

УДК 615.9; 577.18/.19; 632.95



Метаболомное исследование кардиотоксичности лекарственных препаратов на зебрафиш в качестве модельного организма: эндотелиальная и митохондриальная дисфункция, окислительный стресс

Н.Е. Москалева¹, П.М. Резванов¹, В.М. Самойлов¹, В.Г. Варзиева¹, С.Н. Басханова¹,
В.В. Тарасов¹, Е.А. Смолярчук¹, Д.А. Кудлай^{1, 2, 3}, С.А. Апполонова¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Россия, 119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

³ Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Россия, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: moskaleva_n_e@staff.sechenov.ru

Получена 05.01.2025

После рецензирования 24.06.2025

Принята к печати 06.07.2025

Цель. Исследовать изменения метаболомного профиля эмбрионов Данио-рерио (зебрафиш) при воздействии лекарственных препаратов с известными рисками кардиотоксичности — ацетаминифена, карбамазепина, сальбутамола, кеторолака, бисопролола и метопролола. Анализ нацелен на выявление изменений в уровне аминокислот (в том числе с разветвлённой цепью — ВСАА), продуктов карнитинового обмена (ацилкарнитинов) и связанных метаболических индексов, отражающих митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс и нарушения сигнального пути оксида азота.

Материалы и методы. Эмбрионы Данио-рерио инкубировали с исследуемыми веществами в градиенте концентраций (0,5–10×NOEC). Проводился количественный целевой метаболомный анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — tandemной масс-спектрометрии (HPLC–MS/MS) с панелью из 98 метаболитов (аминокислоты, продукты обмена оксида азота, витамины, нуклеозиды и ацилкарнитины). Полученные концентрации метаболитов сравнивали с контролем (0,1% ДМСО). Статистически значимые отклонения выражали как отношение концентрации к контролю в логарифмическом масштабе по основанию 2 ($\log_2 FC$).

Результаты. Выявлены изменения концентраций ключевых метаболитов под влиянием кардиотоксичных лекарственных препаратов. Наблюдалось накопление ВСАА (сумма лейцин, изолейцин, валин; $\log_2 FC \approx 0,5–2,2$; $p < 0,05$) по сравнению с контролем, а также повышение уровня ацилкарнитинов, указывающее на митохондриальную дисфункцию: так, метопролол и бисопролол вызывали увеличение соотношения суммы ацилкарнитинов к свободному карнитину более чем в 4–6 раз ($\log_2 FC = +3,8$ для бисопролола и $-1,27$ для метопролола; $p < 0,01$), а также накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов. Отмечены выраженные изменения показателей, связанных с окислительным стрессом: в образцах после воздействия β_1 -блокаторов (бисопролол, метопролол) и кеторолака повышалась концентрация метионин-сульфоксида (на 80–130%, $p < 0,01$) — продукта окисления метионина, и соотношение метионин-сульфоксид/метионин, тогда как при воздействии сальбутамола, напротив, уровень метионин-сульфоксида снижался (-120% , $p < 0,01$), указывая на разнонаправленное влияние на окислительный статус. Нарушения сигнального пути оксида азота отразились в повышении уровня асимметричного диметиларгинина.

Закключение. Каждое из проанализированных соединений вызывало специфический метаболический «отпечаток» в образцах Данио-рерио, отражающий механизмы их кардиотоксичности. Повышение уровня ВСАА и связанных

Для цитирования: Н.Е. Москалева, П.М. Резванов, В.М. Самойлов, В.Г. Варзиева, С.Н. Басханова, В.В. Тарасов, Е.А. Смолярчук, Д.А. Кудлай, С.А. Апполонова. Метаболомное исследование кардиотоксичности лекарственных препаратов на зебрафиш в качестве модельного организма: эндотелиальная и митохондриальная дисфункция, окислительный стресс. *Фармация и фармакология*. 2025;13(2):70-83. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-2-70-83

© Н.Е. Москалева, П.М. Резванов, В.М. Самойлов, В.Г. Варзиева, С.Н. Басханова, В.В. Тарасов, Е.А. Смолярчук, Д.А. Кудлай, С.А. Апполонова, 2025

For citation: N.E. Moskaleva, P.M. Rezvanov, V.M. Samoylov, V.G. Varzieva, S.N. Baskhanova, V.V. Tarasov, E.A. Smolyarchuk, D.A. Kudlay, S.A. Appolonova. Metabolomics in drugs research on zebrafish-based cardiotoxicity models: endothelial and mitochondrial dysfunction, oxidative stress. *Pharmacy & Pharmacology*. 2025;13(2):70-83. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-2-70-83

показателей указывает на нарушение энергетического обмена миокарда, накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов свидетельствует о неполном β -окислении жирных кислот. Рост концентрации ADMA ассоциирован с эндотелиальной дисфункцией, а увеличение метионин-сульфооксида — с усилением оксидативного стресса.

Ключевые слова: кардиотоксичность; метаболомика; Данио-рерио; зебрафиш; аминокислоты; ацилкарнитины

Список сокращений: КС — кардиотоксичность; ЛС — лекарственное средство; ADMA — асимметричный диметиларгинин; BCAA — сумма аминокислот с разветвлённой цепью (валин+лейцин+изолейцин); ДМСО — диметилсульфоксид; FC (Fold Change) — отношение концентрации в образце к концентрации в контроле; NOEC — концентрация, не оказывающая эффекта; SDMA — симметричный диметиларгинин; GSG — комбинация аминокислот, вовлечённых с синтез глутатиона, глутамат/(серин+глицин); GABR — индекс общей доступности аргинина, аргинин/(цитруллин+орнитин); АФК — активные формы кислорода.

Metabolomics in drugs research on zebrafish-based cardiotoxicity models: endothelial and mitochondrial dysfunction, oxidative stress

N.E. Moskaleva¹, P.M. Rezvanov¹, V.M. Samoylov¹, V.G. Varzieva¹, S.N. Baskhanova¹,
V.V. Tarasov¹, E.A. Smolyarchuk¹, D.A. Kudlay^{1, 2, 3}, S.A. Appolonova¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),

2 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bldg 4, Moscow, Russia, 119435

²Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991

³State Research Center Institute of Immunology,

24 Kashirskoe Hwy, Moscow, 115522, Russia

E-mail: moskaleva_n_e@staff.sechenov.ru

Received 05 Jan 2025

After peer review 24 June 2025

Accepted 06 July 2025

The aim. To investigate the metabolic profile of zebrafish embryos when exposed to drugs with known risks of cardiotoxicity, such as acetaminophen, carbamazepine, salbutamol, ketorolac, bisoprolol, and metoprolol. The analysis is aimed at detecting changes in the level of amino acids (including branched chain BCAAs), products of carnitine metabolism (acylcarnitines) and related metabolic indices reflecting mitochondrial dysfunction, oxidative stress and disorders of the nitric oxide signaling pathway.

Materials and methods. Zebrafish embryos were incubated with the test substances in a concentration gradient (0.5–10×NOEC). A quantitative targeted metabolomics analysis was performed using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) with a panel of 98 metabolites (amino acids, nitric oxide metabolism products, vitamins, nucleosides and acylcarnitines). The obtained concentrations of metabolites were compared with the control (0.1% DMSO). Statistically significant deviations were expressed as the ratio of concentration to control on a base 2 logarithmic scale ($\log_2FC$).

Results. Changes in concentrations of metabolites under the influence of cardiotoxic drugs were revealed. There was an accumulation of BCAAs (the sum of leucine, isoleucine, valine; $\log_2FC \approx 0.5–2.2$; $p < 0.05$) compared with the control, as well as an increase in the level of acylcarnitines, indicating mitochondrial dysfunction: for example, metoprolol and bisoprolol caused an increase in the ratio of the sum of acylcarnitines to free carnitine by more than 4–6 times ($\log_2FC = +3.8$ for bisoprolol and -1.27 for metoprolol; $p < 0.01$), as well as accumulation of long-chain acylcarnitines. Pronounced changes in indicators related to oxidative stress were noted: in the samples after exposure to beta-1 blockers (bisoprolol, metoprolol) and ketorolac, the concentration of methionine sulfoxide (by 80–130%, $p < 0.01$), the product of methionine oxidation, and the ratio of methionine sulfoxide/methionine increased, whereas when exposed to salbutamol, on the contrary, the level of methionine sulfoxide decreased (-120% , $p < 0.01$), indicating a multidirectional effect on the oxidative status. Violations of the nitric oxide signaling pathway were reflected in an increase in the level of asymmetric dimethylarginine.

Conclusion. Each of the analyzed compounds produced a specific metabolic “imprint” in Zebrafish samples, reflecting the mechanisms of their cardiotoxicity. An increase in BCAA levels and related indicators indicates a violation of myocardial energy metabolism, the accumulation of long-chain acylcarnitines indicates incomplete beta-oxidation of fatty acids. An increase in the concentration of ADMA is associated with endothelial dysfunction, and an increase in methionine sulfoxide is associated with increased oxidative stress.

Keywords: cardiotoxicity; metabolomics; zebrafish; zebrafish; amino acids; acylcarnitines.

Abbreviations: CTx — cardiotoxicity; ADMA — asymmetric dimethylarginine; BCAA — the sum of branched-chain amino acids (valine+leucine+isoleucine); DMSO — dimethyl sulfoxide; FC (Fold Change) — the ratio of concentration in the sample to concentration in the control; NOEC — concentration having no effect; SDMA — symmetric dimethylarginine; GSG — a combination of amino acids involved in the synthesis of glutathione, glutamate/(serine+glycine); GABR — arginine total availability index, arginine/(citrulline+ornithine); ROS — reactive oxygen species.

ВВЕДЕНИЕ

Кардиотоксичность (КС) лекарственных средств (ЛС) остаётся значимой проблемой в современной фармакологии и клинической практике, так как является причиной отказа на этапах разработки и отзыва ЛС на стадии постмаркетинга [1]. КС проявляется как результат сложного взаимодействия различных молекулярных механизмов повреждения сердца, таких как окислительный стресс (ОС), митохондриальная (МД) и эндотелиальная дисфункция (ЭД), нарушение функций ионных каналов [2–5].

Метаболомный анализ предоставляет возможность выявления биомаркеров повреждения миокарда. В частности, профили низкомолекулярных метаболитов (аминокислоты, продукты карнитинового обмена и др.) в плазме крови отражают характерные сдвиги в метаболизме при токсическом воздействии [3–5]. Например, повышение уровней разветвлённых аминокислот (ВСАА: лейцин, изолейцин, валин) ассоциировано с нарушением сократимости миокарда [6–8], а накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов свидетельствует о нарушениях митохондриального β -окисления и энергетического баланса [9–11]. Повышенная концентрация асимметричного диметиларгинина (ADMA), ингибитора NO-синтазы, коррелирует с нарушением ЭД и прогрессией сердечной недостаточности [12, 13].

Оценка КС ЛС в настоящее время проводится на клеточных системах с использованием кардиомиоцитов и на млекопитающих [14, 15]. Современные методы скрининга *in vitro* обеспечивают высокий уровень пропускной способности, но не отражают сложные взаимодействия, происходящие в целостном организме [15]. Исследования на млекопитающих обладают лучшей прогностической ценностью в отношении клинических результатов, но имеют низкую пропускную способность и высокую стоимость [15], что является причиной поиска других биологических моделей для исследования органотоксичности ЛС.

Зебрафиш (Данио-рерио) демонстрирует высокую степень метаболической консервативности и применяется для оценки токсичности различных соединений благодаря генетической гомологии с млекопитающими, прозрачности эмбрионов и высокой скорости развития [16–18]. Наиболее распространённым методом изучения КС с использованием зебрафиш в качестве модельного организма является выявление изменений сердечного ритма или скорости кровотока эмбрионов после инкубации с исследуемыми ЛС [19].

Морфологические данные интересно было бы дополнить информацией о механизмах токсического действия. Использование Данио-рерио в качестве биологической модели обеспечивает возможность

оценки системных эффектов ЛС в условиях целостного организма [20], позволяет выявить метаболомные маркеры, связанные с механизмами токсического влияния вещества на миокард [20], что может быть использовано для выявления органотоксичности при разработке новых ЛС.

ЦЕЛЮ настоящей работы было выявление специфических метаболомных изменений, возникающих при экспозиции эмбрионов Данио-рерио к различным кардиотоксичным препаратам, и установление связи этих изменений с предполагаемыми механизмами токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы

В работе использованы следующие реактивы и химические реагенты: вода деионизированная (18,2 МОм $\times$ см) была получена с использованием системы Millipore-Q (Merck, Дармштадт, Германия), натрия хлорид (NaCl), калия хлорид (KCl), кальция (II) хлорид (CaCl_2), магния сульфат (MgSO_4), метиленовый синий и аскорбиновая кислота (квалификации «ч») (Prime Chemical Group, Москва, Россия); ацетонитрил, метанол, муравьиная кислота «для ВЭЖХ», натрия метабисульфит «reagent grade» (Sigma-Aldrich, США). Для исследования использованы: сальбутамол и биспролола фумарат (British Pharmacopoeia (BP) Reference Standard, EDQM, США), ацетаминофен, кеторолак трометамин, цетиризина гидрохлорид, метопролола тартрат (Pharmaceutical Secondary Standard, Supelco, США), карбамазепин ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, США).

Среда ЕЗ содержала 5 мМ NaCl, 0,17 мМ KCl, 0,33 мМ CaCl_2 , 0,33 мМ MgSO_4 и 0,001% метиленового синего. Субстанции растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) или воде, а затем разбавляли в среде ЕЗ для получения концентрации для инкубации (конечная концентрация ДМСО составляла 0,1%).

Для количественного анализа использованы стандарты аминокислот и соединений, содержащих аминогруппу (Sigma-Aldrich, Германия) и изотопно-меченые стандарты (Toronto Research Chemicals, Канада). Для анализа ацилкарнитинов использованы внутренние изотопно-меченые стандарты (MassChrom Internal Standard Mix, Chromsystems, Германия).

Проведение исследований на зебрафиш

Данио-рерио дикого типа были получены и содержались в Центре биофармацевтического анализа и метаболомных исследований, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Рыбы принадлежали к одной популяции и были распределены по нерестовым группам случайным образом. Исследования проводились с автоматически контролируемым 24-часовым циклом (14 — свет,

10 — темнота), а температура была установлена на уровне $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Неоплодотворённые яйца и мёртвые эмбрионы были идентифицированы и отделены на 2 сут после оплодотворения, а живые эмбрионы использовались для исследования. Морфологические патологии, такие как пороки развития хвоста, уровни пигментации, форма хорд и сомитов, а также сердцебиение, оценивались с помощью светового микроскопа (Leica DM2000, Германия).

Для исследований использовались эмбрионы Данио-рерио 4 дня после оплодотворения (возраст до 120 часов), в связи с чем одобрения Этическим комитетом любого уровня в случае данного исследования не требовалось. Эмбрионы переносили в 12-луночные планшеты (по 20 эмбрионов на один биологический образец в одну лунку). Далее в каждую лунку добавляли по 5 мл раствора исследуемого препарата в среде ЕЗ без метиленового синего. Концентрации препаратов составляли от $0,5 \times \text{NOEC}$ до $10 \times \text{NOEC}$ (табл. 1), в контрольную группу добавляли 0,1% ДМСО в среде ЕЗ. NOEC определяли в экспериментах по острой токсичности, проведённых в соответствии с ГОСТ 33774-2016 «Методы испытания химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Острая токсичность для эмбрионов рыбы». Планшеты инкубировали в течение 4 ч. Для учета вариабельности каждый препарат был исследован в 3 повторных инкубациях. Дизайн исследования приведён на рисунке 1.

Подготовка пробы для ВЭЖХ-МС/МС анализа

После инкубации эмбрионы из каждой лунки (по 20 шт. в образце) переносили в микропробирки объемом 1,5 мл. Водную фазу удаляли и к образцу добавляли 10 мкл 13 мМ водного раствора метабисульфита натрия для предотвращения окисления метаболитов. Затем добавляли 500 мкл холодного метанола со смесью внутренних стандартов, обрабатывали ультразвуком в ледяной бане в течение 15 мин и центрифугировали (Centrifuge 5418R, Eppendorf AG, Германия) в течение 5 мин при 16 900 g при 4°C . После этого 450 мкл супернатанта выпаривали досуха. Остаток восстанавливали 100 мкл метанола, разбавляли 100 мкл деионизированной воды, центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 об/мин на той же центрифуге и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

ВЭЖХ-МС/МС анализ

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводился с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II, с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470A (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение выполнялось с помощью аналитической

колонки Acquity UPLC BEH C18 ($2,1 \times 50$ мм, 1,7 мкм) от Waters Corporation, США при 40°C . Подвижная фаза состояла из 0,1% водного раствора муравьиной кислоты (А) и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (В), подаваемых в программе градиентного элюирования со скоростью потока 0,5 мл/мин. Общее время анализа составило 5,0 мин. Образцы вводились в объёме 5 мкл.

Масс-спектрометрический анализ проводился в режиме мониторинга множественных реакций после электрораспылительной ионизации. Параметры масс-спектрометрии были следующими: напряжение капилляра — 3500 Вт, температура газа — 300°C , скорость потока газа — 11 л/мин. Параметры, специфичные для соединений (фрагментор, энергия столкновения) и оптимизированные для лучшего отклика каждого аналита, опубликованы в работе M.V. Kozhevnikova и соавт. [9]. Обработка исходных данных производилась с помощью программного обеспечения MassHunter (Agilent Technologies, США).

Статистический анализ

Количественный анализ соединений, содержащих аминогруппу, проводился методом внутреннего стандарта в соответствии с калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали программное обеспечение MassHunter (Agilent Technologies, США). Концентрации ацилкарнитинов в образцах определялись путем расчета отношения площадей пиков ацилкарнитинов и их внутренних стандартов (полуколичественный метод) при помощи программного обеспечения MassHunter (Agilent Technologies, США).

Данные из 3 повторных экспериментов были ранжированы и усреднены. Для оценки нормальности распределения данных использовался тест Шапиро–Уилка. В случае нарушения нормальности в одной из групп для сравнения концентраций между контрольной и тестовыми группами применялся непараметрический критерий Манна–Уитни. При отсутствии отклонений от нормальности применялся t -тест Уэлча. Значения при $p < 0,05$ считались значимыми. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения STATISTICA версии 10.0 (США).

Для выявления тенденции изменений метаболомного профиля рассчитывали отношение концентрации метаболита в тестовом образце к контролю (Fold Change), и выражали в логарифмическом масштабе по основанию 2 ($\log_2 FC$) [21].

Также рассчитывали соотношения метаболитов [22–24]: GSG индекс — комбинация аминокислот, вовлечённых в синтез глутатиона — глутамат/ (серин+глицин); BCAA — сумма аминокислот с разветвлённой цепью — валин+лейцин+изолейцин;

GABR — индекс общей доступности аргинина — аргинин/(цитруллин+орнитин); индекс Фишера — отношение суммы аминокислот с разветвлённой цепью к сумме ароматических аминокислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одной из основных проблем в использовании Данио-рерио в качестве биологической модели при метаболомных исследованиях остаётся высокая биологическая изменчивость, которая может усложнить интерпретацию результатов и снизить воспроизводимость [25]. Использование строго определённой стадии развития, стандартизация рациона и времени кормления снижает метаболические колебания [25]. Объединение 20 эмбрионов в один биологический образец нивелирует вариабельность, особенно на ранних стадиях развития [25]. Более воспроизводимые результаты получаются также, если интерпретировать отношения концентраций метаболитов в группах воздействия по сравнению с контролем.

В таблице 2 представлены изменения концентрации метаболомных маркеров (для максимальной концентрации $10 \times \text{NOEC}$), характерные для различных механизмов КС, которые наблюдались под влиянием исследуемых веществ. В отрицательном контроле (цетиризин) существенных сдвигов метаболитов не наблюдалось, значения *log2FC* близки к нулю ($p > 0,05$ для всех), что подтверждает отсутствие кардиотоксического эффекта у данного соединения. Напротив, кардиотоксичные вещества вызвали значимые изменения ряда маркеров. На основании полученных данных можно выделить характерные паттерны метаболомных изменений. Так, ацетаминофен (в максимальной дозе $\approx 10 \times \text{NOEC}$) привёл к умеренному повышению суммарных ВСАА и соотношения ADMA/аргинин. Карбамазепин вызвал наиболее выраженное повышение ADMA (*log2FC* $\approx 2,94$) и индекса (ADMA/аргинин) — эти сдвиги свидетельствуют о нарушении пути синтеза оксида азота (NO) и ЭД под действием карбамазепина. Сальбутамол (β_2 -адреномиметик) напротив, резко снижал уровень L-аргинина ($-1,832$) и ADMA ($-1,409$), но с повышением индекса ADMA/аргинин. Для сальбутамол также характерен самый высокий рост ВСАА (*log2FC* $\approx 1,38$) при снижении ацилкарнитина (C2) и свободного карнитина (C0), что указывает на усиление катаболизма углеводов и потребление карнитина. Кеторолак (НПВС) продемонстрировал наиболее значимое накопление ВСАА (*log2FC* $\approx 2,18$, $p = 0,001$), что может свидетельствовать о развивающемся энергетическом дисбалансе и осмотическом стрессе в кардиомиоцитах. Биспролол и метопролол (селективные β_1 -адреноблокаторы) вызывали схожие метаболические сдвиги, характерные

для состояния угнетения сердечной функции: умеренный рост ВСАА ($\approx +0,59$ и $+0,89$), значительное повышение ADMA ($+1,32$ и $+0,61$) на фоне снижения L-аргинина ($-1,25$ и $-1,14$) — признаки ЭД и снижения синтеза NO.

На рисунках 2–5 показана дозозависимая динамика изменения концентрации некоторых маркеров. Например, для ВСАА (Рис. 2) видно, что кардиотоксичные вещества привели к нарастающему (с дозой) увеличению суммарной концентрации. Особенно заметен рост ВСАА при воздействии кеторолака и сальбутамол — их кривые резко возрастали, достигая 3–4-кратного превышения контроля при максимальных концентрациях препаратов. Отношение ADMA/аргинин (Рис. 3) также отличалось: для карбамазепина отношение ADMA/аргинин было пропорционально дозе (индикатор подавления NO-синтазы), тогда как для кеторолака и сальбутамол отношение резко повышалось при добавлении минимального количества препарата ($0,5 \times \text{NOEC}$), а далее уже не менялось. Отношение метионин-сульфоксид/метионин (Рис. 4) оставалось неизменным при действии цетиризина и сальбутамол (последний даже несколько понизил его), однако возрастало при увеличении концентрации β_1 -адреноблокаторов и кеторолака — отражая усиление окислительного стресса в сердечной ткани. Наконец, отношение $(\text{C16} + \text{C18})/\text{C0}$ (Рис. 5) — показатель накопления длинноцепочечных ацилкарнитинов — практически не менялось под действием ацетаминофена, карбамазепина и сальбутамол, но резко увеличивалось для биспролола и метопролола при переходе к высоким концентрациям. Эти графические зависимости дополняют статистические данные таблицы, подтверждая наличие характерных метаболических «отпечатков» у разных механизмов КС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метаболомный профиль Данио-рерио менялся после действия кардиотоксических ЛС, имитируя метаболические последствия для сердца у млекопитающих. Согласно литературным данным, повышение уровня концентрации ВСАА в плазме крови человека ассоциировано с ухудшением сократимости миокарда и ухудшением прогноза при сердечной недостаточности [9], а накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов коррелирует с риском развития аритмий и неблагоприятными исходами при кардиомиопатиях [26]. Этим данным соответствуют также полученные нами результаты: препараты, известные способностью вызывать энергетическую недостаточность миокарда (кеторолак, β -блокаторы) [27], вызывали наибольший рост уровня ВСАА и ацилкарнитинов,

отражающий торможение цикла трикарбоновых кислот и β -окисления жирных кислот в сердечной ткани. Вероятным механизмом являлась перегрузка митохондрий жирными кислотами при одновременном угнетении их окисления — в случае β -блокаторов за счет снижения потребности в АТФ на фоне брадикардии и уменьшения коронарного кровотока, в случае кеторолака — вследствие угнетения биогенеза митохондрий при хроническом воспалении. Такой дисбаланс приводил к накоплению длинноцепочечных ацилкарнитинтов, которые способны нарушить работу ионных каналов и провоцировать аритмогенные эффекты [11].

Другим важным фактором КС является ЭД вследствие нарушения NO-сигнальной системы [8, 9]. Мы наблюдали значительное повышение уровня ADMA (ингибитора NO-синтазы) под влиянием ряда ЛС — особенно карбамазепина и β -блокаторов. Известно, что ADMA конкурентно вытесняет L-аргинин из активного центра эндотелиальной NO-синтазы, снижая продукцию NO и вызывая вазоконстрикцию и ишемию тканей [12]. Повышение концентрации ADMA в плазме считается фактором риска ЭД и сердечно-сосудистых нарушений [12]. В наших исследованиях рост ADMA сопровождался увеличением индекса ADMA/аргинин и снижением уровня L-аргинина (например, при метопрололе), что указывает на возможное истощение NO-зависимой вазодилатации.

Сальбутамол снижал концентрацию ADMA, вероятно, стимулируя синтез NO (адреналин и β_2 -агонисты повышают активность eNOS [28, 29]). Однако при этом наблюдалось резкое падение уровня L-аргинина, что в совокупности приводило к дисбалансу ADMA/аргинин. Тем не менее, у сальбутамола повышался уровень цитруллина (побочного продукта eNOS), что может свидетельствовать об активации NO-синтеза; снижение же аргинина, вероятно, связано с перераспределением его в другие пути (например, орнитинный цикл или синтез креатина). В целом, полученные данные показывают, что различные механизмы (увеличение ADMA, дефицит L-аргинина или их комбинация) вносят вклад в уменьшение биодоступности NO при действии токсичных доз ЛС, что потенциально ведёт к ухудшению перфузии миокарда и повышает его уязвимость к ишемии и аритмиям [12].

Нарушения азотистого обмена аминокислот под влиянием токсикантов проявились также в накоплении ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина, триптофана — практически при всех воздействиях. Повышение уровня фенилаланина и снижение отношения тирозин/фенилаланин типично для состояний сердечной

недостаточности и может свидетельствовать о снижении активности фенилаланин-гидроксилазы в печени (например, при гипоксии) [30]. Отношение тирозин/фенилаланин существенно возросло при воздействии β -блокаторов, что можно интерпретировать как усиленную конверсию фенилаланина в тирозин *in situ* или повышенный распад катехоламинов (образующих тирозин) при длительной β -блокаде. В любом случае накопление фенилаланина — маркер дисфункции печени или почек — возможно, отражает системное действие препаратов на весь организм даже при короткой экспозиции. Аналогично, повышение триптофана может быть связано с угнетением его метаболизма по кинурениновому пути, что нередко наблюдается при стрессорных воздействиях и воспалении.

ОС признан ключевым звеном КС многих ЛС [31], и в данном исследовании он наблюдался при воздействии β -блокаторов — значительное накопление метионин-сульфоксида указывает на повышенное образование активных форм кислорода (АФК) и окисление метионина. Это согласуется с клиническими данными, в которых сказано, что передозировка селективных β_1 -адреноблокаторов приводит к кардиогенному шоку с ишемией тканей, провоцируя выброс свободных радикалов и окисление липидов [27]. Ацетаминофен генерирует реактивные метаболиты в печени [32, 33]; в сердце же его про-оксидантный эффект проявился слабо (отмечалась лишь тенденция к снижению уровня метионин-сульфоксида), возможно, за счет компенсаторной активации антиоксидантных ферментов. Неожиданным оказалось снижение маркеров окисления при сальбутамоле — этот феномен может объясняться тем, что острое β -адренергическое воздействие активирует защитные пути (например, приток Ca^{2+} способен стимулировать синтез NO, обладающего антиоксидантными свойствами, а также включать экспрессию NRF2-зависимых генов антиоксидантной защиты). Более вероятно, что при сальбутамоле просто не возникает столь выраженного ОС, поскольку повышенный кровоток и метаболизм в условиях β -стимуляции не дают накапливаться восстановленным эквивалентам (поддерживая высокий уровень NAD^+/NADH). В свою очередь, кеторолак умеренно повысил концентрацию метионин-сульфоксида и таурина, что согласуется с данными о нефропатиях и кардиопатиях, вызываемых НПВП через образование АФК и истощение клеточных антиоксидантов [34].

В таблице 3 приведена сравнительная оценка вклада каждого из исследованных препаратов в развитие ключевых механизмов кардиотоксичности — МД, ОС и нарушения NO-сигнального пути.

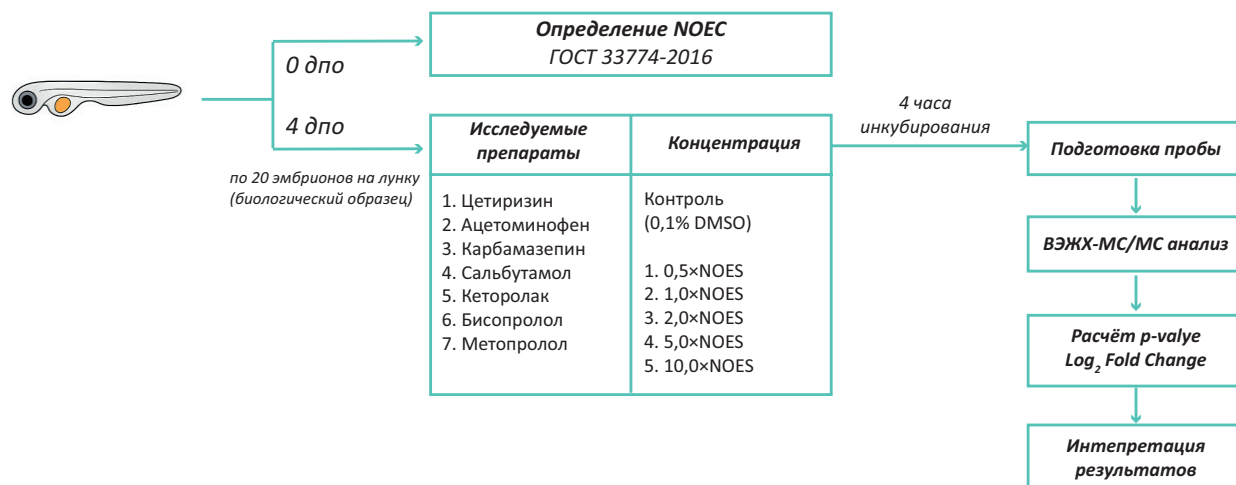


Рисунок 1 – Дизайн исследования

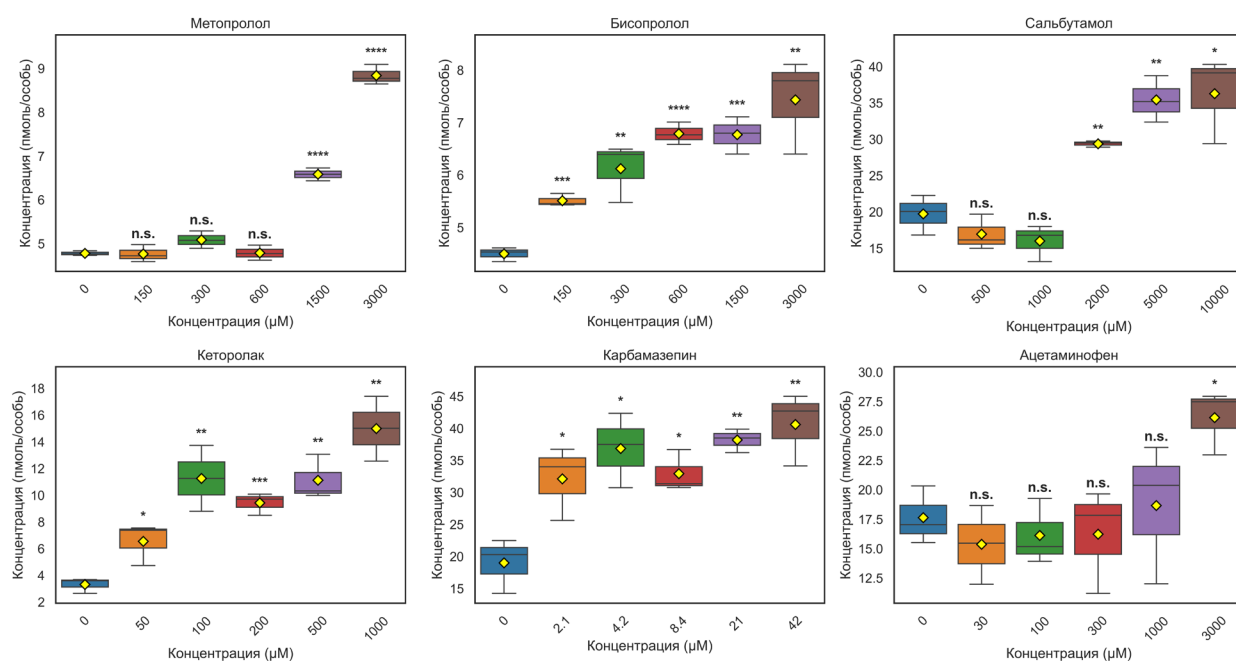


Рисунок 2 – Зависимость изменения уровня ВСАА (пмоль/особь) в эмбрионах Данио-рерио от концентрации исследуемых препаратов (μM).

Примечание: желтым ромбом отмечено медианное значение, n.s. — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

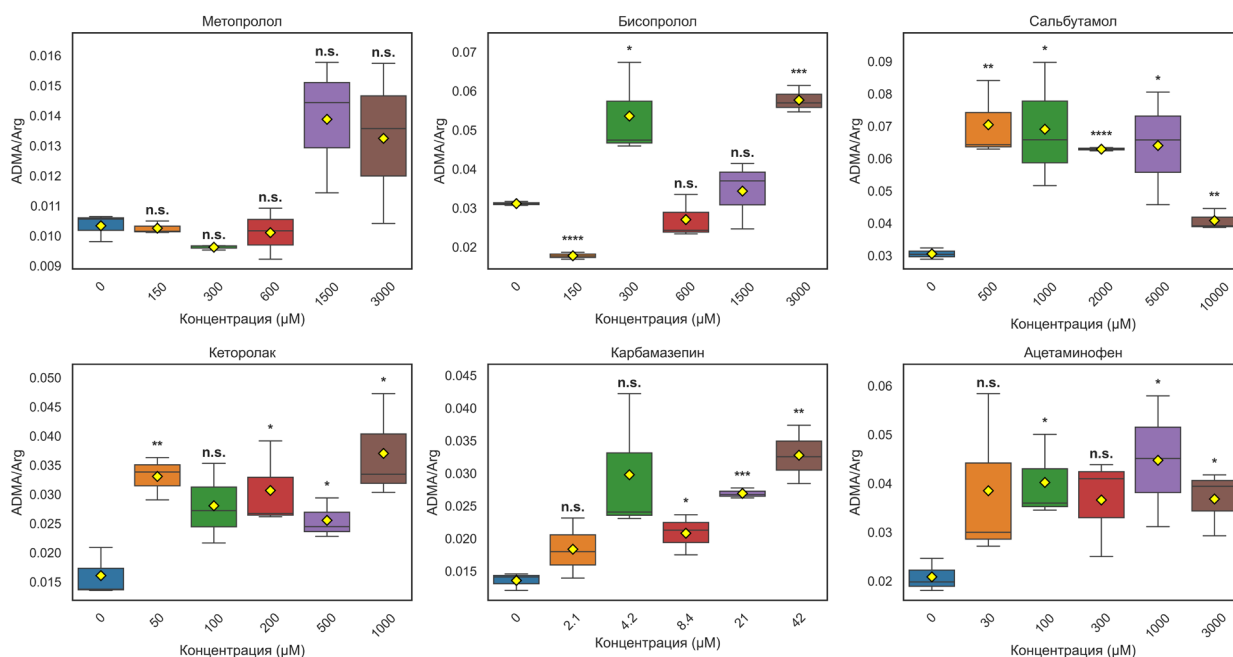


Рисунок 3 – Зависимость отношения концентраций ADMA/аргинин у эмбрионов Данио-рерио от концентрации исследуемых препаратов (μM).

Примечание: желтым ромбом отмечено медианное значение, n.s. — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

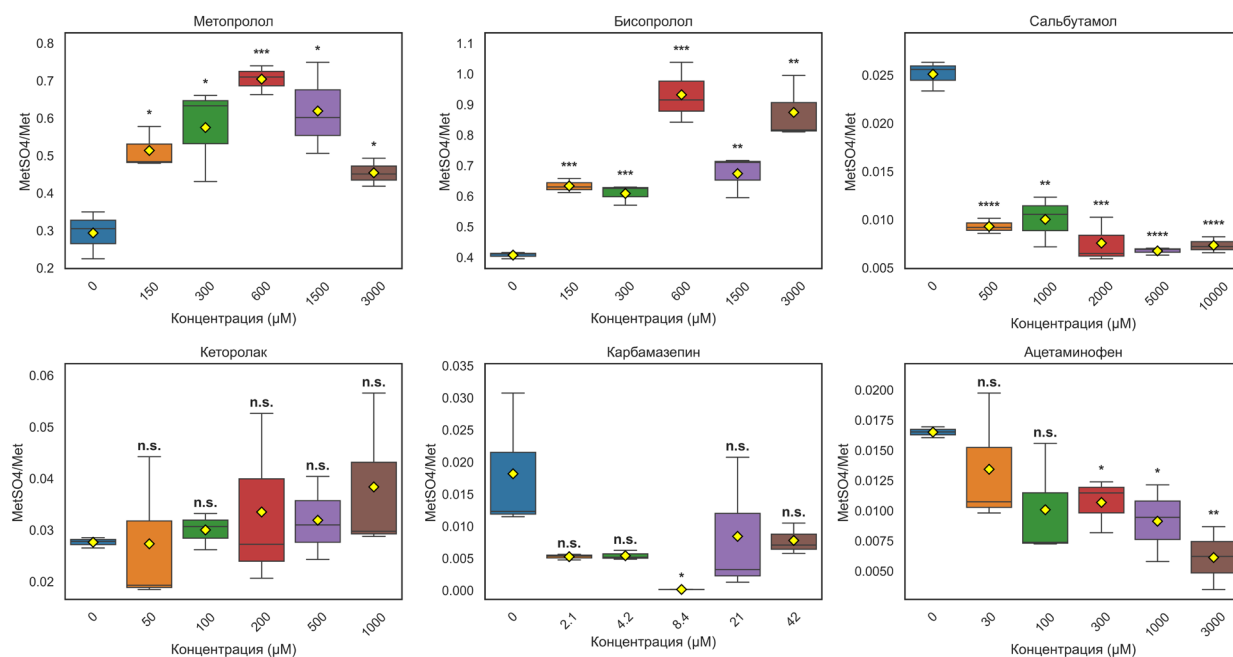


Рисунок 4 – Зависимость отношения концентраций метионин-сульфоксид (MetSO₄)/метионин в эмбрионах Данио-рерио от концентрации исследуемых препаратов (μM).

Примечание: желтым ромбом отмечено медианное значение, n.s. — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

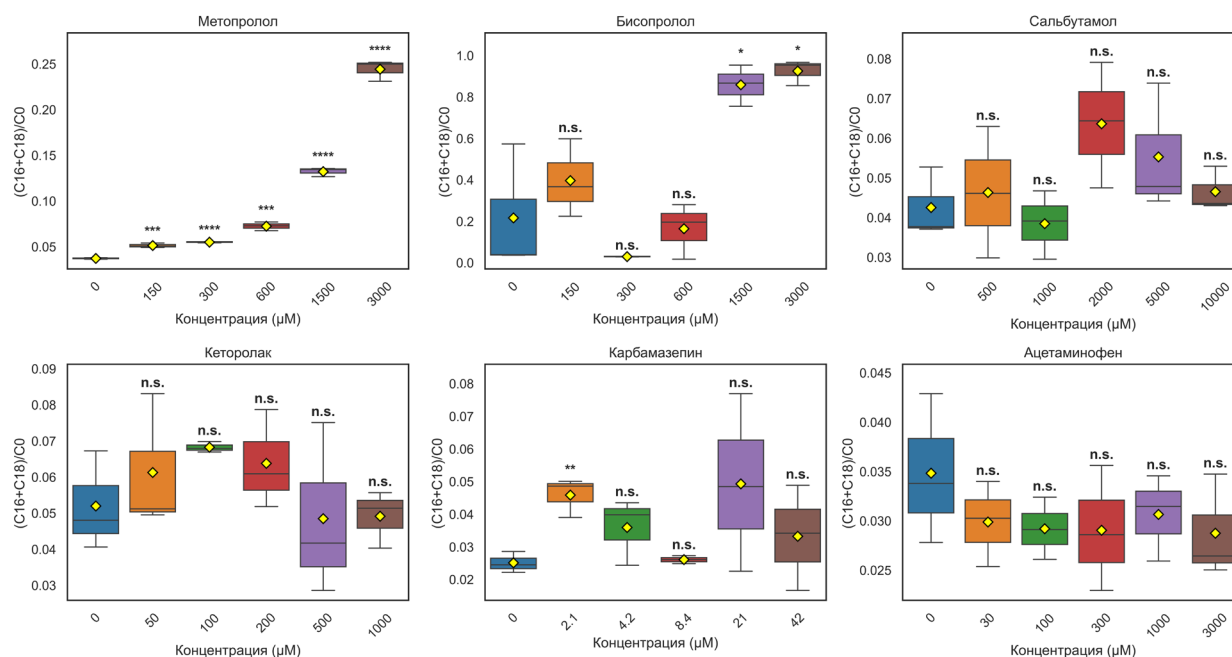


Рисунок 5 – Зависимость отношения концентраций $(C16+C18)/C0$ в эмбрионах Данио-рерио от концентрации исследуемых препаратов (μM).

Примечание: Желтым ромбом отмечено медианное значение, n.s. — $p > 0,05$, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

Таблица 1 – Исследуемые вещества

Исследуемые вещества	Основные мишени / механизм действия	Основное проявление кардиотоксичности ¹	НОЕС, μM	Концентрации, μM
Ацетаминофен	Ингибитор ЦОГ-1/2	Внезапная сердечная смерть (при передозировке)	300	150, 300, 600, 1500, 3000
Карбамазепин	Блокатор Na-каналов, усиление ГАМК-ергической передачи	Нарушения ритма сердца	4,2	2,1, 4,2, 8,4, 21, 42
Кеторолак трометамин	Ингибитор ЦОГ-2	Сердечная недостаточность (хронически)	100	50, 100, 200, 500, 1000
Метопролол (тарtrate)	$\beta 1$ -адреноблокатор	Острый инфаркт миокарда (передозировка)	300	150, 300, 600, 1500, 3000
Бисопролол (фумарат)	$\beta 1$ -адреноблокатор	Сердечная недостаточность (в высоких дозах)	300	150, 300, 600, 1500, 3000
Сальбутамол	$\beta 2$ -адреномиметик	Тахикардия (при передозировке)	1000	500, 1000, 2000, 5000, 10000
Цетиризина гидрохлорид	Блокатор H1-гистаминовых рецепторов	Нет кардиотоксичности	5	2,5, 5, 10, 25, 50

Примечание: ЦОГ — циклооксигеназа; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

¹ FDA's Adverse Event Reporting System (FAERS). — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.fda.gov/drugs/surveillance/fdas-adverse-event-reporting-system-faers>

Таблица 2 – Значения $\log_2 FC$ для измеряемых метаболитов (экспериментальная группа vs контроль) под влиянием разных соединений, при инкубировании в концентрации 10×NOEC

Метаболит / Индекс	Цетиризин	Ацетаминофен	Карбамазепин	Сальбутамол	Кеторолак	Бисопролол	Метопролол
Аминокислоты с разветвлённой цепью (BCAA)							
BCAA (лейцин+ изолейцин + валин)	–0,233 (0,080)	0,568 (0,016)	1,096 (0,006)	1,379 (0,001)	2,181 (0,001)	0,590 (<0,001)	0,887 (<0,001)
Σ (лейцин+изолейцин)	–0,047 (0,732)	0,615 (0,030)	1,359 (0,001)	1,113 (0,005)	2,522 (0,003)	0,450 (0,002)	0,885 (<0,001)
изолейцин	–0,216 (0,068)	0,521 (0,063)	0,753 (0,291)	1,694 (<0,001)	1,900 (0,012)	0,717 (0,001)	0,889 (<0,001)
Эндотелиальная дисфункция, NO–путь							
Индекс Фишера	–0,182 (0,080)	–0,428 (0,021)	–0,061 (0,841)	1,164 (0,006)	1,048 (0,013)	–0,868 (0,003)	–0,060 (0,145)
ADMA	–0,264 (0,255)	0,892 (0,061)	2,943 (<0,001)	–1,409 (<0,001)	–0,002 (0,996)	1,318 (0,008)	0,608 (0,037)
ADMA/аргинин	0,280 (0,076)	0,821 (0,021)	1,273 (0,002)	0,418 (0,009)	1,204 (0,022)	0,141 (0,560)	0,357 (0,138)
Аргинин	0,013 (0,913)	–0,246 (0,499)	1,637 (0,003)	–1,832 (<0,01)	–1,25 (0,012)	1,190 (<0,01)	–1,137 (<0,01)
Цитруллин/аргинин	0,529 (0,029)	0,144 (0,533)	–0,937 (<0,001)	1,655 (0,003)	1,245 (0,024)	–0,929 (0,263)	0,313 (0,597)
Гомоаргинин/ADMA	0,214 (0,599)	–0,803 (0,018)	–0,878 (0,058)	–0,390 (0,032)	–0,518 (0,339)	–0,279 (0,297)	–0,514 (0,048)
Гомоаргинин/SDMA	0,575 (0,161)	0,284 (0,381)	1,405 (0,150)	–0,390 (0,018)	–0,371 (0,380)	0,974 (0,003)	–0,037 (0,615)
Гомоаргинин	–0,090 (0,820)	–0,252 (0,473)	1,191 (0,002)	–1,809 (0,001)	0,549 (0,020)	0,977 (0,001)	0,060 (0,388)
SDMA	–0,648 (0,013)	0,559 (0,058)	1,032 (0,249)	–1,422 (0,007)	–0,150 (0,565)	0,007 (0,828)	0,097 (<0,001)
GABR	0,006 (0,952)	–0,260 (0,281)	0,780 (<0,001)	–1,345 (0,001)	–0,823 (0,068)	1,256 (<0,001)	0,578 (0,010)
Окислительный стресс							
Метионин	–0,842 (0,012)	0,500 (0,023)	0,825 (0,270)	0,207 (–0,202)	0,556 (0,165)	–0,017 (0,856)	0,759 (<0,001)
Метионин–сульфоксид	–1,205 (0,001)	–0,877 (0,055)	–0,279 (0,403)	–1,579 (<0,001)	0,927 (0,006)	0,700 (<0,001)	1,389 (0,001)
Метионин–сульфоксид /метионин	–0,352 (0,102)	–1,434 (0,002)	0,011 (0,963)	–1,776 (<0,001)	0,474 (0,304)	0,727 (0,003)	0,631 (0,019)
Глутамин	–0,998 (0,005)	–0,661 (0,035)	0,280 (0,418)	–0,733 (0,005)	0,038 (0,897)	1,502 (0,003)	–0,875 (0,001)
Глутамат	–0,441 (0,028)	–0,674 (0,037)	0,011 (0,963)	–0,733 (0,005)	0,277 (0,453)	1,829 (0,016)	–0,815 (0,002)
Глутамин/глутамат	–0,569 (0,044)	–0,027 (0,922)	0,213 (0,386)	–1,662 (0,003)	–0,192 (0,423)	–0,176 (0,666)	–0,060 (0,158)
GSG	–0,433 (0,222)	–0,055 (0,466)	–0,233 (0,542)	1,448 (0,007)	0,251 (0,013)	1,109 (0,043)	0,834 (0,025)
Таурин	0,094 (0,475)	–0,321 (0,124)	0,017 (0,930)	–0,339 (0,224)	0,644 (0,016)	0,056 (0,657)	0,693 (0,002)
Митохондриальная дисфункция							
C0	0,454 (0,241)	–0,735 (0,01)	0,080 (0,329)	0,442 (0,081)	–0,394 (0,203)	–1,243 (<0,01)	–1,866 (<0,01)
C2	1,267 (0,049)	–0,607 (0,064)	1,258 (0,004)	0,322 (0,226)	0,429 (0,030)	1,366 (0,133)	1,901 (<0,001)
(C2+C3)/C0	1,009 (0,015)	–0,501 (0,090)	1,205 (0,001)	0,060 (0,830)	0,735 (0,007)	1,603 (0,076)	2,394 (<0,001)
C2/C0	1,510 (0,108)	–0,748 (0,051)	1,347 (0,016)	0,623 (0,059)	–0,003 (0,992)	1,154 (0,215)	1,304 (<0,001)
(C16+C18)/C0	0,164 (0,420)	0,826 (0,021)	1,438 (0,056)	0,327 (0,014)	0,282 (0,122)	3,809 (0,009)	1,268 (<0,01)
Обмен липидов							
C18:1/C18	0,454 (0,241)	–0,735 (0,01)	0,080 (0,329)	0,442 (0,081)	–0,394 (0,203)	–1,243 (<0,01)	–1,866 (<0,001)
(C16+C18:1)/C2	1,267 (0,049)	–0,607 (0,064)	1,258 (0,004)	0,322 (0,226)	0,429 (0,030)	1,366 (0,133)	1,901 (<0,001)
C16/C0	1,009 (0,015)	–0,501 (0,090)	1,205 (0,001)	0,060 (0,830)	0,735 (0,007)	1,603 (0,076)	2,394 (<0,001)
C18:1/C0	1,510 (0,108)	–0,748 (0,051)	1,347 (0,016)	0,623 (0,059)	–0,003 (0,992)	1,154 (0,215)	1,304 (<0,001)
Σ (ацилкарнитины)/C0	0,164 (0,420)	0,826 (0,021)	1,438 (0,056)	–0,327 (0,014)	–0,282 (0,122)	3,809 (0,009)	–1,268 (<0,01)
C3/C2	0,637 (0,067)	0,372 (0,062)	0,115 (0,781)	0,263 (0,233)	–0,188 (0,344)	–0,463 (0,063)	0,355 (<0,001)
C4/C2	0,243 (0,290)	–0,020 (0,958)	0,348 (0,228)	0,221 (0,160)	–0,871 (0,002)	–0,625 (0,008)	3,594 (<0,001)
C8/C10	–0,595 (0,082)	–0,414 (0,075)	0,190 (0,684)	0,493 (0,139)	0,248 (0,423)	0,552 (0,373)	–1,881 (0,331)
Σ (C2–C5)	–0,446 (0,007)	–0,022 (0,879)	0,381 (0,058)	–0,406 (0,043)	–0,001 (0,997)	1,367 (0,008)	1,095 (<0,001)
Σ (C6–C12)	–0,295 (0,011)	–1,731 (0,001)	0,295 (0,435)	0,138 (0,070)	–0,023 (0,873)	0,023 (0,876)	–0,120 (0,085)
Σ (C14–C18)	0,066 (0,247)	–0,937 (0,005)	0,523 (0,029)	0,488 (<0,001)	0,137 (0,345)	–0,352 (0,001)	1,547 (<0,001)
Ароматические аминокислоты							
Фенилаланин	–0,031 (0,633)	1,115 (<0,01)	1,157 (<0,01)	0,027 (0,887)	1,129 (<0,01)	0,559 (<0,01)	0,617 (<0,01)
Треонин	–0,501 (0,011)	0,043 (0,816)	–0,161 (0,232)	–0,546 (0,022)	–0,050 (0,855)	1,128 (<0,01)	2,561 (<0,01)
Триптофан	–0,520 (0,047)	0,695 (0,015)	0,454 (0,623)	0,104 (0,443)	0,877 (0,026)	1,684 (<0,01)	1,032 (<0,001)
Тирозин	0,302 (0,120)	1,078 (0,021)	1,306 (<0,01)	0,429 (0,033)	1,287 (<0,01)	2,312 (<0,01)	1,364 (<0,01)
Тирозин/фенилаланин (Tyr/Phe)	0,340 (0,170)	0,025 (0,715)	–0,025 (0,963)	0,149 (0,502)	0,105 (0,750)	1,758 (0,001)	0,738 (0,006)

Примечание: Данные представлены в виде $\log_2 FC$ (p-value). Жирным выделены изменения с $|\log_2 FC| > 1$ при $p < 0,01$. C0 — карнитин; C2 — ацетилкарнитин; C3 — пропионилкарнитин; C4 — бутирилкарнитин; C5 — изовалерилкарнитин; C6 — гексаноилкарнитин; C8 — октаноилкарнитин; C10 — деканоилкарнитин; C12 — додеканоилкарнитин; C14 — тетрадеканоилкарнитин; C16 — гексадеканоилкарнитин; C18 — стеариолкарнитин; C18:1 — линалеилкарнитин.

**Таблица 3 – Относительный вклад исследуемых препаратов по трем критериям
 (митохондриальная дисфункция, оксидативный стресс, нарушение NO-сигнального пути)**

Вещество	Митохондриальная дисфункция	Оксидативный стресс	Нарушение NO-сигнального пути
Цетиризин	–	–	–
Ацетаминофен	+	–	+
Карбамазепин	+	–	+++
Сальбутамол	+	–	++
Кеторолак	+++	++	++
Бисопролол	+++	+++	+++
Метопролол	+++	+++	+++

Примечание: «+++» — максимальный, «++» — сильный, «+» — умеренный, «–» — отсутствие вклада.

Как видно из таблицы 3, наиболее значимая дисфункция митохондрий наблюдалась при действии β 1-адреноблокаторов (бисопролол, метопролол) и кеторолака — эти препараты вызывали максимальное накопление ацилкарнитинов и связанных с ними показателей. В отношении ОС лидируют те же β 1-адреноблокаторы (значительное повышение метионин-сульфоксида), несколько меньший вклад вносит кеторолак, тогда как ацетаминофен и сальбутамол практически не вызывали прооксидантных эффектов. Нарушение NO-сигнального пути наиболее выражено у карбамазепина (максимальное повышение ADMA) и β 1-адреноблокаторов (значительное повышение ADMA при одновременном снижении аргинина); кеторолак, ацетаминофен и сальбутамол оказали умеренное влияние на этот путь. Таким образом, системный метаболомный анализ выявил комплекс взаимосвязанных механизмов КС у эмбрионов зебрафиш после воздействия препаратов. Накопление ADMA и ацилкарнитинов в сердечной ткани отражает энергетический дисбаланс.

Адекватность модели

Использование эмбрионов зебрафиш для оценки кардиометаболических эффектов ЛС оправдано высокой консервативностью основных метаболических и сигнальных путей у рыб и млекопитающих. Несмотря на некоторые количественные различия (например, интенсивность окислительного метаболизма у эмбрионов рыб ниже, чем в сердце взрослых млекопитающих), качественные сдвиги в метаболомном профиле под воздействием токсикантов демонстрируют хорошую воспроизводимость закономерностей, известных у высших организмов. Наши данные согласуются с результатами других исследований. Так, ранее кардиотоксические эффекты связывали с повышением уровня BCAA и ароматических аминокислот, связанных с метаболической перегрузкой сердца [9, 35], а также с накоплением длинных ацилкарнитинов как предвестника развития дисфункции миокарда [36, 37]. Важно подчеркнуть, что зебрафиш как экспериментальная модель позволяет отслеживать эти изменения на ранних стадиях, еще до появления необратимых

морфологических нарушений, что открывает возможность их использования в скрининге кардиотоксичности новых соединений.

Ограничения исследования

К ограничениям данного исследования можно отнести относительно короткое время экспозиции (4 ч), что имитирует острые эффекты, но не отражает возможные компенсаторно-приспособительные реакции при длительном воздействии. Например, при хроническом введении β -адреноблокаторов организм млекопитающих адаптируется за счет увеличения плотности β -рецепторов, улучшения коронарного кровотока, что смягчает метаболические сдвиги — у рыб аналогичные механизмы также могут снижать токсичность. Кроме того, использованные нами концентрации препаратов (до $10 \times \text{NOEC}$) достаточно высоки для выявления сублетальных эффектов; в реальной клинической ситуации такие дозы соответствуют передозировкам. Однако именно в условиях передозировки проявляются механизмы токсичности «в чистом виде», что и требовалось продемонстрировать. Кроме того, мы не учитывали гендерные различия и влияние гормонального фона (эмбрионы до половой дифференцировки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что метаболомика эмбрионов Данио-рерио отразила эффекты кардиотоксичных препаратов, выявляя специфические изменения метаболических биомаркеров. В частности, для препаратов с риском аритмии (сальбутамол, карбамазепин) характерно накопление BCAA и дисбаланс NO/ADMA; для кардиодепрессантов (селективных β 1-адреноблокаторов) — выраженная МД с накоплением ацилкарнитинов и ОС; для нестероидных противовоспалительных препаратов (кеторолак) — сочетание умеренно выраженных энергетических и окислительных сдвигов. При этом ацетаминофен вызвал лишь незначительные метаболические изменения, а контрольный антигистаминный препарат цетиризин не влиял на рассматриваемые параметры, что подтверждает отсутствие кардиотоксичности в данной модели.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124031100079-6. Тема НИОКР (ПНИЭР): «Разработка цифровых моделей прогнозирования органотоксичности лекарственных средств на основе данных метаболомного анализа с использованием альтернативной биологической модели».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Е. Москалева — проведение экспериментальной части работы, статистическая обработка полученных результатов, подготовка предварительного варианта рукописи; В.М. Самойлов — проведение экспериментальной части работы, обзор литературных источников по теме исследования; П.М. Резванов — проведение экспериментальной части работ, статистическая обработка полученных результатов; В.Г. Варзиева — проведение экспериментальной части работы; С.Н. Басханова — статистическая обработка полученных результатов; В.В. Тарасов — утверждение окончательного варианта рукописи; Е.А. Смолярчук — анализ литературных данных по теме исследования и результатов, полученных в работе; Д.А. Кудлай — анализ результатов работы с их интерпретацией и выводами, утверждение окончательного варианта рукописи; С.А. Апполонова — разработка концепции исследования, утверждение окончательного варианта рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature // *BMC Medicine*. – 2016. – Vol. 14. – P. 10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2
2. Ferdinandy P., Baczkó I., Bencsik P., Giricz Z., Görbe A., Pacher P., Varga Z.V., Varró A., Schulz R. Definition of hidden drug cardiotoxicity: paradigm change in cardiac safety testing and its clinical implications // *Eur Heart J*. – 2018. – Vol. 40, No. 22. – P. 1771–1777. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy365
3. Ussher J.R., Elmariah S., Gerszten R.E., Dyck J.R.B. The Emerging Role of Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease // *J Am College Cardiol*. – 2016. – Vol. 68, No. 25. – P. 2850–2870. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.09.972
4. Singh A., Bakhtyar M., Jun S.R., Boerma M., Lan R.S., Su L.J., Makhoul S., Hsu P.C. A narrative review of metabolomics approaches in identifying biomarkers of doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Metabolomics*. – 2025. – Vol. 21. – P. 68. DOI: 10.1007/s11306-025-02258-8
5. Rhee E.P., Gerszten R.E. Metabolomics and Cardiovascular Biomarker Discovery // *Clin Chem*. – 2011. – Vol. 58, No. 1. – P. 139–147. DOI: 10.1373/clinchem.2011.169573
6. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements // *Nutrition & Metabolism*. – 2018. – Vol. 15. – P. 33. DOI: 10.1186/s12986-018-0271-1.
7. Gao C., Hou L. Branched chain amino acids metabolism in heart failure // *Front Nutrition*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1279066. DOI: 10.3389/fnut.2023.1279066
8. Kozhevnikova M.V., Belenkov Y.N., Shestakova K.M., Ageev A.A., Markin P.A., Kakotkina A.V., Korobkova E.O., Moskaleva N.E., Kuznetsov I.V., Khabarova N.V., Kukharensko A.V., Appolonova S.A. Metabolomic profiling in heart failure as a new tool for diagnosis and phenotyping // *Sci Rep*. – 2025. – Vol. 15. – P. 11849. DOI: 10.1038/s41598-025-95553-2
9. Kozhevnikova M.V., Kakotkina A.V., Korobkova E.O., Kuznetsov I.V., Shestakova K.M., Moskaleva N.E., Appolonova S.A., Belenkov Y.N. Metabolomic Panel for the Diagnosis of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction // *Int J Mol Sci*. – 2025. – Vol. 26. – P. 2102. DOI: 10.3390/ijms26052102
10. Aitken-Buck H.M., Krause J., Zeller T., Jones P.P., Lamberts R.R. Long-Chain Acylcarnitines and Cardiac Excitation-Contraction Coupling: Links to Arrhythmias // *Front Physiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 577856. DOI: 10.3389/fphys.2020.577856
11. Kukharensko A., Brito A., Kozhevnikova M.V., Moskaleva N., Markin P.A., Bochkareva N., Korobkova E.O., Belenkov Y.N., Privalova E.V., Larcova E.V., Ariani A., La Frano M.R., Appolonova S.A. Relationship between the plasma acylcarnitine profile and cardiometabolic risk factors in adults diagnosed with cardiovascular diseases // *Clin Chim Acta*. – 2020. – Vol. 507. – P. 250–256. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.035
12. Sibal L., Agarwal S.C., Home P.D., Boger R.H. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease // *Cur Cardiology Rev*. – 2010. – Vol. 6, No. 2. – P. 82–90. DOI: 10.2174/157340310791162659
13. Markin P.A., Ponomarenko E.A., Romashova Y.A., Pleshakova T.O., Ivanov S.V., Bedretdinov F.N., Konstantinov S.L., Nizov A.A., Koledinskii A.G., Girivenko A.I., Shestakova K.M., Markin P.A., Moskaleva N.E., Kozhevnikova M.V., Chefranova Zh.Yu., Appolonova S.A. A novel preliminary metabolomic panel for IHD diagnostics and pathogenesis // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – P. 2651. DOI: 10.1038/s41598-024-53215-9
14. Brito-Martins M., Harding S.E., Ali N.N. beta(1)- and beta(2)-adrenoceptor responses in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: comparison with failing and non-failing adult human heart // *Br J Pharmacol*. – 2008. – Vol. 153, No. 4. – P. 751–759. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707619
15. Asnani A., Moslehi J.J., Adhikari B.B., Baik A.H., Beyer A.M., de Boer R.A., Ghigo A., Grumbach I.M., Jain S., Zhu H.; American Heart Association Council on Basic Cardiovascular

- Sciences; Cardio-Oncology Science Subcommittee of Council on Genomic and Precision Medicine and Council on Clinical Cardiology; Council on Peripheral Vascular Disease; and Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. Preclinical Models of Cancer Therapy-Associated Cardiovascular Toxicity: A Scientific Statement From the American Heart Association // *Circ Res.* – 2021. – Vol. 129, No. 1. – P. e21–e34. DOI: 10.1161/RES.0000000000000473
16. Wang W., Gao X., Liu L., Guo S., Duan J.A., Xiao P. Zebrafish as a Vertebrate Model for High-Throughput Drug Toxicity Screening: Mechanisms, Novel Techniques, and Future Perspectives // *J Pharm Analysis.* – 2025. – P. 101195. DOI: 10.1016/j.jpha.2025.101195
17. Markin P.A., Brito A., Moskaleva N.E., Tagliaro F., La Frano M.R., Savitskii M.V., Appolonova S.A. Short- and long-term exposures of the synthetic cannabinoid 5F-APINAC induce metabolomic alterations associated with neurotransmitter systems and embryotoxicity confirmed by teratogenicity in zebrafish // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* – 2021. – Vol. 243. – P. 109000. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109000
18. Markin P.A., Brito A., Moskaleva N.E., Tagliaro F., Tarasov V.V., La Frano M.R., Savitskii M.V., Appolonova S.A. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae // *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* – 2021. – Vol. 38. – P. 100816. DOI: 10.1016/j.cbd.2021.100816
19. Dyballa S., Miñana R., Rubio-Brotons M., Cornet C., Pederzani T., Escaramis G., Garcia-Serna R., Mestres J., Terriente J. Comparison of Zebrafish Larvae and hiPSC Cardiomyocytes for Predicting Drug-Induced Cardiotoxicity in Humans // *Toxicol Sci.* – 2019. – Vol. 171, No. 2. – P. 283–295. DOI: 10.1093/toxsci/kfz165
20. Zakaria Z.Z., Benslimane F.M., Nasrallah G.K., Shurbaji S., Younes N.N., Mraiche F., Da'as S.I., Yalcin H.C. Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity // *BioMed Res Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1642684. DOI: 10.1155/2018/1642684
21. Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – Vol. 98, No. 9. – P. 5116–5121. – DOI: 10.1073/pnas.091062498
22. Morris C.R., Hamilton-Reeves J., Martindale R.G., Sarav M., Ochoa Gautier J.B. Acquired amino acid deficiencies: a focus on arginine and glutamine // *Nutr Clin Pract.* – 2017. – Vol. 32, Suppl. 1. – P. 30S–47S.
23. Rees C.A., Rostad C.A., Mantus G., Anderson E.J., Chahroudi A., Jaggi P., Wrammert J., Ochoa J.B., Ochoa A., Basu R.K., Heilman S., Harris F., Lapp S.A., Hussaini L., Vos M.B., Brown L.A., Morris C.R. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – Vol. 118, No. 25. – P. e2101708118.
24. Masoodi M., Gastaldelli A., Hyötyläinen T., Arretxe E., Alonso C., Gaggini M., Brosnan J., Anstee Q.M., Millet O., Ortiz P., Mato J.M., Dufour J.F., Orešič M. Metabolomics and lipidomics in NAFLD: biomarkers and non-invasive diagnostic tests // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – Vol. 18, No. 12. – P. 835–856. DOI: 10.1038/s41575-021-00502-9
25. Leonetti S., Herzog R.I., Caprio S., Santoro N., Tricò D. Glutamate–serine–glycine index: a novel potential biomarker in pediatric non-alcoholic fatty liver disease // *Children.* – 2020. – Vol. 7, No. 12. – P. 270.
26. Da Silva K.M., Iturrospe E., Bars C., Knapen D., Van Cruchten S., Covaci A., Van Nuijs A.L.N. Mass spectrometry-based zebrafish toxicometabolomics: a review of analytical and data quality challenges // *Metabolites.* – 2021. – Vol. 11, No. 9. – P. 635. DOI: 10.3390/metabo11090635
27. Moskaleva N.E., Shestakova K.M., Kukharencov A.V., Markin P.A., Kozhevnikova M.V., Korobkova E.O., Brito A., Baskhanova S.N., Mesonzhnik N.V., Belenkov Y.N., Pyatigorskaya N.V., Tobolkina E., Rudaz S., Appolonova S.A. Target Metabolome Profiling-Based Machine Learning as a Diagnostic Approach for Cardiovascular Diseases in Adults // *Metabolites.* – 2022. – Vol. 12, No. 12. – P. 1185. DOI: 10.3390/metabo12121185
28. Drygała S., Radzikowski M., Maciejczyk M. β -blockers and metabolic modulation: unraveling the complex interplay with glucose metabolism, inflammation and oxidative stress // *Front Pharmacol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1489657. DOI: 10.3389/fphar.2024.1489657
29. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *European Heart Journal.* – 2012. – Vol. 33, No. 7. – P. 829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr30
30. Adding L.C., Agvald P., Artlich A., Persson M.G., Gustafsson L.E. Beta-adrenoceptor agonist stimulation of pulmonary nitric oxide production in the rabbit // *Br J Pharmacol.* – 1999. – Vol. 126, No. 3. – P. 833–839. – DOI: 10.1038/sj.bjp.0702369
31. Cheng M.L., Wang C.H., Shiao M.S., Liu M.H., Huang Y.Y., Huang C.Y., Mao C.T., Lin J.F., Ho H.Y., Yang N.I. Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure: diagnostic and prognostic value of metabolomics // *J Am Coll Cardiol.* – 2015. – Vol. 65, No. 15. – P. 1509–1520. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.02.018
32. Sabbatino F., Conti V., Liguori L., Polcaro G., Corbi G., Manzo V., Tortora V., Carlomagno C., Vecchione C., Filippelli A., Pepe S. Molecules and mechanisms to overcome oxidative stress inducing cardiovascular disease in cancer patients // *Life.* – 2021. – Vol. 11, No. 2. – P. 105. DOI: 10.3390/life11020105
33. Ramachandran A., Duan L., Akakpo J.Y., Jaeschke H. Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: current understanding and future perspectives // *J Clin Translat Res.* – 2018. – Vol. 4, No. 1. – P. 75–100. DOI: 10.18053/jctres.04.201801.005
34. Bashir S., Morgan W.A. Inhibition of mitochondrial function: An alternative explanation for the antipyretic and hypothermic actions of acetaminophen // *Life Sci.* – 2023. – Vol. 312. – P. 121194. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121194
35. Hosohata K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 17, No. 11. – P. 1826. DOI: 10.3390/ijms17111826.
36. Fine K.S., Wilkins J.T., Sawicki K.T. Circulating branched chain amino acids and cardiometabolic disease // *J Am Heart Association.* – 2024. – Vol. 13. – P. e031617. DOI: 10.1161/JAHA.123.031617
37. Truby L.K., Regan J.A., Giamberardino S.N., Ilkayeva O., Bain J., Newgard C.B., O'Connor C.M., Felker G.M., Kraus W.E., McGarrah R.W., Shah S.H. Circulating long chain acylcarnitines and outcomes in diabetic heart failure: an HF-ACTION clinical trial substudy // *Cardiovasc Diabetol.* – 2021. – Vol. 20, No. 1. – P. 161. DOI: 10.1186/s12933-021-01353-z

АВТОРЫ

Москалева Наталья Евгеньевна — кандидат биологических наук, заместитель руководителя Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0002-7309-8913. E-mail: moskaleva_n_e@staff.sechenov.ru

Резванов Павел Марсельевич — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биоинформатики и фармакологического моделирования Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0009-0006-8806-6902. E-mail: rezvanov_p_m@staff.sechenov.ru

Самойлов Виктор Михайлович — студент 5 курса факультета медицинской биохимии, лаборант Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0009-0009-5460-011X. E-mail: vmSamoilov@gmail.com

Варзиева Валерия Георгиевна — младший научный сотрудник Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0002-9067-8717. E-mail: varzieva_v_g@staff.sechenov.ru

Басханова Сабина Набийбуллаевна — научный сотрудник Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0001-8716-1672. E-mail: baskhanova_s_n@staff.sechenov.ru

Тарасов Вадим Владимирович — доктор фармацевтических наук, директор Института трансляционной медицины и биотехнологии, проректор по научно-технологическому развитию ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0002-9394-7994. E-mail: tarasov_v_v_2@staff.sechenov.ru

Смолярчук Елена Анатольевна — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0002-2615-7167. E-mail: smolyarchuk_e_a@staff.sechenov.ru

Кудлай Дмитрий Анатольевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет); заместитель декана по научно-технологическому развитию факультета биоинженерии и биоинформатики, старший научный сотрудник факультета биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии № 71 ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»» ФМБА России; член-корреспондент РАН. ORCID ID: 0000-0003-1878-4467. E-mail: kudlay_d_a@staff.sechenov.ru

Апполонова Светлана Александровна — кандидат химических наук, руководитель Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0002-9032-1558. E-mail: appolonova_s_a@staff.sechenov.ru