

Хоанг Тхи Нгок Куинь

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИНКСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ПО ДАННЫМ МОДЕЛИ
SPIROTOX**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института.

Научный руководитель:

Колдина Алёна Михайловна, доцент, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Официальные оппоненты:

Джавахань Марина Аркадьевна, доцент, доктор фармацевтических наук, заместитель директора по разработке и внедрению научно-образовательного института фармации им. К.М. Лакина ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Шорманов Владимир Камбулатович, профессор, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

Защита диссертации состоится «26» июня 2025 г. в __ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» мая 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021
кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила цинк в перечень четырёх приоритетных микроэлементов и витаминов, наряду с витамином А, железом и йодом для профилактики недоедания (*WHO Preventing and controlling micronutrient deficiencies in populations affected by an emergency, 2007, Режим доступа: электр. ресурс*). Известно, что цинк может снизить репликацию вируса и повысить иммунный ответ (*Mohammed S. R., 2021*). Благодаря своим нейропротекторным свойствам цинк может быть эффективен не только при симптомах, связанных с COVID-19, но и в терапии воспалительных и нейродегенеративных патологий (*Cereda G. et al., 2022; Kumar A. et al., 2020*). Недостаток цинка наблюдается почти у 30% населения планеты, а в странах с низким уровнем дохода его дефицит занимает пятое место среди ключевых факторов, провоцирующих развитие тяжёлых заболеваний и повышение уровня смертности (*Prasad A.S., 2013*). Во всем мире ежегодно 800 000 детей умирают из-за дефицита цинка (*Deshpande J. et al., 2013*).

Среди переходных металлов цинк занимает второе место по распространённости после железа, играя важную роль в обеспечении нормального функционирования органов (*Alexandre C. B. et al., 2015*). В организме человека цинк присутствует как важный кофактор более чем в 300 ферментах и встречается во всех 7 классах ферментов, включая оксидоредуктазы, помогая стабилизировать их структуру, поддерживать форму и целостность (*Rui H. et al., 2021; Jiahua C. et al., 2023*). В 1985 году термин «цинковые пальцы» появился для обозначения типа белковой структуры, способной связываться с ДНК и основан на исследованиях Аарона Клуга и его коллег (*Aaron K., 2010*). Эта структура содержит ионы цинка и имеет форму пальцев, что помогает белку распознавать и связываться с конкретными участками ДНК. Их функции разнообразны в биологических процессах, включая распознавание и регуляцию экспрессии ДНК, активацию транскрипции (*Laity J. H. et al, 2001*). Около 30–40% внутриклеточного цинка находится в ядре клетки, около половины в цитоплазме и органоидах, а оставшаяся часть связана с клеточной мембраной (*Tapiero H. et al., 2003*).

Цинк не только выступает в качестве катализатора ферментов, но также участвует в защите клеток и регуляции активности генов через транскрипционные факторы (*MacDonald R. S., 2000*). Кроме того, цинк играет ключевую роль в поддержании функций митохондрий, способствуя синтезу АТФ — основного источника энергии, необходимого для всех жизненных процессов клетки (*Hilary Y.L. et. al., 2021*).

Также цинк может способствовать поддержанию барьерной функции мембран, влияя на их проницаемость и стабильность (*Finamore A. et al., 2008*). В настоящее время цинк становится все более заметным благодаря своей роли в лечении рака, так как он является важнейшим

компонентом в регуляции клеточного гомеостаза (Hu H. et al., 2022; Stockwell B.R., 2020; Bonan C. et al., 2024). Как и другие необходимые для жизни человека микроэлементы, рекомендуемая доза цинка зависит от возраста, пола и состояния здоровья. По данным Национального института здравоохранения (NIH), высокие дозы цинка, превышающие 40 мг в день для взрослых, могут быть токсичными (Schoofs H., 2024). Дефицит же наблюдается при менее 15 мг в сутки.

Использование биосенсора *Spirostomum ambiguum* для оценки биологической активности водорастворимых лекарственных средств основано на изучении кинетики клеточных переходов при воздействии ксенобиотиков (Nalecz-Jawecki G., 2004; Goncharuk V.V. et al., 2017; Pleteneva T.V. et al., 2023). Применение одноклеточного биосенсора согласуется с целями современной фармацевтической науки, которая последние годы ищет этичную и доступную альтернативу экспериментам на животных.

В настоящей работе для прогнозирования биологической активности цинкосодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных средств и биологически активных добавок была использована кинетика лиганд-индуцируемых клеточных переходов *Sp. ambiguum*, позволившая определить наблюдаемую энергию активации ($^{obs}E_a$) медленной стадии процесса гибели клеточного биосенсора. Энергия активации в свою очередь коррелирует со значениями токсичности LD₅₀ для организмов более высокого иерархического уровня, что придает теме исследования еще большую актуальность.

Степень разработанности темы исследования

Учеными кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН был предложен метод использования инфузории *Spirostomum ambiguum* для определения токсичности лекарственных средств на основе аррениусовской кинетики (Сыроешкин А.В. и др., 2001; Быканова С.Н. и др., 2003; Левицкая О.В., Сыроешкин А.В., Плетенева Т.В., 2016; Злацкий И.А., 2016). Также описана связь между наблюдаемой энергией активации ($^{obs}E_a$) гибели клеточного биосенсора и LD₅₀ у животных (Goncharuk V. V. et al., 2017; Pleteneva T.V. et al., 2023). Показано использование метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФА) для определения микроэлементного состава лекарственных средств (Костыгина М.Н. и др., 2017; Макарова М. П. и др., 2019). Биологическая активность хелатных соединений цинка ранее продемонстрирована на примере глицината цинка (Балышев А.В., Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., 2004; Марухленко А. и др., 2022). В настоящей диссертационной работе предложен подход для сравнения токсичности цинкосодержащих фармацевтических субстанций, лекарственных средств и биологически активных добавок. Показана корреляция значений энергии активации гибели клеточного биосенсора и соответствующих LD₅₀ у животных. Установлена зависимость между значениями рН и

токсичностью, а также продемонстрировано изменение биологической активности субстанций цинка при комбинировании с другим металлом.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования (п. 1 и 3):

Пункт 1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

Пункт 3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Объект исследования. В данной диссертационной работе *объектами* являются цинксодержащие фармацевтические субстанции (ФС), лекарственный препарат (ЛП) и биологически активные добавки (БАД).

Предмет исследования. *Предмет* диссертационного исследования - поиск физико-химических характеристик химических соединений, влияющих на механизмы биологической активности цинксодержащих субстанций.

Цель работы: Оценка биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных средств и биологически активных добавок на основании модели Spirotox.

Задачи исследования:

1. Разработать методику оценки биологической активности растворов сульфата цинка разной формы обводнения (моно-, гекса- и гептагидрат) с помощью клеточного биосенсора *Sp. ambigua* по данным кинетики гибели.

2. Провести комплексование результатов, полученных методом Spirotox с результатами валидированных аналитических методов динамического светорассеяния (DLS), лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS), рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) и инфракрасной спектроскопии (ИК-НПВО).

3. Исследовать влияние значения pH среды на биологическую активность соединений, содержащих цинк с помощью метода Spirotox.

4. Сравнить индивидуальную и комбинированную биологическую активность фармацевтических субстанций, содержащих цинк и магний.

5. Исследовать состав и оценить биологическую активность цинксодержащих лекарственных средств (ЛС) и биологически активных добавок (БАД) с использованием *Sp. ambiguum*.

Научная новизна работы

Впервые в мировой практике предложена методика оценки биологической активности цинксодержащих неорганических фармацевтических субстанций, лекарственных препаратов и биологически активных добавок в лабораторных условиях на основе клеточной модели *Spirotox*. **Впервые** проведено комбинирование результатов физико-химических методов оценки качества с методом биотестирования водорастворимых субстанций цинка сульфата и получена наблюдаемая энергия активации лиганд-индуцируемых клеточных переходов. **Впервые** доказано влияние значения pH среды на токсичность фармацевтических субстанций цинка сульфата с использованием *Spirostomum ambiguum*. **Впервые** методом *Spirotox* оценена токсичность многокомпонентных растворов, содержащих цинк и магний. **Впервые** проведена оценка биологической активности цинксодержащих ЛС и БАДов на модели *Spirostomum ambiguum*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость научной работы заключается в применении известного ранее метода *Spirotox* для оценки безопасности фармацевтических субстанций неорганической природы, что является трудоемкой задачей фармацевтической химии. Результаты, полученные для цинксодержащих веществ, могут быть использованы для прогнозирования биологической активности при создании новых лекарственных препаратов и могут позволить выбрать наиболее безопасную фармацевтическую субстанцию на рынке поставщиков.

Метод определения биологической активности/токсичности растворов водорастворимых ЛС на простейших *Spirostomum ambiguum*, как альтернатива животным, является эффективным подходом, имеющим этическую ценность. Использование метода *Spirotox* позволяет получить обширную информацию о биологической активности/токсичности фармацевтических субстанций с наименьшими материальными и финансовыми затратами. А также реализуется концепция 3R Уильяма Рассела и Леонарда Берча о гуманном использовании животных в исследованиях, а конкретно отвечает термину «Замена» («Replacement»), означающему замену животной модели на клеточную.

Методология и методы исследования

Методологическую основу диссертационного исследования составили анализ и систематизация данных отечественных и зарубежных литературных источников, посвящённых теме работы (более 250 источников). Метод анализа токсичности для моногидрата и гексагидрата сульфата цинка, включенных в Европейскую фармакопею X (01/2010:2159 и 01/2008:1683), а

также гептагидрата сульфата цинка (ФС.2.2.0036.18 ГФ РФ XV) на основе клеточной модели выявил зависимость биологической активности от типа кристаллогидрата, а не от действующего фармацевтического компонента. Подход, описанный в диссертационной работе, логичным образом привел к комплексированию физико-химических и биофармацевтических методов анализа фармацевтических субстанций: инфракрасной спектроскопии, лазерному малоугловому рассеянию света, рентгенофлуоресцентному анализу, динамическому светорассеянию и методу биотестирования Spirotox.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты метода Spirotox на основе кинетики Аррениуса лиганд-рецепторных взаимодействий для сравнения биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы.
2. Зависимость биологической активности от значений pH растворов гидратов сульфата цинка показал важность контроля показателя кислотности для снижения общей токсичности фармацевтических субстанций.
3. Результаты, полученные физико-химическими методами (DLS, LALLS, ИК-спектроскопии, РФА), в комплексе с методом Spirotox для всесторонней оценки качества цинксодержащих лекарственных средств.
4. Экспериментальные результаты, продемонстрировавшие синергический эффект субстанций при совместном применении солей цинка с магнием, на клеточной модели Spirotox для оценки комбинированной токсичности.
5. Результаты применения клеточной модели для определения биологической активности цинксодержащих биологически активных добавок.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов обеспечена сравнением данных, полученных различными инструментальными физико-химическими методами фармацевтического анализа – методом ИК-спектроскопии, динамического лазерного светорассеяния и лазерного малоуглового светорассеяния, рентгено-флуоресцентной спектроскопии, а также методом биотестирования с помощью клеточной модели Spirotox. Статистическая обработка данных осуществлялась с применением программного обеспечения OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США) для визуализации и анализа экспериментальных результатов.

Апробация результатов исследования диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН (протокол № 0300-35-БУП-10 от 10.04.2025).

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: XXVI и XXVII Международная медико-биологическая конференция молодых

исследователей "Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье" (Санкт-Петербург, 2023, 2024); IX Международная научно-методическая конференция "Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств" (Воронеж, 2023); 6-я Всероссийская конференция "Физика водных растворов" (Москва, 2023); XIX Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2024); III Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2024).

Публикации по теме исследования

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ: в журналах индексируемых в Scopus – 4, CAS – 2.

Личный вклад автора

В рамках исследования был проведен анализ актуальных научных публикаций по тематике диссертационной работы. Автор самостоятельно проводил экспериментальные исследования и статистическую обработку результатов, а также активно участвовал в интерпретации полученных экспериментальных данных. Кроме того, автор внес личный вклад в исследования, проведенные совместно с коллегами кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН по подготовке научных публикаций на основе выполненной работы.

Структура и объем диссертации

Полный объем диссертации составляет 159 страниц, в том числе 28 рисунков и 10 таблиц. Библиографический список содержит 266 источников. Описание представляемого исследования включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение и список цитируемой литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор научной отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. В рамках систематизации данных рассмотрены биологическая роль цинка в поддержании жизнедеятельности организмов и его токсическое действие при превышении допустимых доз. Охарактеризованы взаимодействие цинка с другими металлами, а также методологии доклинических исследований токсичности цинксодержащих субстанций.

Во второй главе описаны материалы и методы, используемые в диссертационной работе. Объектами исследования являются:

– Фармацевтические субстанции: $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99,0%, Acros Organics, Испания), $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99,3 – 103,0%, Fluka, Германия), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99,0%, Sigma-Aldrich, США), MgCl_2

(99,0%, Sigma-Aldrich, США). Приготовленные растворы перечисленных субстанций прошли фильтрование с помощью субмикронного фильтра (размер пор 0,22 мкм, Merck Millipore, США). Концентрации растворов сульфата цинка для определения биологической активности составили от 0,001 моль/л до 0,1 моль/л.

– Биологически активные добавки и лекарственный препарат:

«Цинка хелат» (ООО АС «Эвалар», Россия), в составе содержит целлюлозу микрокристаллическую, цинка бисглицинат, гидроксипропилметилцеллюлозу, твин 80, полиэтиленгликоль, кальция стеарат, диоксид кремния аморфный, кроскарамеллозу.

«Цинк + витамин С» (ООО АС «Эвалар», Россия), в составе содержит аскорбиновую кислоту, целлюлозу микрокристаллическую, цинка лактат, стеарат кальция растительного происхождения и диоксид кремния аморфный.

«Цинк хелат» (ООО «Мирролла», Россия), в составе содержит цинка аминокислотный хелатный комплекс (глицинат), микрокристаллическую целлюлозу, крахмал кукурузный, тальк.

«Цинкорол» (ООО «Квадрат-С», Россия), в составе содержит цинка цитрат, целлюлозу микрокристаллическую, соли жирных кислот, гидроксипропилметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, диоксид титана.

«Цинкит» («Верваг фарма Гмбх и Ко.КГ», Германия), в составе содержит сульфат цинка, лимонную кислоту, натрия гидрокарбонат, сорбитол, натрия цикламат, натрия сахаринат, ароматизатор.

«Пиколинат цинка» («Грин Сайд» ООО, Россия), в составе содержит носитель микрокристаллическая целлюлоза, пиколинат цинка, антислеживающий агент стеарат кальция, антислеживающий агент диоксид кремния аморфный.

«Цинктерал» (ЛП-№(000816)-(РГ-RU), «Тева Оперейшнс Поланд Сп. з о.о.», Польша), в составе содержит действующее вещество цинка сульфата моногидрат 124,0 мг, что соответствует цинку 45,0 мг; вспомогательные вещества: лактозы моногидрат 78,5 мг, крахмал картофельный 38,75 мг, повидон-K25 20,00 мг, тальк 12,38 мг, магния стеарат 1,37 мг; оболочка: гипромеллоза 6,897 мг, макрогол (полиэтиленгликоль) 0,448 мг, титана диоксид (E171) 1,79 мг, алюминиевый лак на основе красителя азорубин (E122) 0,865 мг.

– Растворитель - деионизированная высокоомная вода (18,2 МΩ×см при 25 °С), прошедшая очистку на установке Milli-Q производителя Merck Millipore, США. Содержание дейтерия в воде [D/H] = 140,0±1,0 ppm.

– Дополнительные реактивы для исследований: NaCl (98%, Sigma-Aldrich, США), КОН (98%, ХИММЕД, Россия), H₂SO₄ (93,6–95,6 %, АЛЬДОСА, Россия).

Методами исследования являются метод лазерного динамического светорассеяния (DLS, Dynamic Light Scattering, измеритель Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания));

метод лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS, Low-angle laser light scattering, измеритель дисперсности лазерный ИДЛ-1 «Кластер-1» (ИККХВ НАНУ, РУДН)); инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК Фурье-спектрометр Cary 630 с приставкой НПВО (Agilent, США)); метод рентгенофлуоресцентного анализа (энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония)); метод оценки биологической активности Spirotox. Для измерения значения pH использовался pH-метр (откалиброванный pH-метр базовый лабораторный PB-11 (Sartorius, Германия)); для калибровки pH-метра использовали буферные растворы с pH 4; 7; 10 (NIST, США). Высушивание фармацевтических субстанций проводилось в сушильном шкафу FD23 (Binder, Германия). Полученные результаты обрабатывали статистически для получения среднего значения и среднеквадратичного отклонения (среднее $\pm$ SD) с использованием пакета программного обеспечения OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США). Также для анализа методом РФА был применен стандарт МАГАТЭ – 2976, Элодеи канадской ЭК-1, листа берёза ЛБ-1.

Третья глава содержит основные экспериментальные результаты и их обсуждение.

1.1. Исследование химического состава субстанций сульфата цинка методами ИК-НПВО и РФА

Результаты спектрального анализа в ИК-области представлены в виде зависимости оптической плотности в инфракрасной области от волнового числа (ν , см^{-1}). На спектре кристаллической фармацевтической субстанции присутствует полоса колебаний группы О-Н 3200 см^{-1} , а также значимые полосы поглощения в области частот $1130\text{--}1080 \text{ см}^{-1}$, что свидетельствует о присутствии группы SO_4^{2-} (Рисунок 1).

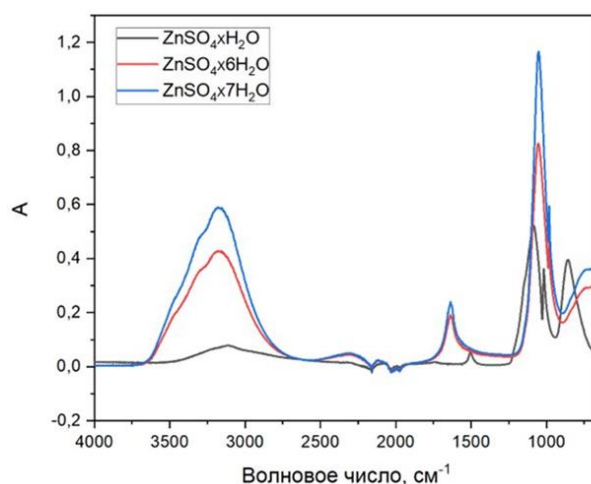


Рисунок 1. ИК-спектры сульфата цинка моногидрата (чёрный), сульфата цинка гексагидрата (красный) и сульфата цинка гептагидрата (синий).

Источник: составлено автором

В результате эксперимента было показано, что интенсивность полосы валентного колебания, соответствующей ОН группе, зависит от содержания воды в субстанциях. На спектре видно, что образец сульфата цинка гептагидрата с 7 молекулами воды приводил к увеличению интенсивности полосы гидроксигруппы.

Метод рентгенофлуоресцентного анализа был применен для определения содержания цинка, а также для подтверждения отсутствия мешающих примесей в фармацевтических субстанциях цинка сульфата. Качественное определение цинка в исследуемых образцах было доказано по наличию пиков характеристической флуоресценции на РФА-спектрах при K_{α} и K_{β} линиях цинка (8,632 и 9,572 кэВ, соответственно).

1.2. Оценка биологической активности цинксодержащих субстанций методом Spirotox и корреляция с LD₅₀

Известна возможность корреляции между значениями кажущейся энергии активации $^{obs}E_a$ и полулетальной дозы LD₅₀ фармацевтических субстанций у млекопитающих (крыс) при пероральном приеме. По данным Европейского химического агентства (ЕСНА) сульфат цинка разной формы кристаллогидрата (моногидрат, гексагидрат и гептагидрат) имеет пероральные значения LD₅₀ 574 мг/кг, 862 мг/кг и 920 мг/кг соответственно. На рисунке 2 представлено значение энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *Spirostomum ambiguum* в растворах $ZnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ при концентрации 0,001 моль/л, а также их корреляция с LD₅₀.

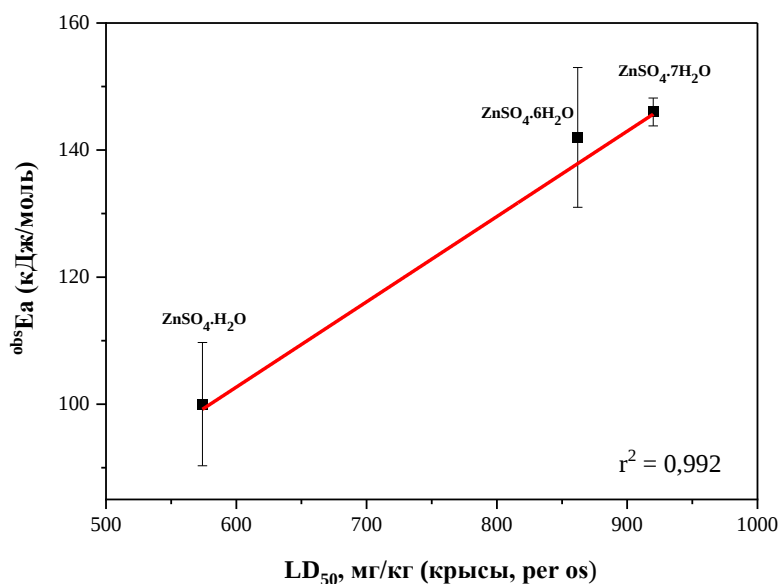


Рисунок 2. Корреляция $^{obs}E_a$ (кДж/моль) гибели *Sp. ambiguum* и значений полулетальных доз LD₅₀ у млекопитающих (крыс) при пероральном приёме для субстанций цинка сульфата разной формы (среднее $\pm$ SD, n=5).

Источник: составлено автором

Из представленного графика видно, что наименьшей энергией активации $^{obs}E_a$ обладает раствор $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (99 ± 10 кДж/моль, $n=5$), в то время как остальные растворы $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ и $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ обладают эквивалентной биологической активностью с соответствующей энергией активации $^{obs}E_a$ 142 ± 9 кДж/моль и 146 ± 2 кДж/моль. Полученные результаты позволяют сравнить биологическую активность гидратированных форм сульфата цинка. При этом обнаружено, что меньшее значение энергии активации свидетельствует о более высокой биологической активности раствора $ZnSO_4 \cdot H_2O$, в сравнении с двумя другими растворами. Это доказывает наличие корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полуметальной дозы LD_{50} .

1.3. Изучение влияния фильтрования на энергию активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора в растворах сульфата цинка

На рисунке 3 представлено значение энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *Spirostomum ambiguum* в растворах, приготовленных из субстанций $ZnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в концентрации 0,01 моль/л до и после фильтрования (субмикронный фильтр, размер пор 0,22 мкм). Из рисунка видно, что до фильтрования наименьшей энергией активации характеризуется раствор $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (68 ± 7 кДж/моль, $n=5$), в то время как остальные растворы $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ и $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ обладают эквивалентной биологической активностью с соответствующей энергией активации $^{obs}E_a$ 113 ± 5 кДж/моль и 119 ± 5 кДж/моль. Полученные результаты позволяют сравнить биологическую активность различных форм сульфата цинка. При этом обнаружено, что наименьшее значение энергии активации, а также более короткое время жизни *Sp. ambiguum* (в 2 раза) в том же диапазоне температур свидетельствует о более высокой биологической активности раствора $ZnSO_4 \cdot H_2O$, в сравнении с двумя другими растворами (Рисунок 3).

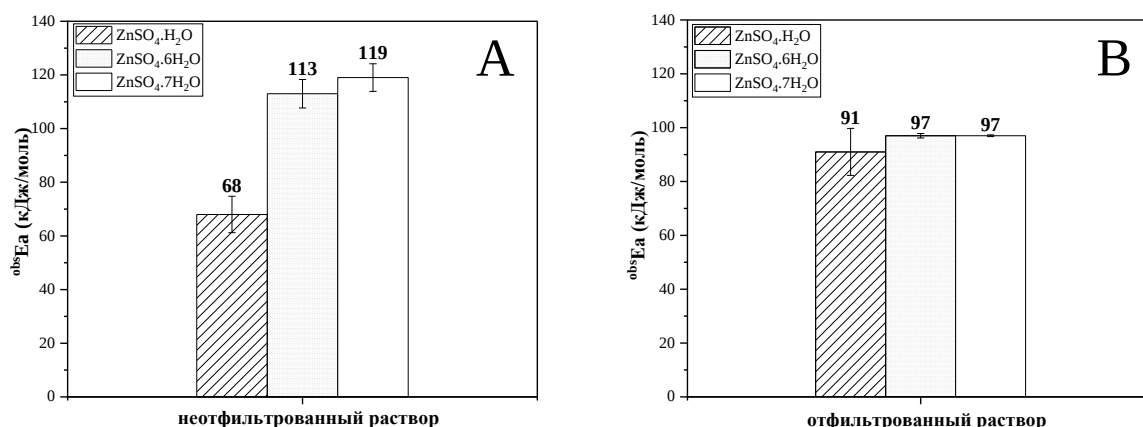


Рисунок 3. Энергия активации гибели *Sp. ambiguum* растворов цинка сульфата при концентрации 0,01 моль/л в зависимости от фильтрования ($n=5$); **А** – свежеприготовленные растворы до процесса фильтрования; **В** – растворы, прошедшие фильтрование через субмикронный фильтр.

Источник: составлено автором

Для выяснения причин отсутствия различий в значениях энергий активации после фильтрования были исследованы дисперсные параметры растворов.

1.4. Измерение дисперсных параметров растворов фармацевтических субстанций с помощью методов DLS и LALLS

При сравнении энергии активации растворов до и после фильтрования необходимо отметить, что нефильтрованный раствор моногидрата обладает отличным значением энергии активации от растворов гексагидрата и гептагидрата сульфата цинка, однако после фильтрования, все изучаемые растворы характеризуются близкими значениями энергии активации. Различие в энергии активации растворов до фильтрования может быть связано с влиянием на биологическую активность водных кластеров, существующих в растворах солей (Bunkin N.F., 2013). Субмикронное фильтрование приводит к разрушению данных плотностных неоднородностей. Для подтверждения отсутствия частиц после фильтрования был применен метод динамического светорассеяния DLS (Рисунок 4).

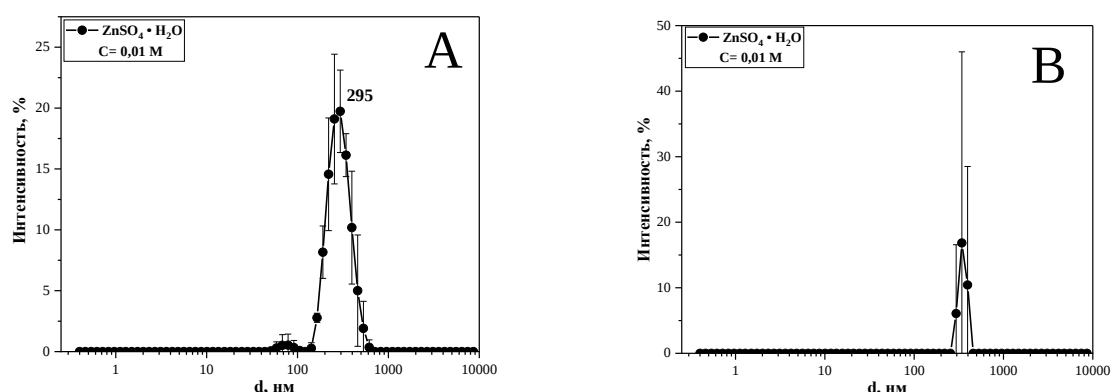


Рисунок 4. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в растворе сульфата цинка моногидрата. **А** – раствор до процесса фильтрования; **В** – раствор, после фильтрования через субмикронный фильтр (рН = 5,4).

Источник: составлено автором

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что существует разница в размерах частиц в растворе сульфата цинка моногидрата. До фильтрования наблюдались частицы с размером 295 нм. После фильтрования в диапазоне измерения размеров частиц от 0,1 до 1000 нм плотностные неоднородности не наблюдались.

Однако после фильтрации через мембрану с размером пор 0,22 мкм исследуемые растворы выдерживали в течение 3 часов до проведения анализа методом LALLS. Были обнаружены

частицы микрометрового диапазона, что может свидетельствовать о повторном образовании гигантских гетерофазных кластеров (Таблица 1).

Таблица 1. Размер частиц дисперсных растворов сульфата цинка разной формы обводнения до и после фильтрования по объёму (мкм).

Образец	Размер частиц (мкм)	
	До фильтрования	После фильтрования
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	37	12
$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	37	12
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	12

3.5. Определение влияния pH на токсичность растворов сульфата цинка моно- и гептагидрата на основе метода Spirotox

Гибель *Spirostomum ambiguum* ожидаемо зависит от концентрации цинка, так при концентрации раствора моногидрата сульфата цинка 0,01 моль/л время жизни инфузории сокращается (Таблица 2).

Таблица 2. Биологическая активность растворов $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ различной концентрации установленная методом Spirotox.

Температура (К)	295	297	299	301
Концентрация	Время жизни <i>Sp. ambiguum</i> , с (n=5)			
0,01 моль/л	185±3	120±8	106±7	84±4
0,001 моль/л	246±4	185±5	147±3	107±2

Было замечено, что существует разница во времени жизни инфузорий в зависимости от концентрации исследуемого образца. Воздействие иона цинка на инфузории приводит к ее гибели через прохождение переходного состояния по аналогии с моделью ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен. Для оптимизации дальнейших исследований были выбраны растворы с концентрацией 0,01 моль/л. Установлена зависимость токсичности фармацевтических субстанций цинка сульфата от pH. Эксперимент проводился с использованием двух растворов $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Значение pH раствора корректировали раствором разбавленной серной кислоты 0,001 моль/л или гидроксида калия 0,001 моль/л.

По мере увеличения pH раствора соотношение концентрации OH^- к концентрации Zn^{2+} постепенно увеличивается. При увеличении значения pH до 6,5 энергия активации $^{obs}E_a$

постепенно снижается, что говорит о повышении токсичности среды для инфузории *Sp. ambigua* (Рисунок 5).

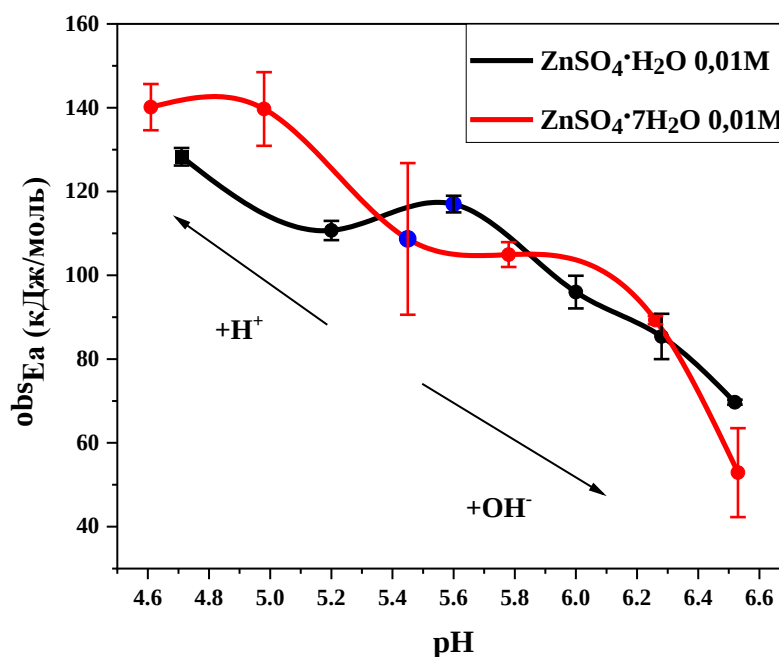


Рисунок 5. Зависимость obsEa лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора от значения pH раствора сульфата цинка гептагидрата и моногидрата (среднее $\pm$ SD, $n=5$).

Источник: составлено автором

Из представленного рисунка видно, что уровень pH влияет на гомеостаз клеток, связанный с осмотическими явлениями. Концентрация ионов H^+ в растворе связана с гибелью инфузорий, так как снижение концентрации H^+ вызывает увеличение проницаемости клеточной мембраны *Sp. ambigua*, приводя к быстрому набуханию и разрыву клеток. Одновременно с этим наблюдаемая obsEa , вероятно, зависит от истории пробоподготовки. При равных значениях концентрации испытуемых растворов наблюдалось увеличение токсичности у раствора, приготовленного из моногидрата сульфата цинка, по сравнению с раствором, приготовленным из гептагидрата сульфата цинка, что подтверждает предыдущие заключения.

Контрольный раствор NaCl 0,01 моль/л при трех значениях pH = 5,0; 5,8; 6,5 был использован для оценки влияния pH на инфузории. Показано, что при одной и той же концентрации цинка по мере повышения pH время жизни инфузорий постепенно уменьшалось, а для раствора NaCl не наблюдалось такой зависимости.

Чтобы выяснить разницу во времени жизни инфузорий при разных значениях pH, эксперименты проводились для раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 моль/л при двух уровнях pH 5,0 и 6,5. На рисунке 6 видно, что при увеличении pH от 5,0 до 6,5 время жизни *Sp. ambigua* уменьшается для двух исследуемых растворов (при температуре 297 К с 118 секунд до 67 секунд

для раствора моногидрата сульфата цинка, и с 154 секунд до 65 секунд для гептагидрата сульфата цинка).

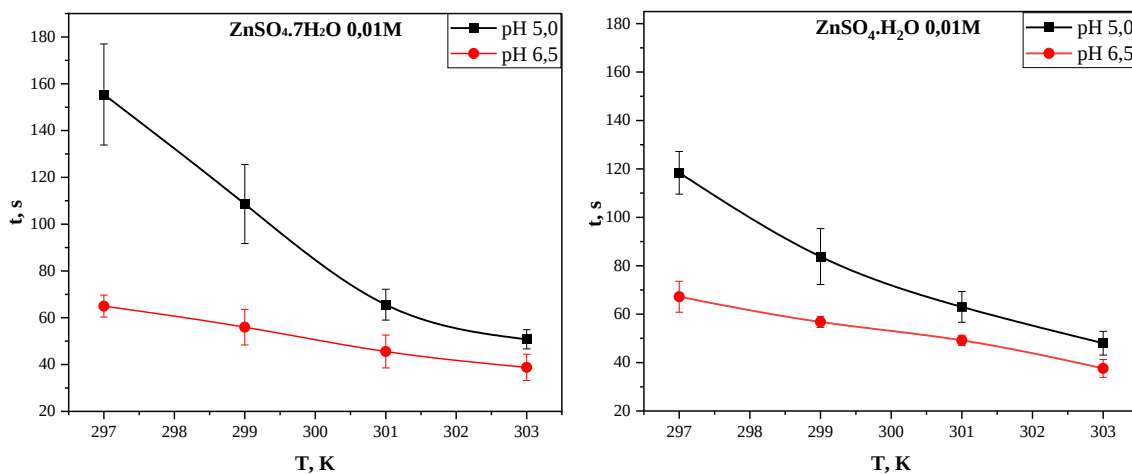


Рисунок 6. Время жизни инфузорий в зависимости от значения pH (5,0; 6,5) в растворах цинка сульфата гептагидрата и моногидрата в прямых координатах (n=5).

Источник: составлено автором

При повышении pH от 5,0 до 6,5 наблюдалось снижение $^{obs}E_a$ в 2,2 раза для гептагидрата сульфата цинка (от 142 ± 11 до 66 ± 11 кДж/моль) и в 1,6 раза для моногидрата сульфата цинка (от 111 ± 2 до 70 ± 1 кДж/моль), что подтверждает повышение токсичности.

3.6. Применение метода Spirotox для определения биологической активности в двухкомпонентных растворах, содержащих соли цинка и магния

На рисунке 7 представлено значение энергии активации лиганд-индуцируемой гибели инфузории при комбинированном действии растворов $ZnSO_4 \cdot H_2O$ и $MgCl_2$ с отношением 1:1 с различной концентрацией исходных растворов (0,01 моль/л и 0,001 моль/л).

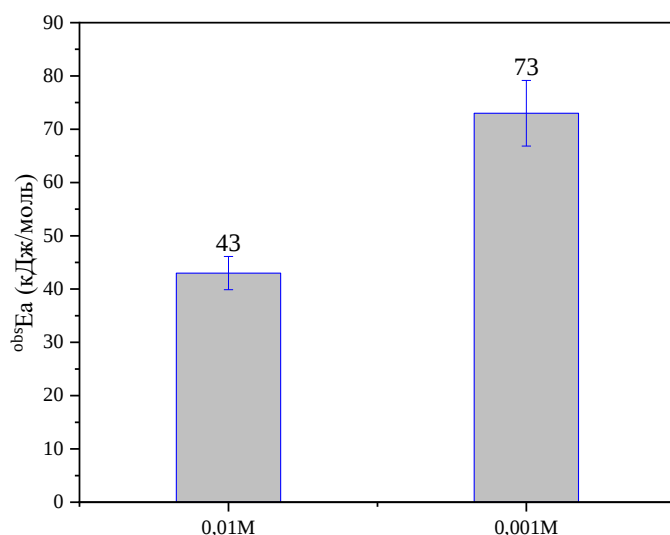


Рисунок 7. Зависимость энергии активации лиганд-индуцируемой гибели клеточного биосенсора от концентрации магния и цинка (Zn:Mg = 1:1; pH=5,8–6,1; n=5).

Источник: составлено автором

Раствор $MgCl_2$ с концентрацией 0,001 моль/л не вызывает гибель клеток инфузорий в течение 30 минут при температуре от 22°C до 30°C. Однако инфузории чувствительны к раствору моногидрата сульфата цинка в концентрации 0,001 моль/л с наблюдаемой энергией активации $^{obs}E_a$ 99 ± 10 кДж/моль, а в концентрации 0,01 моль/л $^{obs}E_a$ 68 ± 7 кДж/моль. Наблюдаемая энергия активации при комбинировании двух фармацевтических субстанций ниже, чем при определении энергии активации отдельных фармацевтических субстанций.

На рисунке 8 представлено время жизни инфузорий при разных соотношениях Zn:Mg (pH от 5,8 до 6,1). Эксперименты проводились в один и тот же день, чтобы обеспечить эквивалентность состояния инфузорий.

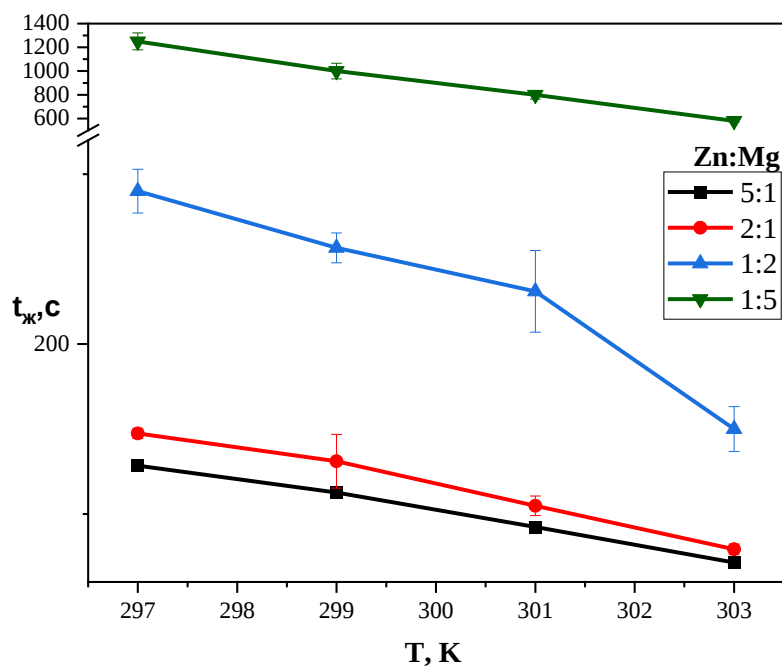


Рисунок 8. Зависимость времени жизни инфузорий от различного соотношения Zn:Mg при концентрации исходных растворов 0,001 моль/л.

Источник: составлено автором

Обнаружено, что по мере снижения содержания цинка и увеличения содержания магния инфузории продолжают быть активными в течение более длительного периода времени. При соотношении соли цинка и магния в растворе 5:1 и 1:5, полученные наблюдаемые энергии активации составляют соответственно $^{obs}E_a$ 73 ± 3 кДж/моль и 94 ± 8 кДж/моль. Таким образом, полученные результаты приводят к заключению, что обнаружен синергетический эффект при одновременном действии фармацевтических субстанций, содержащих магний и цинк, зависящий от соотношений магния и цинка в образце на *Spirostomum ambiguum*.

1.7. Оценка содержания цинка в БАД и ЛП методом РФА, и их биологическая активность с помощью метода Spirotox

Для оценки содержания цинка в БАД и ЛП использовали метод РФА. По интенсивности можно судить о содержании цинка в таблетированных формах. Кроме цинка, в исследуемых образцах содержатся иные элементы такие, как Fe, Ca, S и др., но в малом количестве (для Fe меньше 0,02%, Ca меньше 0,3%, S меньше 0,6%). Определение содержания цинка в образцах, используя доступные стандартные материалы, показывает, что его содержание в таблетках цинка глицината в 2 раза больше, чем заявлено производителем; цинка лактат - в 1,4 раза больше; цинка цитрат - в 1,3 раза больше; цинка сульфата (Цинкит) - в 2,5 раза больше; цинка сульфат моногидрат (Цинктерал) – в 1,2 раза меньше; цинка пиколинат в 2,7 раз больше; цинка бисглицинат соответствует заявленному производителем (Таблица 3).

Таблица 3. Пересчет содержания цинка в БАД и ЛП по разному стандартному материалу

Название	SRM-2976, %	Лист Берёзы ЛБ-1, %	Элодея канадская ЭК-1, %	Производитель (содержание в 1 таблетке, %)
Цинка бисглицинат (БАД)	$4,3 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,4$	4,5
Цинка лактат (БАД)	$6,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,3$	5,0
Цинка глицинат (БАД)	$9,4 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,5$	4,7
Цинка цитрат (БАД)	$13,6 \pm 1,0$	$7,6 \pm 0,7$	$14,0 \pm 1,0$	10,8
Цинка сульфат (Цинкит, БАД)	$0,5 \pm 0,2$	0,3	$0,5 \pm 0,2$	0,2
Цинка сульфат моногидрат (Цинктерал, ЛП)	13,3	7,6	13,3	16
Цинка пиколинат (БАД)	$22,3 \pm 0,1$	$12,6 \pm 0,1$	$22,6 \pm 0,1$	8,3

Приготовленные растворы БАД и ЛП после фильтрации оценивали с помощью метода Spirotox. Из рисунка 9 видно, что раствор, полученный растворением таблетки цинка бисглицината с оболочкой, имеет меньшую энергию активации $^{obs}E_a = 46 \pm 8$ кДж/моль (раствор 1), чем без оболочки $^{obs}E_a = 95 \pm 8$ кДж/моль (раствор 3). Также обнаружено, что раствор, приготовленный из целой таблетки с последующим измельчением, показывает энергию активации $^{obs}E_a = 76 \pm 1$ кДж/моль. Это указывает на то, что таблетки без оболочки менее токсичны для инфузорий, чем таблетки с оболочкой (Рисунок 9).

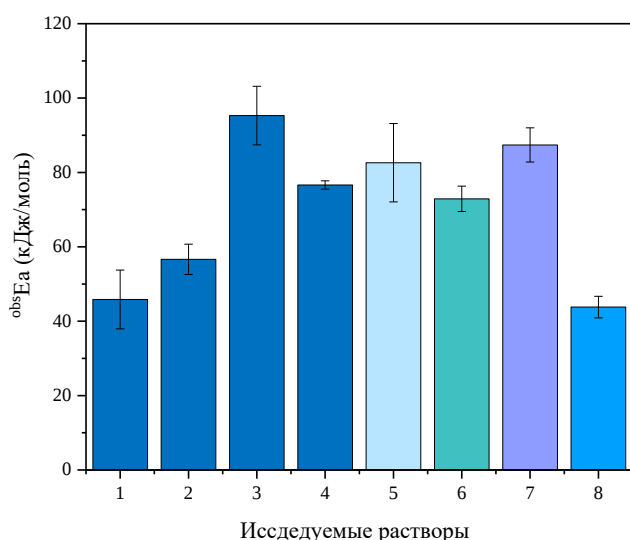


Рисунок 9. Наблюдаемая энергия активации лиганд-индуцируемой гибели инфузории для БАД и ЛП (n=5).

1–4. Цинка бисглицинат 0,01 моль/л (БАД)

1. Раствор из целой таблетки

2. Раствор 1 через 7 дней

3. Раствор из таблетки без оболочки

4. Раствор из измельченной таблетки

5. Цинка глицинат 0,01 моль/л

6. Цинка цитрат 0,01 моль/л

7. Моногидрат сульфата цинка 0,01 моль/л (ЛП)

8. Цинка пиколинат 0,01 моль/л

Источник: составлено автором

В результате проведенных экспериментов было отмечено, что при сравнении трех растворов, содержащих молярную концентрацию цинка 0,01 моль/л (Рисунок 9, растворы 3, 5, 6, 7) раствор бисглицината цинка имеет схожую энергию активации ($^{obs}E_a = 95 \pm 8$ кДж/моль) с раствором цинка глицината $^{obs}E_a = 83 \pm 10$ кДж/моль и раствором цинка цитрата $^{obs}E_a = 73 \pm 3$ кДж/моль. Результаты пересчета по разным стандартным образцам (Таблица 3) показывают, что количество цинка в таблетках цинка глицината, цинка цитрата и цинка пиколината выше, чем по данным производителей. Эксперименты были также проведены с остальными БАД и ЛП, а именно с цинка сульфатом и цинка лактатом. Поскольку в составе таблетки содержат аскорбиновую кислоту, значение pH наблюдалось от 3,4 до 3,8 при концентрации от 0,005 моль/л – 0,01 моль/л, что выходило за пределы идеального диапазона pH для инфузорий (4,5–8,0) и приводило к гибели инфузорий.

Видно, что растворы имеют разные значения энергии активации даже при одинаковой концентрации. Это говорит о том, что вспомогательные вещества, лекарственная форма

цинксодержащих средств и оболочка таблетки могут влиять на биологическую активность при применении модели Spirotox.

Примечательно, что в исследованных растворах пиколинат цинка обладает наименьшей энергией активации. Этот результат абсолютно совпадает с повышенным содержанием цинка по результатам РФА, однако такое содержание не соответствует заявленному производителем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработан подход к определению биологической активности цинксодержащих лекарственных средств неорганической природы и биологически активных добавок на основе метода Spirotox. Представленный метод показывает множество преимуществ при использовании простейших для замены лабораторных животных. Кроме этого, метод Spirotox соответствует требованиям фармацевтических исследований в рамках концепции 3R (Refine, Reduce, Replace), который направлен на устойчивое развитие экосистем.

Показано, что на формировании биологической активности/токсичности влияют физико-химические свойства ксенобиотика, в том числе значение pH, размер дисперсной фазы, молярная концентрация цинка и вид кристаллогидрата исходной фармацевтической субстанции. Полученные результаты доказывают наличие корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полулетальной дозы LD₅₀. Различия в энергии активации неотфильтрованного раствора доказывают, что на токсичность раствора влияет размер плотностных неоднородностей в растворе различных гидратных форм. Субмикронное фильтрование приводит к минимизации истории пробоподготовки.

Разработанный подход к контролю качества цинксодержащих лекарственных средств и биологически активных добавок предложен в качестве дополнительного метода к валидированным физико-химическим подходам, таким как DLS, LALLS РФА и ИК.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика оценки биологической активности трех гидратных форм сульфата цинка с концентрацией 0,001 моль/л. Показана сходная биоактивность гекса- и гептагидрата сульфата цинка (142 ± 9 кДж/моль и 146 ± 2 кДж/моль), однако раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ обладает наибольшей биологической активностью (99 ± 10 кДж/моль, $n=5$). Данная тенденция сохраняется и для концентрации 0,01 моль/л.

2. Комплексирование результатов биофармацевтического анализа методом Spirotox и физико-химических методов: ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием (НПБО), рентгенофлуоресцентного анализа (РФА), динамического светорассеяния (DLS) и лазерного малоуглового рассеяния света (LALLS) выявило, что растворы до фильтрования сохраняли свою историю пробоподготовки, несмотря на одинаковые концентрации и аналогичный метод приготовления растворов.

3. При определении влияния значения pH на токсичность раствора гидратов сульфата цинка для простейших *Sp. ambiguum*, была установлена токсическая зависимость. При приближении pH к 7 наблюдалось снижение энергии активации в 2,2 раза для гептагидрата сульфата цинка (от 142 ± 11 до 66 ± 11 кДж/моль) и в 1,6 раза для моногидрата сульфата цинка (111 ± 2 до 70 ± 1 кДж/моль), что подтверждает повышение токсичности.

4. Исследование показало комбинированную токсичность при одновременном действии фармацевтических субстанций, содержащих магний и цинк с концентрацией 0,001 моль/л на *Spirostomum ambiguum*.

5. Оценка содержания цинка в БАД и ЛП произведена методом РФА, а биологическая активность оценена с помощью метода Spirotox. Благодаря этому показано влияние оболочки таблетки с вспомогательными веществами на биологическую активность раствора (с оболочкой $^{obs}E_a = 46 \pm 8$ кДж/моль, без оболочки $^{obs}E_a = 95 \pm 8$ кДж/моль).

6. Таким образом, проведена оценка биологической активности цинксодержащих фармацевтических субстанций неорганической природы, лекарственных препаратов и биологически активных добавок с применением модели биотестирования Spirotox.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах**Статьи в журналах, индексируемых в Scopus и CAS:**

1. Tumasov, V. N. Chiral Properties of Zinc Complexes with Bi- and Tridentate Ligands of L- and D-Amino Acids / V.N. Tumasov, A.V. Marukhlenko, A.P. Novikov, **T. N. Q. Hoang**, A.M. Koldina, M.A. Morozova // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2025. – V. 15. – N 4. – P. 43-52. DOI: 10.7324/JAPS.2025.209656.
2. Uspenskaya, E. V. The development of method for activating pharmaceutical substances with subsequent in situ study of modified powder properties / E. V. Uspenskaya, E. Kuzmina, **T. N. Q. Hoang**, A. A. Timofeev, T. V. Maximova // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2024. – V. 16. – N.5. – P. 194–203. DOI: 10.22159/ijap.2024v16i5.51481.
3. Uspenskaya, E. V. Influence of Mechanical Loading on the Process of Tribochemical Action on Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Substances, Using Lacosamide as an Example: From Micronisation to Mechanical Activation / E. V. Uspenskaya, E. Kuzmina, **T. N. Q. Hoang**, M. A. Komkova, I. V. Kazimova, A. A. Timofeev // *Pharmaceutics*. – 2024. – V. 16. – N. 6. – P. 798 DOI: 10.3390/pharmaceutics16060798.
4. Sukhanova, V.A. Development of a Comprehensive Approach to Quality Control of Dermorphin Derivative—Representative of Synthetic Opioid Peptides with Non-Narcotic Type of Analgesia / V.A. Sukhanova, E. V. Uspenskaya, S. Ainaz, **T. N. Q. Hoang**, A. A. Timofeev // *Scientia Pharmaceutica*. – 2025. – V. 93. – N. 1. – P. 3. DOI: 10.3390/scipharm93010003.
5. **Hoang, T. N. Q.** Effect of pH on Toxicity of Zinc Sulphate Hydrate Solutions Using the Spirotox Test / T. N. Q. Hoang, G. V. Petrov, A. M. Koldina, A. V. Syroeshkin // *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. – 2024. – V. 14. – N. 6. – P. 31-33. DOI: 10.22270/jddt.v14i6.6597.
6. Kuzmenko, E. E. Determination of the toxicity of zinc sulphate hydrate solution using the Spirotox biotesting method / E. E. Kuzmenko, **T. N. Q. Hoang**, A. M. Koldina, Gleb V. Petrov, Anton V. Syroeshkin // *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. – 2025. – V. 15. – N. 3. – P. 89-96. DOI: 10.22270/jddt.v15i3.7047.

Хоанг Тхи Нгок Куинь

(Вьетнам)

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИНКОСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ И БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ДОБАВОК ПО ДАННЫМ МОДЕЛИ
SPIROTOX**

Диссертационное исследование посвящено разработке подхода определения биологической активности цинкосодержащих лекарственных средств и биологически активных добавок на основе метода Spirotox. Этот метод показывает множество преимуществ при использовании простейших для замены лабораторных животных. В работе показано, что на формирование биологической активности/токсичности влияют физико-химические свойства и стереохимия ксенобиотика, значение pH растворов, гидратная химическая структура ионов цинка, а также его молярная концентрация. В научном исследовании показано, что использование простейших *Spirostomum ambiguum* является эффективным методом оценки биологической активности однокомпонентных и многокомпонентных растворов, содержащих цинк. Полученные результаты доказывают наличие корреляции между значениями наблюдаемой энергии активации $^{obs}E_a$ и полуметальной дозой LD₅₀.

Hoang Thi Ngoc Quynh

(Viet Nam)

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF ZINC-CONTAINING DRUGS AND BIOLOGICALLY
ACTIVE ADDITIVES BY METHOD SPIROTOX**

The dissertation work is devoted to the development of an approach for determining the biological activity of zinc-containing pharmaceutical preparations and biologically active supplements based on the Spirotox method. This method demonstrates numerous advantages when using protozoa as a replacement for laboratory animals. The study reveals that the formation of biological activity/toxicity is influenced by the physicochemical properties and stereochemistry of the xenobiotic, the pH value of solutions, hydrated chemical structure of zinc ions, as well as its molar concentration. The scientific investigation demonstrates that the use of *Spirostomum ambiguum* protozoa for assessing biological activity is an effective method for evaluating both single-component and multi-component solutions containing zinc. The obtained results confirm a correlation between the observed activation energy values $^{obs}E_a$ and the median lethal dose LD₅₀.