиях гипертермии, при более выраженном ухудшении состояния к 40-й минуте. Оба препарата отодвигали проявления у рыбок тепловых нарушений двигательной активности и поведения на 20–25 мин, что является статистически достоверным признаком термопротекторного действия ( $p = 8 \times 10^{-5}$ , метод точной вероятности Фишера).

Результаты исследования фригопротекторной активности этих соединений на *Danio rerio* представлены в табл. 4.

Оба исследуемых препарата характеризовались более высокими показателями поведенческой и двигательной активности рыбок в условиях гипотермии, что сопровождалось улучшением значений индекса состояния на 20-й минуте с 0,55 до 0,70 для ФДМАЭС и 0,85 для кортексина (отличия от контроля достоверны  $p = 4,6 \times 10^{-5}$ , метод точной вероятности Фишера). Различия между препаратами проявлялись на раннем временном диапазоне (преимущество было у кортексина), но в более поздние сроки разница в количественной оценке фригопротекторного действия сглаживалась и после 35-й минуты уже не определялась. Таким образом подтверждена адекватность предложенной модели *Danio rerio* для оценки термо- и фригопротекторов.

В результате эксперимента была разработана и валидирована альтернативная биомодель *Danio rerio*, подходящая для задач скринингового исследования фармакологических средств с предположительной фриго- и термопротекторной активностью.

Таблица 3

Термопротекторные эффекты ФДМАЭС и кортексина в отношении поведения аквариумных рыбок *Danio rerio* при их пребывании в воде с температурой 30–32 °С (баллы поведенческой и двигательной активности, средние по группе,  $n = 10$ )

Table 3

Thermoprotective effects of FDMAES and cortexin on the behavior of *Danio rerio* aquarium fish when they stay in water with a temperature of 30–32 °C (behavioral and motor activity scores, average for the group,  $n = 10$ )

Группа	Длительность экспозиции, мин								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Контроль	18	18	17	16	16	16	14	13	13
ФДМАЭС	20	20	19	19	19	19	17	17	16
Кортексин	20	20	20	20	19	19	19	17	17

Таблица 4

Фригопротекторные эффекты ФДМАЭС и кортексина в отношении поведения рыбок *Danio rerio* при их пребывании в воде с температурой 14–16 °С (баллы поведенческой и двигательной активности, средние по группе,  $n = 10$ )

Table 4

Frigoprotective effects of FDMAES and cortexin on the behavior of *Danio rerio* fish when they are kept in water at a temperature of 14–16 °C (behavioral and motor activity scores, average for the group,  $n = 10$ )

Группа	Длительность экспозиции, мин								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Контроль	14	13	12	11	11	11	11	10	10
ФДМАЭС	19	17	17	14	14	14	13	13	13
Кортексин	19	19	18	17	17	17	14	13	12



## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов..

### Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The author declares that there is no conflict of interest.

### Funding

The work was carried out without sponsorship.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Ревякин Артем Олегович** — к. б. н., доцент кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация  
**Автор ответственный за переписку**  
e-mail: ar\_info@mail.ru  
РИНЦ SPIN-код: 4922-3200

**Artem O. Revyakin** — APhD, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Chair of Animal Science, Timiryazev University, Moscow, Russian Federation  
**Corresponding autor**  
e-mail: ar\_info@mail.ru  
RSCI SPIN code: 4922-3200

## Список литературы / References

1. Васильев А.Н., Ниязов Р.Р., Гавришина Е.В., и др. Проблемы планирования и проведения доклинических исследований в Российской Федерации. *Ремедиум*. 2017;9:6-18. [Vasiliev AN, Niyazov RR, Gavrishina EV, Dranytsina MA, et al. Problems of planning and conduct of preclinical trials in the Russian Federation. *Remedium*. 2017;9:6-18. (In Russ.)]. doi: 10.21518/1561-5936-2017-9-6-18. EDN: ZOLGIP
2. Тюренков И.Н., Ломкина Е.М., Куркин Д.В., и др. Этические аспекты доклинических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(3):36-41. [Tyurenkov IN, Lomkina EM, Kurkin DV, et al. Ethical implications of preclinical studies. *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin*. 2015;(3):36-41. (In Russ.)]. EDN: UJJUVP
3. Макарова М.Н., Матичин А.А., Матичина А.А., Макаров В.Г. Принципы выбора животных для научных исследований. Сообщение 1. Выбор модельных организмов на основании филогенетических связей. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022;5(2):58-70. [Makarova MN, Matichin AA, Maticina AA, Makarov VG. Animal choice strategy for research. Report 1: animal choice based on phylogenetic relationships. *Laboratory Animals for Science*. 2022;5(2):58-70. (In Russ.)]. doi: 10.29296/2618723X-2022-02-07. EDN: SBSPNR
4. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., и др. Использование гидробионтов в качестве альтернативных биомodelей. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017;103(8):912-929. [Pronina GI, Koryagina NYu, Revyakin AO, et al. The use of hydrobionts as alternative biomodels. *Russian journal of physiology*. 2017;103(8):912-929. (In Russ.)]. EDN: ZCMNVL
5. Муравьев А.В. Влияние тепловой тренировки и препарата бемитил на адаптацию животных и человека к условиям высокой температуры внешней среды : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 03.00.16, 14.00.25 / НИИ военной медицины. Санкт-Петербург, 1998. 24 с. [Muravyov AV. The Effect of Thermal Training and the Preparation Bemithyl on the Adaptation of Animals and Humans to High-Temperature Environments: Abstract of a Dissertation for the Degree of Candidate of Medical Sciences: 03.00.16, 14.00.25 / Research Institute of Military Medicine. Saint Petersburg, 1998. (In Russ.)]. EDN: ZIYRKP

6. Новиков В.С. Дезадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция [Текст] : [монография] / В.С. Новиков, С.И. Сороко, Е.Б. Шустов. Санкт-Петербург: Политехника-принт, 2018. 547 с. [Novikov VS. Maladaptation states of a person under extreme influences and their correction [Text] : [monograph] / VS Novikov, SI Soroko, EB Shustov. St. Petersburg: Polytechnic Print, 2018. (In Russ.)]. ISBN 978-5-907050-19-8. EDN: XYPHID
7. Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В., Матвеев Е.Л. Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии. *Биомедицина*. 2017;(3):4-15. [Shustov EB, Kapanadze GD, Fokin YuV, Matveyenko EL. Methodical features of biomedical research of the influence of pharmacological agents on the resistance of the organism to acute general hypothermia. *Biomedicine*. 2017;(3):4-15. (In Russ.)]. EDN: ZHYWHT
8. Новиков В.С. Физиология экстремальных состояний / В.С. Новиков, В.М. Голянич, Е.Б. Шустов; Рос. акад. наук. Отд-ние физиологии. СПб. : Наука, 1998. 247 с. [Novikov VS. Physiology of Extreme States / VS Novikov, VM Golyanich, EB Shustov; RAS Department of Physiology. St. Petersburg: Nauka, 1998. (In Russ.)]. ISBN 5-02-026099-1. EDN: XSXQPI
9. Новиков В.С. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях / В.С. Новиков, Е.Б. Шустов, В.В. Горанчук; [Рос. акад. наук. Отд-ние физиологии]. СПб. : Наука, 1998. 542 с. [Novikov VS. Correction of functional states under extreme conditions / VS Novikov, EB Shustov, VV Goranchuk; [Russian. Academy of Sciences. Department of Physiology]. St. Petersburg : Nauka Publ., 1998. (In Russ.)]. ISBN 5-02-026124-6. EDN: XSXTDX
10. Ким А.Е., Шустов Е.Б. Влияние нового производного диметиламиноэтанола, бутандиовой и транс-бутендиовой кислот на переносимость гипоксии, гипертермии и гипотермии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2023;21(4):367-372. [Kim AE, Shustov EB. Influence of new dimethylaminoethanol derivatives, butanoic and trans-butenedioic acids, on the tolerability of hypoxia, hyperthermia, and hypothermia. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2023;21(4):367-372. (In Russ.)]. doi: 10.17816/RCF568686. EDN: IFPXF



Журнал непрерывного профессионального образования «Пациентоориентированная медицина и фармация» создан для развития и внедрения в клиническую практику технологий персонализированной медицины, включая «омиксные» биомаркеры, выбора методов лечения, а также клеточную и генную терапию; улучшения результатов лечения отдельных пациентов в реальной клинической практике с учётом целей, предпочтений, ценностей пациента, а также имеющихся экономических ресурсов, как на уровне пациента, так и на уровне системы здравоохранения.

Сайт журнала: [www.patient-oriented.ru](http://www.patient-oriented.ru)



Журнал «Качественная клиническая практика» публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: [www.clinvest.ru](http://www.clinvest.ru)



Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.

Сайт журнала: [www.pharmacokinetica.ru](http://www.pharmacokinetica.ru)



Журнал «Фармакогенетика и фармакогеномика» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинико-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев, а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины.

Сайт журнала: [www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru](http://www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru)



Журнал «Антибиотики и химиотерапия» освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: [www.antibiotics-chemotherapy.ru](http://www.antibiotics-chemotherapy.ru)



Журнал «Реальная клиническая практика: данные и доказательства» ставит своей целью предоставить средство для распространения и форум для обсуждения информации о том, как лекарственные препараты действуют в рутинной медицинской практике. Рубрики журнала включают как оригинальные исследования, так и обзоры использования реальных данных для оценки исходов лечения, принятия обоснованных медицинских решений в отношении лекарственных препаратов, медицинских изделий и других вмешательств.

Сайт журнала: [www.myrwd.ru](http://www.myrwd.ru)



